



UNIVERSIDAD DE CUENCA

**Facultad de Ciencias Químicas
Carrera de Ingeniería Química**

Formulación de polímeros biodegradables con adición de aceites esenciales con efecto antibacteriano

Trabajo de titulación previo a la obtención del
título de Ingeniero Químico

Autores:

Víctor Mauricio Aucapiña Maza

C.I: 0105878565

Josué Israel Heredia Reinoso

C.I: 0301679536

Directora:

Dra. María Elena Cazar Ramírez, PhD.

C.I: 0602243800

Cuenca - Ecuador

17-octubre-2019



RESUMEN

El objetivo de esta investigación es la elaboración de un film biodegradable con efecto antibacteriano al adicionar aceites esenciales en su formulación, ya que poseen propiedades antibacterianas las cuales inhiben el crecimiento bacteriano alargando la vida útil de los alimentos, por lo que pueden ser usados como recubrimientos en alimentos. En la actualidad existe una gran variedad de empaques para alimentos de origen sintético de un solo uso que demoran años en descomponerse acumulándose generando contaminación.

Para la obtención de los aceites esenciales se utilizó el método de extracción por arrastre de vapor. Los aceites esenciales de apio (*Apium graveolens*), laurel (*Laurus nobilis*) y tomillo (*Thymus vulgaris*), los cuales presentaron un rendimiento de 0.009, 0.96 y 0.15% respectivamente. Posteriormente se realizó un bioensayo de actividad microbiana con distintas concentraciones de aceite esencial las cuales fueron 2.5, 5 y 10% con tres tipos de bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus sp*, obteniéndose un control positivo para la bacteria *E. coli* con el aceite esencial de apio y laurel en una concentración del 5%.

Para la elaboración de los films biodegradables se usó dos componentes base que son el quitosano y el almidón de yuca.

Se realizó el ensayo de vida de estante para evaluar el efecto inhibitorio de los films usando carne de res. El resultado mostró que el aceite esencial de apio tuvo un 30.27% de inhibición de crecimiento bacteriano frente a la bacteria *E. coli*.

Palabras claves: Film biodegradable. Aceite esencial. Antibacteriano. Extracción por arrastre de vapor.



ABSTRACT

The objective of this investigation is the elaboration of a biodegradable film with antibacterial effect by adding essential oils in its formulation, since it has antibacterial properties which inhibit bacterial growth extending the shelf life of food, so they can be used as food coatings. At present there is a great variety of packaging for foods of synthetic origin of a single use that take years to decompose accumulating generating pollution.

In order to obtain the essential oils, the steam drag extraction method was used. The essential oils of celery (*Apium graveolens*), laurel (*Laurus nobilis*) and thyme (*Thymus vulgaris*), which had a yield of 0.009, 0.96 and 0.15% respectively. Subsequently, a microbial activity bioassay was carried out with different concentrations of essential oil which were 2.5, 5 and 10% with three types of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus sp* bacteria, obtaining a positive control for *E. coli* bacteria with the oil Celery and bay leaf essentials in a 5% concentration.

For the production of biodegradable films, two base components were used, chitosan and cassava starch.

The shelf life test was performed to evaluate the inhibitory effect of the films using beef. The result showed that celery essential oil had a 30.27% inhibition of bacterial growth against *E. coli* bacteria.

Keywords: Biodegradable film. Essential oil. Antibacterial. Steam drag extraction.



Tabla de contenidos

1	INTRODUCCIÓN.....	16
2	MARCO TEÓRICO.....	19
2.1	Empaques de polímeros biodegradables en la industria alimentaria.....	19
2.2	Films biodegradables.....	19
2.3	Componentes biodegradables de películas para alimentos.....	20
2.3.1	Almidón.....	20
2.3.2	Propiedades funcionales del almidón.....	21
2.3.3	Almidón de yuca.....	22
2.3.4	Quitano.....	23
2.3.5	Plastificantes.....	24
2.4	Aceites esenciales como agentes antimicrobianos.....	25
2.4.1	Plantas utilizadas para la extracción de aceites esenciales.....	27
2.5	Bacterias presentes en alimentos.....	32
2.5.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.5.2	<i>Escherichia coli</i>	33
2.5.3	<i>Enterococcus sp</i>	34
2.6	Fundamentos de los ensayos de actividad antimicrobiana.....	35
2.7	Vida de estante.....	37
2.8	Propiedades físicas de los polímeros.....	37
2.9	Propiedades térmicas de los polímeros.....	38
3	METODOLOGIA.....	41
3.1	Extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor por el método de Günther.....	42
3.2	Repique de cepas bacterianas.....	44
3.3	Preparación de medios de cultivo.....	45
3.4	Bioensayo de actividad antibacteriana de los aceites esenciales.....	46
3.5	Formulación de los films.....	48
3.6	Ensayos físicos en los polímeros.....	50
3.7	Ensayo de caracterización del polímero por Espectroscopia Infrarroja.....	52
3.8	Actividad antibacteriana en los films biodegradables.....	54
3.9	Propiedad térmica de los polímeros.....	55
3.10	Ensayo de vida de estante acelerado.....	56
4	RESULTADOS.....	59
4.1	Rendimiento de los aceites esenciales.....	59



4.2	Actividad antimicrobiana en los aceites esenciales.....	59
4.3	Solubilidad de los films biodegradables.....	60
4.4	Densidad de los films biodegradables.....	61
4.5	Caracterización de films por Espectroscopía Infrarroja.....	62
4.6	Análisis antimicrobiano en los films biodegradables.....	65
4.7	Ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	66
4.8	Vida de estante acelerado.....	67
5	DISCUSIÓN.....	69
5.1	Rendimientos de los aceites esenciales.....	69
5.2	Análisis antimicrobiano de los aceites esenciales.....	69
5.3	Análisis de los films biodegradables de quitosano y almidón de yuca.....	70
5.4	Solubilidad de los polímeros biodegradables.....	70
5.5	Densidad del polímero biodegradable a base de almidón de yuca.....	71
5.6	Análisis del ensayo del infrarrojo.....	72
5.7	Análisis antimicrobiano en los polímeros biodegradables.....	72
5.8	Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	73
5.9	Análisis del ensayo de vida de estante acelerado.....	73
6	CONCLUSIONES.....	75
7	RECOMENDACIONES.....	76
8	BIBLIOGRAFIA.....	77



INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del almidón de yuca 23

Tabla 2. Composición química del aceite esencial de apio. 28

Tabla 3. Composición química del aceite esencial de Tomillo..... 30

Tabla 4. Composición química del aceite esencial del Laurel. 31

Tabla 5. Reactivos 41

Tabla 6. Proceso y obtención de los aceites esenciales 43

Tabla 7. Composición del medio de cultivo liquido..... 45

Tabla 8. Cantidad de los compuestos para el medio solido..... 45

Tabla 9. Concentración de los aceites esenciales para el ensayo antimicrobiano..... 47

Tabla 10. Componentes del film a base de almidón de yuca 48

Tabla 11. Rendimiento de los aceites esenciales..... 59

Tabla 12. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales. 60

Tabla 13. Solubilidad del film biodegradable de quitosano con aceites esenciales 60

Tabla 14. Solubilidad del film biodegradable con almidón de yuca con aceites
esenciales..... 61

Tabla 15. Densidad del film biodegradable de almidón de yuca con aceite esencial de
apio..... 61

Tabla 16. Densidad del film biodegradable de almidón de yuca..... 62

Tabla 17. Grupos funcionales de los espectros de los films de quitosano. 63

Tabla 18. Grupos funcionales de los espectros de los films de almidón de yuca. 65



INDICE DE REFERENCIAS

Ilustración 1. Estructura de la amilosa	21
Ilustración 2. Estructura de la amilopectina	21
Ilustración 3. Estructura de la quitina	24
Ilustración 4. Estructura del quitosano	24
Ilustración 5. Estructuras de los componentes más comunes de los aceites esencial	26
Ilustración 6. Planta de apio	28
Ilustración 7. Planta de tomillo	29
Ilustración 8. Planta de Laurel	31
Ilustración 9. Reacción de reducción del MTT	36
Ilustración 10. Funcionamiento del DSC	39
Ilustración 11. Termograma del DSC	39
Ilustración 12. Temperatura de transición vítrea	40
Ilustración 13. Diagrama resumen de la metodología	42
Ilustración 13. Apio cortado	43
Ilustración 14. Laurel cortado.	43
Ilustración 15. Tomillo molido.	43
Ilustración 16. Balón de extracción cargado con la materia prima.	44
Ilustración 17. Balón de extracción cargado con la materia prima.	44
Ilustración 18. Balón de extracción cargado con materia prima.	44
Ilustración 19. Aceite esencial de apio	44
Ilustración 20. Aceite esencial de laurel	44
Ilustración 21. Aceite esencial de tomillo	44
Ilustración 22. Material de plástico y placas de 24 pocillos	46
Ilustración 23. Diseño experimental para el ensayo	46
Ilustración 24. Calentamiento de la solución del polímero.	49
Ilustración 25. Sonificación de la solución del film con el aceite esencial.	50
Ilustración 26. Film biodegradable con adición de aceite esencial de apio y laurel.	50
Ilustración 27. Ensayo de solubilidad del polímero biodegradable con almidón	51
Ilustración 28. Picnómetro	52
Ilustración 31. Muestras de film biodegradable en forma de disco	54
Ilustración 32. Colocación de las muestras en agar nutritivo	55
Ilustración 33. Equipo de DSC	55
Ilustración 34. Prensa para sellar el crisol	56
Ilustración 35. Colocación de la muestra en el equipo	56
Ilustración 36. Muestras de carne envueltas con polímeros	57
Ilustración 37. Vortexado de la muestra	58
Ilustración 47. Termograma de almidón de yuca	66
Ilustración 48 Termograma del film	66
Ilustración 49. Crecimiento bacteriano en la muestra del film comercial	67



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Víctor Mauricio Aucapiña Maza, autor del trabajo de titulación "*Formulación de polímeros biodegradables con adición de aceites esenciales con efecto antibacteriano*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 17 de Octubre del 2019

Víctor Mauricio Aucapiña Maza

C.I: 0105878565



Cláusula de Propiedad Intelectual

Yo, Josue Israel Heredia Reinoso, autor del trabajo de titulación "*Formulación de polímeros biodegradables con adición de aceites esenciales con efecto antibacteriano*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 17 de Octubre del 2019

Josué Israel Heredia Reinoso

C.I: 0301679536



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Yo, Víctor Mauricio Aucapiña Maza en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Formulación de polímeros biodegradables con adición de aceites esenciales con efecto antibacteriano*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de Octubre del 2019

Victor Mauricio Aucapiña Maza

C.I: 0105878565



**Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional**

Yo, Josue Israel Heredia Reinoso en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "*Formulación de polimeros biodegradables con adición de aceites esenciales con efecto antibacteriano*", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 17 de Octubre del 2019

Josue Israel Heredia Reinoso

C.I. 0301679536



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a la Virgen María por darme salud y vida, por estar siempre a mi lado cuidando y haciéndome tomar las mejores decisiones que me hacen una persona de bien.

También agradezco a mis padres, los cuales me han apoyado en todo momento, brindándome su cariño incondicional e inculcándome sus valores, lo cuales me han llevado a ser una persona correcta.

Agradezco a la Dra. María Elena Cazar directora de mi tesis, la cual nos brindó su tiempo, sus conocimientos y por brindarnos su confianza y apoyo para la culminación de este trabajo de titulación.

Además, quiero agradecer a todos los docentes de la carrera de Ingeniería Química los cuales nos han inculcado sus conocimientos y nos han ayudado a formarnos como unos grandes profesionales.

De igual manera agradezco a mis compañeros de clases y a cada uno de mis amigos por brindarme su amistad y su apoyo en toda esta etapa estudiantil.

Víctor Mauricio Aucapiña Maza



Ante todo, quiero agradecer a Dios por haberme permitido culminar una etapa más en mi vida con mucho esfuerzo, dedicación y esmero, por siempre ser ese refugio en momentos difíciles, por iluminarme a tomar las decisiones que he tomado porque gracias a eso soy la persona que soy hoy en día.

Agradezco infinitamente a mis padres y a mis abuelitos quienes siempre estuvieron conmigo, que gracias a sus consejos y amor incondicional me permitieron culminar esta etapa.

Quiero brindar mi más sincero agradecimiento a la Dra. María Elena Cazar, directora de tesis que con mucha dedicación y esfuerzo me ha brindado sus conocimientos para la culminación de este trabajo de titulación.

Agradecer a todos los docentes de la carrera de Ingeniería Química por transmitirme sus conocimientos.

De manera general, quiero agradecer a mi familia y amigos que de alguna manera fueron parte de este largo proceso, gracias a ellos por su apoyo, amistad y cariño.

Josue Israel Heredia Reinoso



DEDICATORIA

A mis padres Miguel y Blanca por todo el esfuerzo y confianza que han puesto en mí y por el apoyo incondicional que me han brindado

A mis hermanos Miguel, Marco, Gabriela y Janeth por el apoyo que me han brindado en el transcurso de mi vida.

A Paola quien siempre ha estado apoyándome y ayudándome en los momentos más difíciles.

A mis amigos Josué compañero de tesis, Mafer, Santiago, Cristian y Meño por compartir inolvidables momentos.

Víctor Mauricio Aucapiña Maza



Este logro va dedicado a mis padres quienes con su amor y dedicación me apoyaron y alentaron a seguir adelante, a pesar de mis errores y desaciertos siempre me siguieron apoyando y estuvieron junto a mí durante este largo trayecto. Gracias a ellos que día a día me inculcaron valores y el respeto hacía las demás personas, y gracias a eso soy una persona de bien.

A mis abuelitos Efraín y Blanca que me acogieron en su hogar durante toda mi vida universitaria que con su amor y consejos me ayudaron a salir adelante y culminar una etapa más en mi vida. A ellos muchas gracias por su amor y apoyo incondicional.

A mi familia que siempre me apoyaron y que de alguna manera estuvieron presentes con sus palabras de aliento y cariño en este largo camino.

A mis amigos Víctor, María Fernanda, Christian A., Santiago y Christian F., a ellos muchas gracias por su apoyo, amistad y cariño.

Josue Israel Heredia Reinoso



1 INTRODUCCIÓN

La preocupación por la conservación del medio ambiente ha potenciado el desarrollo de investigaciones para la síntesis de films biodegradables con base en recursos renovables de origen natural (Ruiz Avilés, 2005). La producción y el uso de plásticos en el mundo se han incrementado dramáticamente en los últimos veinte años, liberando una carga de contaminación en las aguas y el suelo. La principal preocupación es dirigir los esfuerzos de investigación para desarrollar plásticos que se degraden más rápidamente en el medio ambiente (Avella et al., 2005).

Los desperdicios plásticos representan entre el 20 y el 40% en volumen de los desechos sólidos municipales en los países industrializados. La mayor demanda de plásticos procesados está en el sector de empaques para alimentos, seguido por la industria farmacéutica y de cosméticos, lo cual ha hecho que esté sector se interese en reemplazar los plásticos de un solo uso por empaques biodegradables en el mercado. El impacto ecológico que tendría el uso de films biodegradables sería de gran beneficio para disminuir los problemas de contaminación, ya que se estima que los plásticos se acumulan en el medio ambiente a una velocidad de 25 millones de toneladas por año y aunque no se conoce el tiempo requerido por estos compuestos para su total mineralización a CO₂, se supone que el uso de plásticos biodegradables disminuiría la contaminación por estos productos en un 20% (Breslin, 1993).

El principal país productor y distribuidor de plásticos en el mundo es China, el cual generó entre los años 2002 y 2013 una cantidad de 24 millones de toneladas de plástico y se estima que para el 2020 la cantidad de plástico superara los 500 millones de toneladas. Sus principales mercados son Europa y América (Villaviciencio, 2018).

En el Ecuador, la contaminación por residuos sólidos también es un problema crítico que aún no se ha podido controlar, cada semana se genera 61 mil toneladas aproximadamente de basura, de las cuales los principales desechos generados son el plástico y el papel. Solo un mínimo porcentaje de estos desechos sólidos se recicla. Otra parte de los residuos van a parar a los ríos, los cuales son arrastrados por varios kilómetros hasta llegar a la región costera. Los plásticos representan el 95% de la contaminación marina (Moran, 2018).

Existe una cantidad considerable de polímeros biodegradables y de biopolímeros obtenidos sintéticamente y de recursos naturales, pero la mayoría de ellos son costosos. El uso de productos agrícolas en aplicaciones poliméricas se considera una forma



interesante de reducir los excedentes de estos productos y de desarrollar aplicaciones no comestibles. Los polímeros biodegradables basados en el almidón son de bajo costo y se obtienen de un recurso agrícola renovable (Ruiz Avilés, 2005).

La conservación de los alimentos es un tema clave, en relación con nuestros cambios en el estilo de vida y la creciente demanda de productos alimenticios "frescos" listos para el consumo. Los recientes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos, están asociados con la expansión del mercado mundial de la industria alimentaria, los cuales han impulsado los esfuerzos científicos para desarrollar un empaque activo que es uno de los conceptos innovadores del envasado de alimentos que se ha introducido como respuesta a los cambios continuos en las demandas actuales de los consumidores y las tendencias del mercado. El objetivo de este tipo de empaques de alimentos es reducir, inhibir o retardar el crecimiento de microorganismos que pueden estar presentes en los alimentos o en el propio material de embalaje (Appendini & Hotchkiss, 2002).

Los films biodegradables pueden formularse con fuentes comestibles de plantas y animales, como el almidón de maíz, el gluten de trigo, la proteína de soja, la albúmina, la gelatina, el colágeno, la caseína y las proteínas de suero (Tharanathan, 2003). La adición de un agente antibacteriano a los films biodegradables para controlar el deterioro microbiano implica evaluar varias sustancias sintéticas o naturales, sus dosis y efectos sobre las características organolépticas de los alimentos (Seydim & Sarikus, 2006).

La formulación de un film con propiedades antibacterianas incluiría ingredientes seguros y bioactivos, como los aceites esenciales. Los aceites esenciales son líquidos oleosos aromáticos obtenidos a partir de material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, frutas y raíces). Se pueden obtener por prensado, fermentación, destilación o extracción, pero el método de destilación por arrastre de vapor se usa más comúnmente para su producción comercial. Los aceites esenciales son ampliamente utilizados como fragancias, productos farmacéuticos y saborizantes (Burt, 2004).

Los compuestos fenólicos, presentes en los aceites esenciales, se conocen como sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) y, por lo tanto, podrían usarse para prevenir el crecimiento de bacterias nativas y contaminantes después de la cosecha (Gachkar et al., 2007).

En este estudio se seleccionó estos aceites esenciales como aditivos para transferir el efecto antibacteriano al film. Se debe considerar el impacto organoléptico de los aceites esenciales, ya que la aplicación como aditivo alimentario puede alterar el sabor de los



alimentos o superar los umbrales de sabor aceptables (Gutierrez, Barry-Ryan, & Bourke, 2008).

En la presente investigación, se presenta la formulación de un film biodegradable a partir de almidón de yuca, quitosano y glicerol con adición de aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Laurus nobilis* y *Apium graveolens* para el desarrollo de un film activo para inhibir la contaminación de microorganismos. El ensayo antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Enterococcus sp*, mostró la actividad biocida de los aceites esenciales.

OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar a escala de laboratorio formulaciones de polímeros biodegradables con adición de aceites esenciales con efecto antibacteriano.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comprobar la capacidad antibacteriana de los aceites esenciales en polímeros mediante el método de Kirby- Bauer.
- Determinar las características fisicoquímicas de los polímeros biodegradables, mediante espectroscopia infrarroja, análisis térmico y solubilidad
- Comparar la capacidad antimicrobiana de los polímeros formulados con almidón de yuca y quitosano en un ensayo de vida de estante acelerado.



2 MARCO TEÓRICO

2.1 Films biodegradables en la industria alimentaria

La industria alimentaria abarca varios procesos que son importantes para mantener la calidad de un alimento y uno de estos procesos es el empaqueo el cual protege y conserva el alimento. La utilización de polímeros sintéticos para empaques genera un gran impacto en el ambiente causando grandes cantidades de desechos sólidos, por cual se ha buscado nuevas tecnologías para el desarrollo de films biodegradables, los cuales cumplen con la misma función de un polímero sintético, pero estos tienen la capacidad de degradarse en un periodo corto de tiempo. Se ha incrementado el uso de empaques activos los cuales tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos causantes del deterioro de los alimentos alargando así su vida útil (Santiago, 2015).

2.2 Films biodegradables

Los films biodegradables sirven para la protección de alimentos y al término de su uso estos se descomponen reduciendo así el impacto ambiental, ya que estos podrían sustituir a los plásticos de un solo uso, estos se sintetizan a partir de recursos renovables como los almidones y residuos de la industria pesquera (Zaritsky, 2013).

El almidón tiene la capacidad de formar films debido a que tiene amilosa en su estructura, pero la mezcla de almidón y agua genera películas muy quebradizas y rígidas, por lo cual se adiciona plastificantes en su formulación como son los polioles (polietilenglicol, glicerol, sorbitol), sacarosa y urea, ya que estos generan una mayor flexibilidad y resistencias en las películas, cabe recalcar que para el uso del plastificante se debe verificar la compatibilidad que exista con el polímero. Los plastificantes aumentan la movilidad de las cadenas poliméricas y reducen las fuerzas intermoleculares que existen dentro la estructura del polímero. Para la elaboración de las películas existen dos técnicas, la primera a nivel industrial la cual utiliza la extrusora para formar las películas y la segunda a nivel investigativo la cual hace el uso de la técnica del casting o también conocido como vaciado en placa. Para la elaboración del film con la técnica de casting se debe tener en cuenta la concentración del almidón, si la concentración es menor del 3% la solución no se gelificará, en cambio si la solución es mayor del 30% la solución será muy viscosa y será muy dificultosa transvasar a la placa y obtener el espesor que uno se plantee (Trujillo Rivera, 2014).



El quitosano tiene la capacidad de formar películas con excelentes propiedades mecánicas y físicas, este se diluye a partir de ácidos como: acético, propionico y fórmico, se debe tener en cuenta el pH de la solución, ya que este factor genera que las películas se deformen con rapidez. La formación de películas a partir de quitosano se da por la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares entre el grupo hidroxilo y amino de sus respectivas cadenas. Las aplicaciones que se le pueden dar a las películas de quitosano son muy extensas pero las principales son para la industria alimenticia y para la medicina (Ruth, 2010).

2.3 Componentes biodegradables de películas para alimentos

A continuación, se describirán las características físico-químicas de los componentes más comunes para la formulación de películas biodegradables.

2.3.1 Almidón

El almidón es un polímero natural que se encuentra en plantas y seres vivos, al ser un recurso renovable y al tener la capacidad de biodegradarse se usa como materia prima en la industria de biopolímeros (Ruiz Avilés, 2005). El almidón se encuentra mayoritariamente en los granos de los cereales los cuales constituyen casi el 60% de la composición y es fácil la separación del mismo por métodos químicos. El almidón está formado por gránulos los cuales son insolubles en agua. La morfología, la composición química y la estructura van a variar según la especie y el lugar en donde de origen (Santiago, 2015). El almidón está compuesto principalmente por dos macromoléculas, alrededor del 20% es amilosa y el 80% amilopectina, estos porcentajes va a depender del tipo de granulo de cereal. La polimerización de este compuesto natural se debe a la interacción de la amilosa y la amilopectina.

La amilosa es un polisacárido lineal que está compuesto de 200 a 2000 moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos α -1, 4 los cuales están enrolladas en forma de hélices, las cadenas están alineadas de forma paralela y entrelazados por puentes de hidrogeno, como se muestra en la ilustración 1 (Montano Aragón, 2013).

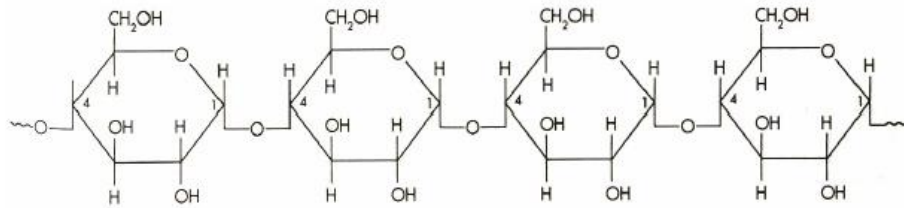


Ilustración 1. Estructura de la amilosa

Fuente:(Meneses & Corrales, 2007)

La amilopectina es un polisacárido con numerosas ramificaciones, la cadena principal está unida por enlaces glucosídicos α -1,4 y las ramificaciones unidas por enlaces glucosídicos α -1,6, estos enlaces dan al almidón regiones cristalinas dentro del granulo. Estas moléculas son más grandes que las moléculas de la amilosa, alrededor de 10.000 y 20.000.000 moléculas de glucosa. Están alineadas de forma paralela y entrelazadas por puentes de hidrogeno, como se muestra en la ilustración 2 (Montano Aragón, 2013).

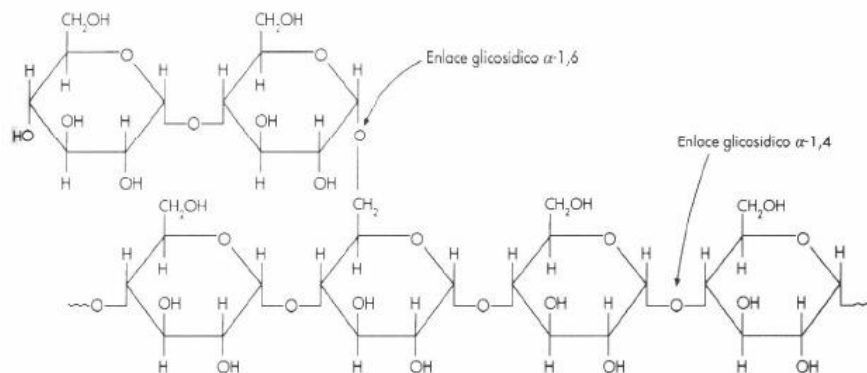


Ilustración 2. Estructura de la amilopectina

Fuente:(Meneses & Corrales, 2007)

2.3.2 Propiedades funcionales del almidón

- **Gelatinización**

La gelatinización es un proceso irreversible de transición de fase, donde los gránulos de almidón se unen para formar una red polimérica amorfa, debido que el granulo de almidón en agua fría este es insoluble, este proceso ocurre en un rango de cercano de temperatura 60 a 70 °C (Quintero & Ramírez, 2013).

Este proceso se da por la absorción del agua dentro de la estructura molecular, a medida que se va aumentando la temperatura, estos van reteniendo más agua lo cual genere que el granulo se valla hinchando, lo cual genera que la cristalinidad del granulo



valla disminuyendo, haciendo que estos gránulos ocupen los espacios vacíos, la viscosidad del almidón va aumentando a medida que aumenta la temperatura hasta que ocurre la desfragmentación en donde los gránulos se disuelve completamente haciendo que la viscosidad disminuya (Ruiz Avilés, 2005).

- **Retrogradación**

Es el proceso posterior a la gelatinización en el cual la temperatura empieza a disminuir y se da el periodo de enfriamiento en donde las moléculas de los gránulos del almidón empiezan a reasociarse en una estructura ordenada, Este proceso es muy complejo y va a depender de diversos factores como la temperatura, el origen del almidón, la concentración, el pH, la temperatura de enfriamiento y la presencia de solutos, las propiedades reológicas cambian habiendo que la pasta de almidón sean más rígidos y firmes (Eduardo, Sandoval-Aldana, & Fernández-Quintero, 2007).

- **Desestructuración**

Es el proceso de transformación de los gránulos de almidón semicristalinos en una matriz homogénea de polímero amorfo, por una parte ocurre la despolimerización parcial de las moléculas y por la otra el rompimiento de los puentes de hidrógeno entre las moléculas, en este proceso la amilopectina es la primera en polimerizarse y luego sigue la amilosa, la cual requiere más energía, los factores físicos y químicos que se involucran en la desestructuración son la energía total aplicada, el tiempo de residencia, la temperatura, el esfuerzo constante, la velocidad de cizalladura y el contenido de agua (G. Alma Verónica, 2015).

2.3.3 Almidón de yuca

La yuca es una raíz en donde su principal componente es el almidón, el cual se encuentra en forma de gránulos, es muy versátil y su eficiencia es muy alta en todas sus aplicaciones, entre ellas los biopolímeros. Se la puede clasificar en dos tipos: agrios y dulces. El almidón agrio al sufrir un proceso de fermentación hace que posean propiedades adecuadas para alimentos, mientras el almidón dulce o nativo no se fermenta y es el que se usa generalmente en la industria. La cantidad de amilosa está alrededor del 17%, el tamaño de los gránulos está entre los 5 a 35 μm , la forma del mismo es redonda y achatada. A continuación en la tabla 1 se muestra la composición química del almidón de yuca (Trujillo Rivera, 2014).



Tabla 1. Composición química del almidón de yuca

Almidón Nativo	Componente (%)
Grasa	0.20
Proteína	0.06
Ceniza	0.29
Humedad	9.48
Fibra	1.01
Amilosa	17
Amilopectina	83

Fuente: (Bentacur Ancona, 2008)

2.3.4 Quitosano

Es un polisacárido natural que se obtiene de la quitina, el cual se encuentra en gran cantidad en la naturaleza. El quitosano y la quitina presentan propiedades antibacterianas los cuales se están utilizando en diversas aplicaciones como el uso de biopolímeros en la industria alimentaria y biotecnología. Se encuentra en las estructuras de soporte de los artrópodos, también en hongos y moluscos (Ortega, 2017).

El quitosano es un copolímero de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa y 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa, mientras que la quitina está formado por unidades de 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4), el proceso de obtención se da por desacetilación, dejando libre el C del grupo 2, tal como se muestra en la ilustración 3 y 4 (Ruth, 2010).

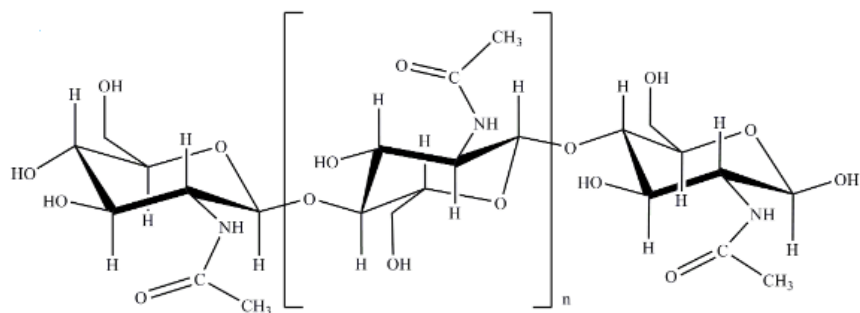


Ilustración 3. Estructura de la quitina

Fuente:(Ruth, 2010)

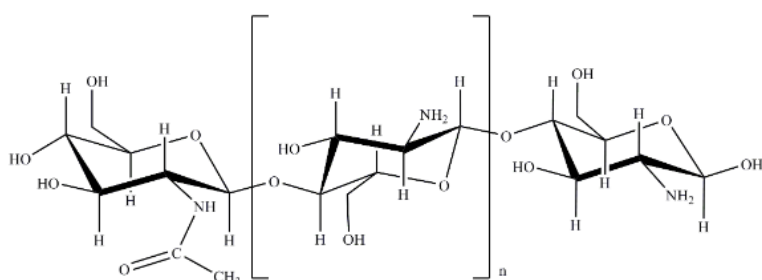


Ilustración 4. Estructura del quitosano

Fuente: (Ruth, 2010)

El método de obtención y el origen del mismo, determinan el tamaño y la composición de las cadenas. Las principales propiedades físicas químicas del quitosano son el grado de desacetilación y el peso molecular promedio las cuales dan la caracterización del polímero, otras propiedades son el la cristalinidad, el contenido de proteínas, agua y cenizas (Ruth, 2010).

2.3.5 Plastificantes

Los plastificantes son sustancias estables los cuales tienen un punto de ebullición alto, no son volátiles por lo cual permite cambiar las propiedades mecánicas de los biopolímeros, estos cambios influyen de manera relevante en las propiedades de barreras de las películas de biopolímeros. Con el uso de plastificantes se obtienen películas menos frágiles, con mayor resistencia a la tensión, con mayor flexibilidad y con una mayor maleabilidad (Santiago, 2015).

Unos de los plastificantes más utilizados es el glicerol el cual permite obtener películas de polímeros más flexibles debido a que disminuye la interacción de los enlaces



intermoleculares de las cadenas poliméricas, los valores de permeabilidad de vapor de agua son mayores con respecto a otros plastificantes como el etilenglicol, polietilenglicol y el sorbitol, en todos estos plastificantes si se aumenta la concentración del plastificante, la película de biopolímero tendrá mayor elongación, pero se reducirá la tensión. el glicerol al ser muy estable y compatible con las cadenas poliméricas es el más usado en la industria (Domingez & Munguia, 2012).

2.4 Aceites esenciales como agentes antimicrobianos

Los compuestos esenciales naturales, han sido utilizados desde la antigüedad, como compuestos aromáticos y preservantes. Los aceites esenciales abarcan un extenso campo de aplicación tales como efectos farmacológicos, antiinflamatorios, antioxidantes y anticancerígenos. Algunos aceites esenciales son biocidas contra ciertos organismos como bacterias, virus, hongos, protozoos e insectos. Se ha estudiado también la importancia de estos aceites esenciales debido a disponibilidad, a su baja toxicidad y a sus pocos efectos secundarios, así como también su buena biodegradabilidad comparado con antibióticos y preservantes (Kalemba, 2003). Por todos estos beneficios, se ha estudiado el control que pueden realizar estas sustancias contra microorganismos patógenos en alimentos y, por lo tanto, la posibilidad de ser usados como un método de control o eliminación (DIANA DEL PILAR GUIZA PÉREZ & LINA MARÍA RINCÓN PRIETO, 2007).

Algunas hierbas y especias han sido utilizadas durante siglos para proveer sabores diferentes a los alimentos y éstas pueden mostrar también actividad antibacteriana. Los compuestos responsables de este efecto son con frecuencia fracciones del aceite esencial, los cuales son generalmente compuestos fenólicos. Los aceites esenciales de algunas especies de plantas presentan efecto antimicrobiano, tienen un amplio campo de aplicación para el control del crecimiento de microorganismos en alimentos por lo que se emplea como método de preservación (Hao et al, 1998). Se ha retribuido que el efecto antimicrobiano se debe a los terpenoides y compuestos fenólicos en los aceites (Canabal, 2017) .

Los aceites esenciales por lo general se condensan en una región específica como las hojas, corteza o frutos, y cuando esto se da en distintos lugares en la misma planta, con frecuencia su composición es diferente. Por lo general se concibe que son derivados de hierbas y especias, estas están presentes en muchas plantas con un rol protector contra

el ataque de bacterias, hongos e insectos. Su composición generalmente comprende mono terpenos, hidrocarburos cíclicos, alcohol y derivados esterés, tal como se muestra en la ilustración 5 (DIANA DEL PILAR GUIZA PÉREZ & LINA MARÍA RINCÓN PRIETO, 2007).

Los aceites esenciales son líquidos oleosos, obtenidos de material vegetal (flores, ramas, semillas hojas, cortezas, frutos y raíces). Estos aceites pueden obtenerse por prensado, fermentación o extracción, pero el método de destilación por arrastre de vapor es el más comúnmente usado para la producción comercial de aceites esenciales (Burt, 2004).

En la Unión Europea, los aceites esenciales son ampliamente utilizados como saborizantes de alimentos, perfumes y farmacéuticos, por sus propiedades funcionales. Algunas mezclas de aceites esenciales son comercializados como aditivos de alimento y han sido reconocidos como seguros en Estados Unidos (Burt, 2004).

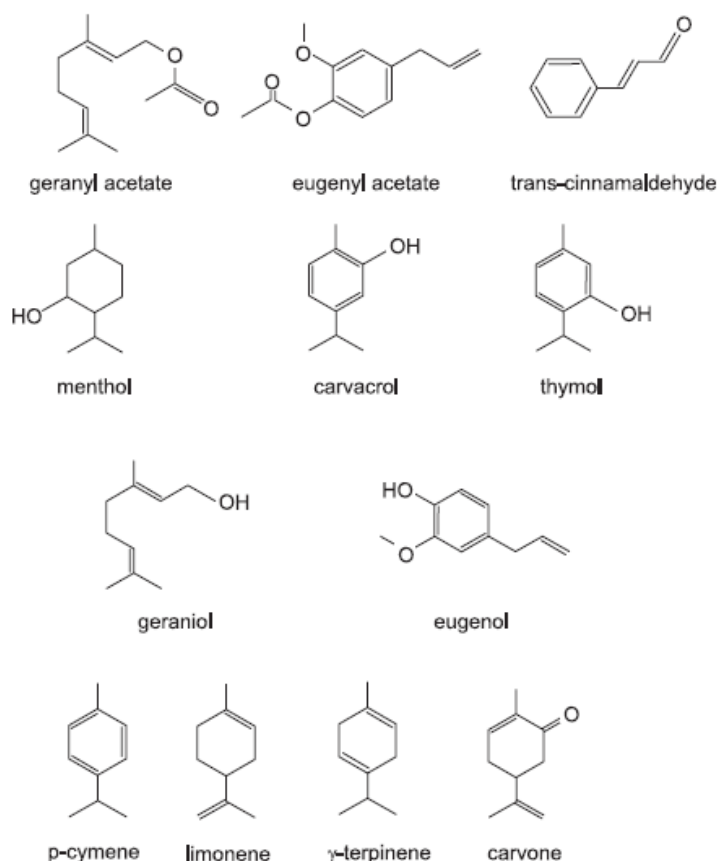


Ilustración 5. Estructuras de los componentes más comunes de los aceites esenciales



2.4.1 Plantas utilizadas para la extracción de aceites esenciales

Para la extracción de aceites esenciales se utilizó estas especies de plantas porque son nativas de la región, por su disponibilidad y por estudios que demuestran su efecto antibacteriano.

- ***Apium graveolens* (Apio)**

Pertenece a la familia de *Umbeliferae*; se diferencian dos variedades botánicas: *Apium graveolens* var. dulce y *Apium graveolens* var. rapaceum; este último es el apio-nabo. Tiene raíz potente, pivotante y profunda. Posee tallos que alcanzan de 30 a 80 centímetros de altura, tal como se observa en la ilustración 6. Posee propiedades diuréticas, antihipertensivas y como sedante menor (José Calderón, Carlos Castañeda, 2003).

Es una especie de clima templado-frío originaria de la Cuenca del Mediterráneo; sus antecesores silvestres se encuentran en zonas bajas y pantanosas, lo que explicaría su alto requerimiento hídrico. Tiene propiedades diuréticas, conferidas especialmente por su riqueza en aceites esenciales; además propiedades carminativas y depurativas de la sangre porque ayuda a eliminar toxinas. Posee un glucósido, apiina, y un aceite esencial que le da el sabor, compuesto por apiol y limoneno. Ayuda a combatir infecciones de los riñones, provocadas por bacterias o virus y a disminuir el colesterol, favoreciendo al sistema circulatorio. Se consume tanto crudo como deshidratado en sopa, hervido y como condimento (Betina Tonelli, Sergio Alí, 2011).

El cultivo de apio no es demasiado exigente en suelos, siempre que estos no sean excesivamente húmedos. Necesita de un suelo profundo, ya que su sistema radicular alcanza gran longitud vertical. El pH debe estar cercano a la neutralidad, necesita de boro, por lo que este elemento no debe estar ausente en el suelo (José Calderón, Carlos Castañeda, 2003).

No soporta la salinidad, tanto del agua de riego como del suelo. Requiere que el suelo sea húmedo, pero sin llegar a ser excesivo, el sistema de riego del suelo debe permitir que el suelo esté en un estado perfecto de humedad. Si el suelo sufre de sequedad se produce la pérdida de calidad del cultivo.



Ilustración 6. Planta de apio

Fuente: ("Cultivo de Apio: Taxonomía y Morfología," n.d.)

- **Descripción**

Es una planta herbácea bianual, posee una raíz pivotante que en condiciones adecuadas puede alcanzar unos 60 cm de profundidad con un abundante sistema radical secundario, adventicio y superficial. El tallo es un eje corto del que salen una roseta de hojas que poseen un pecíolo carnoso con la base en forma de cuña. Tiene hojas pinnadas partidas, los frutos son diaquenios y comercialmente son considerados semillas. El peso de 1000 semillas de apio es aproximadamente de 0.5 g. Las flores son blancas o violetas según la variedad (Betina Tonelli, Sergio Alí, 2011).

Las especies de importancia hortícola son:

- ✓ *Apium graveolens* var dulce: apio común (se consumen láminas y pecíolos)
- ✓ *Apium graveolens* var rapaceum: apio nabo (se consume también la raíz)
- ✓ *Apium graveolens* var secalinum: apio de cortar o de hoja (Betina Tonelli, Sergio Alí, 2011).

- **Composición química del aceite esencial de apio.**

La composición química del aceite esencial de apio se muestra a continuación en la tabla 2:

Tabla 2. Composición química del aceite esencial de apio.

Compuesto	Porcentaje (%)
Limoneno	60
Selineno	20

Fuente: (Altamirano, 2013)

- ***Thymus vulgaris* (Tomillo)**

El tomillo, en general, es planta propia de terrenos áridos y poco fértiles, pudiendo atribuirle justamente el calificativo de planta colonizadora por su presencia, a veces casi única, en lugares desprovistos prácticamente de otro tipo de vegetación, como se observa en la ilustración 7. Por su gran adaptación a las zonas áridas pertenece claramente a la agrupación de plantas xerófilas. De forma totalmente espontánea el tomillo viene repoblando rodales y zonas más o menos amplias en altitudes que van desde la orilla del mar hasta los 1.800 metros, e incluso superiores, aceptando, al mismo tiempo, una gran diversidad de suelos (Torrente Sánchez, 1985).



Ilustración 7. Planta de tomillo

Fuente: ("Tomillo - EcuRed," n.d.)

- **Descripción**

El tomillo es una pequeña planta arbustiva y perenne que alcanza como altura media entre 20 y 40 centímetros y que, hasta ahora, se multiplica, crece y se aprovecha de manera espontánea, principalmente en el área mediterránea, aunque algunas especies se desarrollan también en las zonas montañosas del interior, excepto la parte septentrional de la península. El tomillo puede encontrarse en zonas mediterráneas (Torrente Sánchez, 1985).

La planta de tomillo está formada por pequeños manojos de numerosas ramillas delgadas leñosas por su base y herbáceas en la parte superior, que se desarrollan a partir de la zona del cuello. Estas ramillas son portadoras de multitud de hojas muy pequeñas, de forma lanceolada, de hasta 7 u 8 milímetros de largo y 1 o 2 milímetros de ancho, con los bordes ligeramente vueltos hacia abajo y de un olor agradable y muy aromatizado, especialmente cuando se frota. Las flores forman una cabezuela más o



menos globosa de inflorescencias abundantes. Su color puede ser blanco, grisáceo, rosado o liliáceo (Torrente Sánchez, 1985).

- **Composición química**

La composición química del aceite esencial de tomillo se muestra a continuación en la tabla 3:

Tabla 3. Composición química del aceite esencial de Tomillo.

Compuesto	Porcentaje (%)
Timol	31,40
p-Cimeno	15,68
gama-Terpineno	9,29
beta-Pineno	5,94
β -Linalool	4,03
Cariofileno	4,20

Fuente: (Morales Castro, 2015)

- ***Laurus nobilis* (Laurel)**

El nombre científico del laurel es *Laurus nobilis* L. El género *Laurus* pertenece a la familia de Lauráceas, a la que da nombre, tal como se muestra en la ilustración 8 (Beatriz Santiago Pinazo, 2015).

Crece espontáneamente en los países de la cuenca mediterránea hasta unos 1200 metros de altitud. Es originario del Mediterráneo y de Asia menor. Al laurel se le atribuyen propiedades expectorantes, diuréticas, carminativas y estimulantes. En el aceite esencial del laurel los componentes oxigenados suponen un 78,8% del total de su composición, siendo los mayoritarios el eucapitol (51%) y el ester alpha-terpinenyl acetate (12.9%), seguidos de los esteres bornyl acetate (0.5%) y linalyl acetate (0.25%). Otros componentes son los hidrocarburos monoterpenos y sesquiterpenos que forman el 18% de su composición (Beatriz Santiago Pinazo, 2015).



Ilustración 8. Planta de Laurel

Fuente: (Carretero Accame, n.d.)

- **Descripción**

El laurel es un árbol dioico de 2 a 6 metros, de hoja perenne. Las ramas son erguidas y recubiertas por una corteza lisa. Las hojas son puntiagudas, alternas, coriáceas, lanceoladas, por lo general onduladas en el borde, poseen base atenuada y ápice. Miden unos 3-9 centímetros de longitud y poseen corto peciolo, son de color verde pálido y mate por el envés y verde oscuro brillante por el haz. Son muy aromáticas. Las flores se agrupan en la axila de las hojas en pequeñas umbelas pedunculadas. Las hojas son pequeñas, olorosas, amarillas o blancas. Florece en primavera, entre marzo y mayo y los frutos son bayas, ovoides, del tamaño de un guisante grueso, de color azul oscuro, o negro en la madurez, que contienen una sola semilla (Beatriz Santiago Pinazo, 2015).

- **Composición química**

A continuación, en la tabla 4 se muestra la composición química del aceite esencial de laurel:

Tabla 4. Composición química del aceite esencial del Laurel.

Compuesto	Porcentaje (%)
Sabineno	7,47
beta Pineno	3,25
Eucaliptol	50,65
gama Terpineno	1,20
Linalool	3,65
Terpineno-4-ol	2,16
alfa-Terpineol	2,30



alfa-acetato de terpinenilo	12,91
Metileugenol	3,80
alfa Pineno	3,95

Fuente: (Beatriz Santiago Pinazo, 2015)

2.5 Bacterias presentes en alimentos

Los microorganismos son muy importantes en nuestra vida cotidiana pero no siempre de manera positiva. Son necesarios en la obtención de muchos alimentos, pero también son los principales responsables del deterioro de algunos productos alimenticios. Además, están implicados en las perturbaciones de la salud de origen alimentario. Existen muchos factores que están relacionados de forma directa en la reproducción de los microorganismos en los alimentos y por lo tanto se deben tener en consideración cuando se pretende prever las infecciones de origen alimentario. Existen 2 tipos de factores que facilitan el crecimiento de microorganismos en los alimentos que por lo general se los nombra como factores intrínsecos que se debe a la naturaleza físico-química del alimento y los factores extrínsecos que pertenecen a las condiciones ambientales y de almacenamiento. Entre los factores intrínsecos tenemos al pH, oxígeno disponible, nutrientes y actividad de agua; mientras que entre los factores extrínsecos tenemos a la humedad relativa, oxígeno y a la temperatura que existe en la atmósfera. Hay varios tipos de microorganismos que tienen diversas formas y estructuras, siendo estas complejas. Hongos, levaduras y bacterias son aquellas las que principalmente producen más impacto en el deterioro de los productos alimenticios. Las bacterias son las principales causantes de las enfermedades de origen alimentario. Múltiples factores favorecen a la presencia de microorganismos en los productos alimenticios siendo la presencia endógena y la contaminación cruzada son los causantes más frecuentes. De todos los microorganismos mencionados anteriormente, las bacterias son el grupo más importante que afectan a los alimentos debido a diversidad. En condiciones óptimas tienen la capacidad de reproducirse rápidamente debido a los nutrientes que tienen los alimentos, modificándolos o permaneciendo en ellos produciendo toxinas. Son organismos unicelulares que pueden presentar diversas formas. Las formas más comunes son:

- ✓ Forma esférica, llamados cocos.
- ✓ Forma espirulada, llamados espirilos.
- ✓ Forma cilíndrica, llamados bacilos



Los microorganismos tienen varios efectos en los alimentos, ya se mencionó los principales factores que van a intervenir en el crecimiento de los microorganismos en los productos alimenticios. Existen diversos orígenes de los microorganismos presentes en los alimentos como el aire, agua, manipuladores, suelo, equipos, utensilios y materia prima (In Food Quality, 2011).

2.5.1 *Staphylococcus aureus*

El género *Staphylococcus* pertenece a phylum Firmicutes y tiene cerca de 38 especies. De las cuales solo 18 especímenes de *Staphylococcus*, son de gran importancia de los alimentos, siendo *S. aureus* la más destacada y siendo ésta indicadora de contaminación por una inadecuada manipulación. *S. aureus* es un microorganismo con una morfología típica de cocos Gram positivos aglomerados en racimos de entre 0,5 a 1,5 μm de tamaño, inmóviles y no esporulados. El *S. aureus* es una bacteria mesófila aerobia facultativa que puede crecer en rangos extensos de pH y de actividad acuosa. Es uno de los patógenos más resistentes a las adversidades que puede presentar el medio ambiente, consiguiendo resistir y persistir a temperaturas de congelación y descongelación. Las máximas concentraciones de sal que favorecen la reproducción y crecimiento van a depender de factores como: pH, potencial redox, temperatura, entre otros. La intoxicación Alimentaria Estafilocócica (IAE) es el producto del consumo de productos alimenticios en los que el *S. aureus* se ha reproducido de tal manera que llega a niveles que provocan enterotoxinas estafilocócicas. La sintomática de la IAE es: diarrea, dolor abdominal, náuseas y postración. En casos agravados se puede presentar cefalalgia y shock. La intensidad de los síntomas va a estar relacionado directamente con la cantidad de alimento contaminado que haya sido ingerido y de la susceptibilidad del individuo, la cual viene determinado por el estado inmunológico y de la edad de la persona. Su tratamiento es la hidratación. La IAE, al ser una enfermedad auto-limitante la persona se recupera en un plazo de dos días y el periodo de incubación oscila entre 0,5 a 8 horas (Ministerio de Salud y Protección Social, Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA, 2011).

2.5.2 *Escherichia coli*

E. coli es un microorganismo patógeno que habita en los intestinos de las personas y de los animales. Existen diferentes tipos de *E. coli*, la gran mayoría se localiza de manera natural en nuestros intestinos y desenvuelve un rol importante en ayudar a



nuestro organismo a digerir los alimentos. Existen, sin embargo algunos tipos que pueden provocar enfermedades cuando son ingeridos (BOSTON PUBLIC HEALTH COMMISSION, 2019).

E. coli esa bacteria anaerobia facultativa, Gram negativo, no forma esporas. Miden entre 0,5 μm de ancho por 3 μm de largo. Las colonias llegan a medir de entre 2 a 4 mm de diámetro, tienen un centro grande de color oscuro e incluso negro y tienen brillo verde metálico cuando se observa con la luz (Rojas, 2011).

E. coli es un microorganismo productor de la toxina Shinga la cual puede causar graves enfermedades por medio del consumo de alimentos contaminados. El principal origen de las epidemias de *E. coli* productora de toxina Shinga son los productos cárnicos crudos o poco cocidos, hortalizas y frutas contaminadas por materia fecal y la leche cruda (Organización Mundial de la Salud, 2008).

Existen ciertos casos, en los que el *E. coli* puede causar un problema grave denominado síndrome urémico hemolítico, que puede destruir las células rojas de la sangre y causar insuficiencia renal, esta rara enfermedad se da especialmente en niños y personas de edad avanzada. Las personas que contraen esta enfermedad se recuperan en pocas semanas, pero algunas sufren daños permanentes (BOSTON PUBLIC HEALTH COMMISSION, 2019).

2.5.3 *Enterococcus sp*

Enterococcus sp es un microorganismo considerado como un género apartado del género *Streptococcus*. Para la separación de géneros la división se basó en estudios taxonómicos que evidenciaron su nula relación con *Streptococcus* por lo cual se los consideró como géneros diferentes. *Enterococcus sp* son células ovoides o esféricas, de entre 0,6-2 x 0,6-2,5 μm de tamaño. Son cocos Gram positivos, no forman esporas. Se presentan en forma de cadenas cortas, son anaerobios facultativos con metabolismo fermentativo, presentan complejos requerimientos nutricionales y además pueden sobrevivir después del calentamiento a 60 °C durante 30 minutos. Las diversas especies del género *Enterococcus* representan un grave peligro para la salud, pues son patógenos. Pueden provocar enfermedades graves como la endocarditis. También son responsables de infecciones de heridas quirúrgicas, abscesos, infecciones en la piel y



septicemia. La gran mayoría de las infecciones son causadas por la microbiota endógena, aunque puede ser contagiada de persona a persona por el consumo de agua o alimentos contaminados. Los *Enterococcus* forman parte del grupo de microorganismos que ayudan como indicadores de la inocuidad de los productos alimenticios, debido a su amplia distribución se los localiza en estos productos alimenticios, principalmente en los productos de origen animal. Son considerados muy buenos indicadores porque mueren más lentamente que los coliformes, ya que son muy resistentes a condiciones ambientales adversas como desecación, congelación y por lo tanto sobreviven (Díaz, Rodríguez, & Zhurbenko., 2010).

2.6 Fundamentos de los ensayos de actividad antimicrobiana

- **Difusión en agar**

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Kirby-Bauer es uno de los procedimientos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la detectar la sensibilidad bacteriana. Consiste en un disco inoculado con la sustancia de prueba. Luego de la incubación al tiempo correspondiente en relación al microorganismo inoculado, se verifica la presencia de halos de inhibición, los cuales son superficies concéntricas donde no se observa crecimiento microbiano. (Picazo, 2000).

- **Ensayo del MTT**

Este método se lo utiliza para determinar la viabilidad celular, el cual es representado por el número de células presentes en el cultivo lo cual es posible medirse por medio de la formación de un compuesto coloreado, debido a una reacción que tiene lugar en las mitocondrias de las células. El MTT (Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico), es captado por las células y reducido por la enzima succínica deshidrogenasa mitocondrial a su forma insoluble formazan. Para cuantificar la cantidad de MTT reducido se debe solubilizar el formazan retenido en las células y posteriormente con un método colorimétrico el cual consiste en una reacción de cambio de coloración del amarillo al azul, tal como se muestra en la ilustración 9 (Daniel Francisco Arencibia Arrebola, Luis Alfredo Rosario Fernández, 2003).

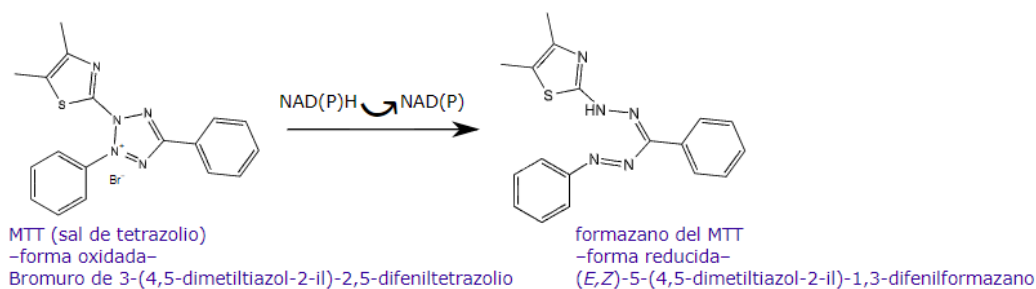


Ilustración 9. Reacción de reducción del MTT

Fuente: (Biomodel, 2006)

La capacidad de las células para reducir el MTT es un indicador de la integridad de las mitocondrias la cual es interpretada como una medida de la viabilidad celular. La determinación de la capacidad de las células para reducir el MTT a formazan permite recabar información sobre la toxicidad del compuesto que se analiza (Daniel Francisco Arencibia Arrebola, Luis Alfredo Rosario Fernández, 2003).

- **Actividad microbiana en films**

La seguridad alimentaria es un tema que cada vez tiene más prioridad, independientemente de la conservación de alimentos y de los avances en la salud pública. Los recientes brotes de enfermedades causadas por alimentos han motivado la búsqueda de opciones innovadoras para inhibir el crecimiento microbiano en alimentos y una elección es emplear empaques que concedan calidad y mayor seguridad. Dichas tecnologías podrían desempeñar un rol sumamente importante para alargar la vida de estante de los productos alimenticios y disminuir el riesgo de contaminación por la presencia de microorganismos patógenos (Hernández, Gonzales, Gutiérrez, Muñoz, & Quintero, 2011).

Los empaques antibacterianos son un modo de empaques activos, a los cuales se les adiciona una solución activa que posibilita el mejoramiento de la funcionalidad de estos, además, la constitución del empaque limita o impide la reproducción de microorganismos. Los agentes antibacterianos pueden ser compuestos de origen natural o compuestos sintéticos. Algunas alternativas de origen natural tenemos los aceites esenciales, estos tienen principios químicos activos como cetonas, esteroides, hidrocarburos terpénicos, alcoholes, aldehídos, fenoles, ácidos, entre otros. La mayoría de aceites esenciales son distinguidos por su actividad antibacteriana y en la actualidad se plantea integrarlos en los empaques para alimentos (Hernández et al., 2011).



2.7 Vida de estante

La vida de estante de un producto alimenticio se define como el tiempo finito posterior a su elaboración en condiciones debidamente controladas de almacenamiento, en las que tendrá una pérdida de sus propiedades fisicoquímicas y sensoriales, y soportará cambios en su estabilidad microbiológica. Existen diversos factores que afectan a la vida de estante de un producto alimenticio entre los cuales se encuentran el tipo de materia prima, la formulación del producto, el proceso empleado, las condiciones sanitarias en las que se llevó a cabo el proceso, envasado, almacenamiento y distribución (María Luisa Carillo Inungaray, Abigail Reyes, 2013).

2.8 Propiedades físicas de los polímeros

En la actualidad los polímeros son empleados en casi todas las áreas de la vida cotidiana de la sociedad como medicina, telecomunicaciones, agricultura y alimentación, siendo su fabricación parte esencial de la economía. El conocimiento de las propiedades físicas y químicas de los polímeros es un requisito indispensable para posteriormente su adecuada utilización. Las propiedades de los polímeros son los responsables de su utilización.

- **Densidad**

La densidad de un polímero es el cociente entre la masa del polímero con respecto al volumen que ocupa, el rango de densidad que existe en los polímeros son muy bajos, y esto se debe porque los átomos que componen las cadenas poliméricas son livianos y las distancias de los átomos de los polímeros son muy grandes (Meneses & Corrales, 2007).

- **Solubilidad**

El ensayo de solubilidad de los polímeros es importante al momento de especificar su resistencia a diversos ambientes, por su empleo en tuberías, maquinaria, recipientes de almacenamiento, adhesivos, etc. Para lo cual se pone en contacto las pequeñas partículas del polímero con el disolvente, que en una fase inicial el disolvente penetra la muestra del polímero hinchándolo y formando un gel, específicamente para el caso de polímeros no reticulados, el proceso sigue hasta formar una verdadera solución en la que se encuentran separadas las macromoléculas. El grado de hinchamiento depende



de la interacción con el disolvente y del grado de reticulación del polímero (González & Prolongo, 1997).

- **Caracterización química de los polímeros mediante espectroscopia infrarroja.**

El análisis infrarrojo es una técnica espectroscópica de un extenso uso, el mismo que se basa en la excitación de las moléculas por la absorción de la radiación infrarroja. Comprende longitudes de onda entre el visible y el microondas, la zona de infrarrojo medio está comprendido entre 4000 y 300 cm^{-1} que es la zona más empleada desde el punto de vista práctico. Durante la excitación es preciso una variación del momento bipolar de la molécula en cuestión para que se lleve a cabo una absorción en el infrarrojo que puede aliarse a vibraciones de deformación o de tensión. La detección de grupos funcionales, es la aplicación más importante de este ensayo con la finalidad de reconocer un material, debido a que cada enlace tiene una longitud de onda específica en la región infrarroja. El espectro de absorción de una molécula en estudio es específico de un compuesto. La intensidad de la longitud de onda está relacionada con la concentración de la sustancia que absorbe la radiación incidente (Gladys Ruiz Avilés, 2005).

2.9 Propiedades térmicas de los polímeros

Las propiedades térmicas nos permiten determinar el comportamiento térmico del biopolímero en función del tiempo y la temperatura, en el estudio de materiales poliméricos las técnicas más usadas para determinar las propiedades térmicas es: calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Ruiz Avilés, 2005).

- **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC por sus siglas en inglés) es una técnica en el cual mide las transiciones de fase en polímeros, este trabaja con muestras muy pequeñas porque la transmisión de calor es muy rápida, el equipo proporciona un flujo de calor a velocidad constante a las capsulas en donde se encuentra el polímero. Este equipo tiene dos quemadores individuales y un controlador en el cual se monitorea la temperatura y también se regula el flujo el calor, tal como se muestra en la ilustración 10. En cada quemador se coloca una capsula las cuales son cerradas herméticamente en la primera capsula contiene la muestra de polímeros y en la otra se coloca vacía

como referencia, estas se calientan a una misma velocidad las cuales se controlan desde una computadora, al calentarse las capsulas se muestra la cantidad de energía que necesita la capsula que contiene el polímero con respecto a la capsula vacía, esta cantidad de energía mide el DSC y nos muestra el resultado a través de una gráfica del flujo de calor vs temperatura (Coello & Garcés, 2012).

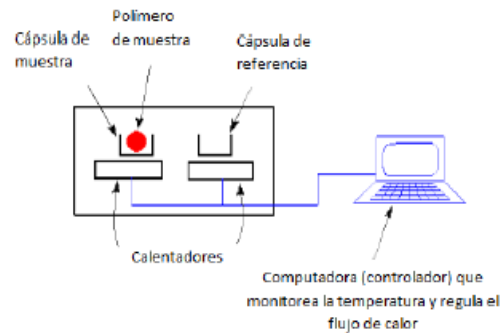


Ilustración 10. Funcionamiento del DSC

Fuente:(Coello & Garcés, 2012)

El termograma, tal como se visualiza en la ilustración 11, que nos da DSC está dado por el flujo de calor con respecto a la temperatura en donde los cristales se forman al calentarse y luego se funden a temperaturas más elevadas, donde primero encontramos la temperatura de transición vítrea, para luego pasar a una temperatura de cristalización y por ultimo a una temperatura de fusión (Aguilar, 2017)

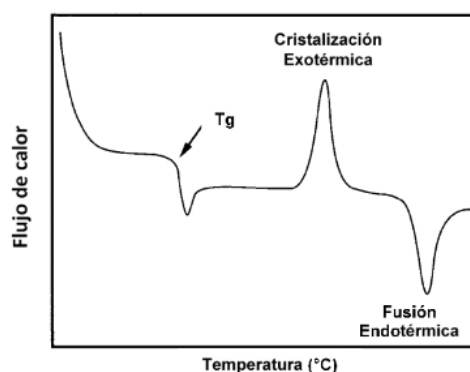


Ilustración 11. Termograma del DSC

Fuente: (Aguilar, 2017)

- **Temperatura de transición vítrea (T_g)**

La transición vítrea es el cambio entre el estado vítreo y el estado gomoso en un material amorfo, la temperatura en que existe el cambio de estado se lo conoce como temperatura de transición vítrea y esta va a depender de la humedad, del peso molecular del polímero, de la velocidad de calentamiento y de enfriamiento y del porcentaje de sólidos presentes en el polímero, este cambio de temperatura se puede determinar en el DSC el cual nos muestra en el termograma, que se puede apreciar en la ilustración 12, el flujo de calor vs la temperatura, en donde al aumentar el flujo de calor, va aumentar la capacidad calorífica del polímero aumente también (Coello & Garcés, 2012).

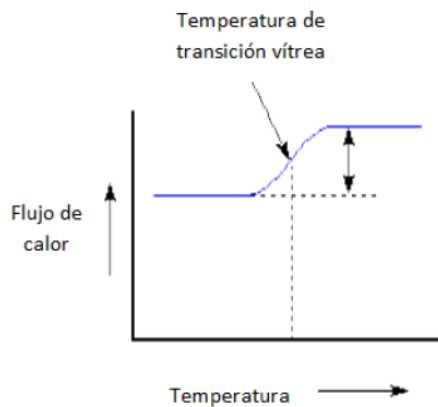


Ilustración 12. Temperatura de transición vítrea

Fuente: (Coello & Garcés, 2012)



3 METODOLOGIA

Las plantas incluidas en el presente estudio se compraron en mercados locales de la ciudad de Cuenca, Ecuador. Se seleccionaron partes aéreas frescas de *Apium graveolens* (apio), hojas desecadas de *Laurus nobilis* (laurel) y partes aéreas y semillas, desecadas y pulverizadas de *Thymus vulgaris* (tomillo). El material fue trasladado al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Cuenca (Campus Balzay). Se partió con una cantidad de 2684.79 g de apio los cuales se obtuvieron de 5 lotes, el tomillo utilizado fue de 389.71 g el cual se tomó de 1 lote y el laurel con una cantidad de 145.15 g del que se obtuvo también de 1 lote. Cabe recalcar que estas fueron seleccionadas ya que son nativas de nuestro país, son asequibles y además el aceite esencial de estas plantas poseen propiedades antibacterianas según estudios realizados.

El volumen de aceite esencial obtenido de apio, tomillo y laurel fue de 400, 600 y 1400 μ L respectivamente. Además la cantidad de films que se obtuvo fue de 10 los cuales se sintetizaron con almidón de yuca y quitosano estos tenían una forma ovalada con un radio aproximado de 9 cm.

Los reactivos utilizados en este estudio se muestran en la tabla 5:

Tabla 5. Reactivos

Reactivo	Pureza
Quitosano	-
Almidón de yuca	-
Ácido láctico	90%
Glicerina	85%
MTT	-
Agar nutritivo	-
Agua de peptona	-

- **Diagrama de flujo de la metodología empleada**

En la ilustración 13 se muestra un resumen de los ensayos realizados en el presente estudio:

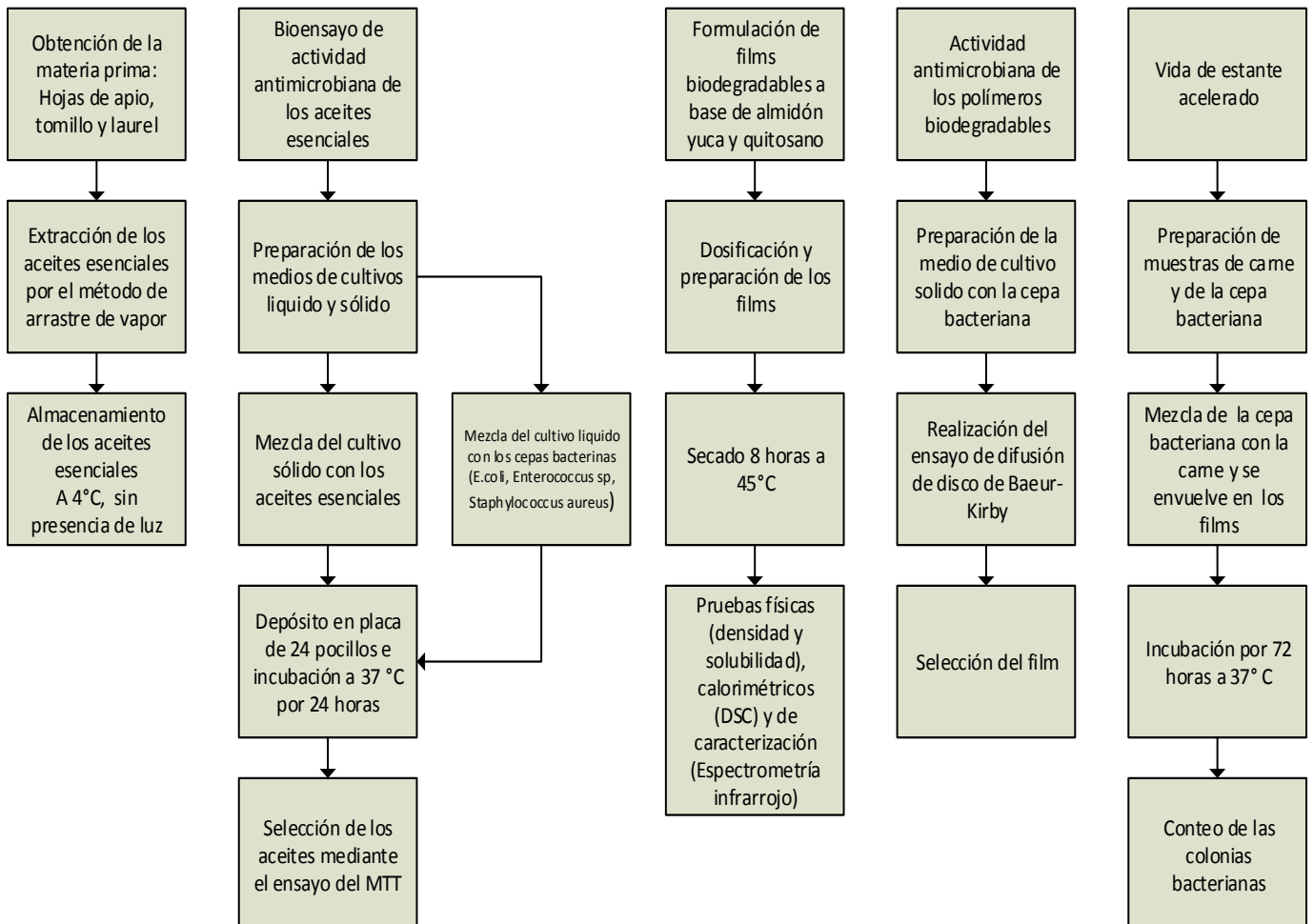


Ilustración 13. Diagrama resumen de la metodología

3.1 Extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor

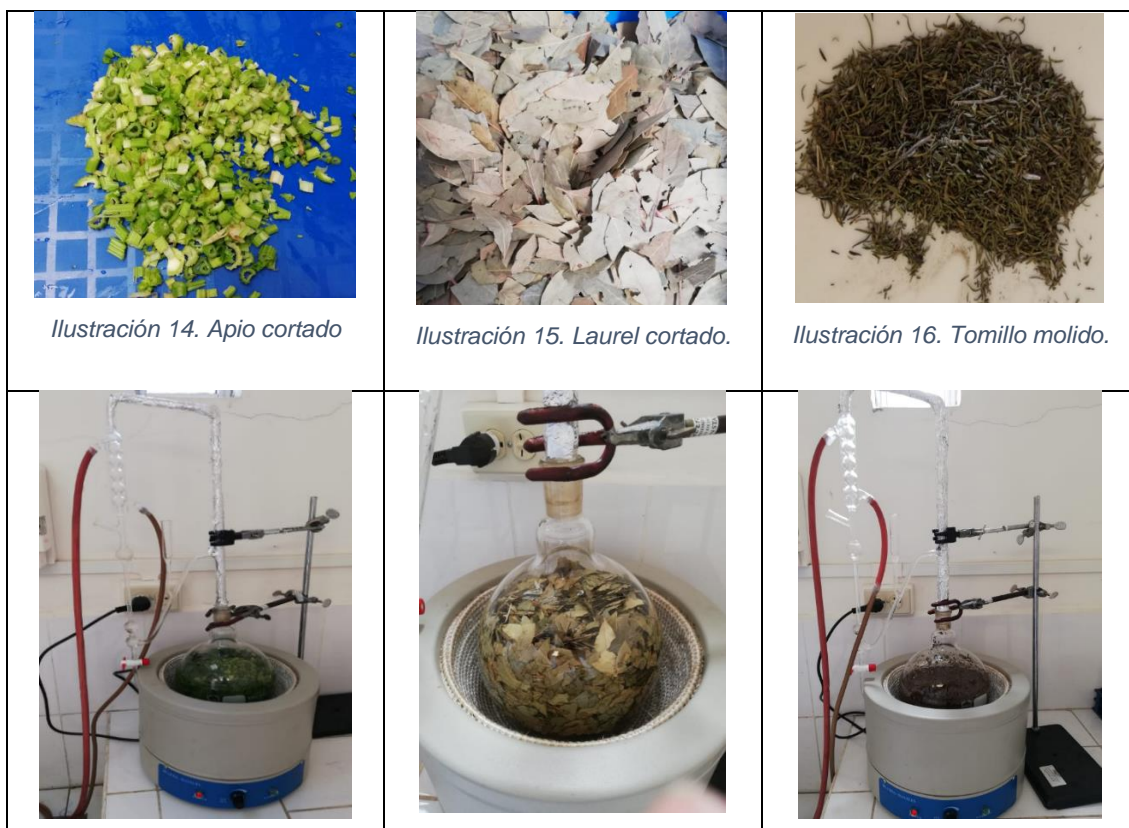
Los aceites esenciales de las plantas en estudio fueron obtenidos por una extracción por arrastre de vapor en un balón de Clevenger a escala de laboratorio. Previo a la extracción, el material vegetal fue seleccionado con el fin de eliminar hojas con signos de pudrición e impurezas.


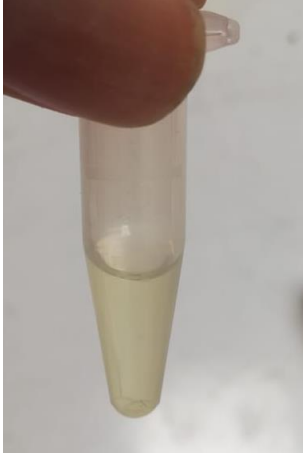

La materia prima fue cargada en el balón de extracción de manera que forme un lecho compacto. Para el efecto las partes aéreas fueron molidas o cortadas, dependiendo de la naturaleza del material vegetal. La generación de calor fue interna, es decir, en la base del recipiente por una manta calefactora. A medida que se va calentando el lecho, la materia prima se calienta y comienza a liberar el aceite esencial que debido a su

volatilidad se va evaporando. El vapor que contiene al aceite esencial fue arrastrado hacia la parte superior del balón de extracción, esta mezcla fluyó hacia un condensador, mediante una prolongación curvada del conducto de salida del equipo. En el condensador la mezcla fue enfriada a temperatura ambiente. La mezcla obtenida fue una emulsión líquida inestable. El proceso termina cuando el volumen de aceite esencial acumulado en el decantador dinámico no varíe con el tiempo. Una vez finalizado la extracción el aceite esencial se recolectó en tubos eppendorf y se lo almacenó en refrigeración a 4 °C (Günther, 1948).

La mezcla obtenida, fue separada con una centrifuga de marca PRISM HIDROCENTRIFUGE, ya que el aceite esencial es poco miscible. A continuación, se ajusta el tiempo de centrifugado de 5 minutos y el número de revoluciones por minuto fue de 5000. Posteriormente, se recolectó el aceite esencial, que queda en la capa superior, y se almacenó en tubos eppendorf recubiertos con papel aluminio y en refrigeración a 4 °C. Tal como se muestra a continuación en la tabla 6.

Tabla 6. Proceso y obtención de los aceites esenciales



<i>Ilustración 17. Balón de extracción cargado con la materia prima.</i>	<i>Ilustración 18. Balón de extracción cargado con la materia prima.</i>	<i>Ilustración 19. Balón de extracción cargado con materia prima.</i>
		
<i>Ilustración 20. Aceite esencial de apio</i>	<i>Ilustración 21. Aceite esencial de laurel</i>	<i>Ilustración 22. Aceite esencial de tomillo</i>

3.2 Repique de cepas bacterianas

Los repiques se hacen con el fin de mantener viables a los microorganismos que ya se tienen cultivando en el laboratorio. Para el trasplante, se toma una pequeña masa microbiana del cultivo previo (o cultivo viejo) y se coloca en un medio de cultivo fresco (o medio virgen). El cultivo viejo generalmente corresponde a un cultivo puro (cepa), que es una población microbiana constituida por un solo tipo de microorganismos. Esta población no puede ser mantenida por mucho tiempo en un ambiente cerrado sin renovación de nutrientes ni eliminación de sus productos de desecho; por eso, es mejor sacar unos cuantos microorganismos y llevarlos a un medio de cultivo nuevo para mantener viable la cepa (Peña, 2014).

Este proceso se lo realizó en condiciones estériles utilizando una cabina de seguridad biológica. Con un asa bacteriológica se obtuvo una colonia bacteriana ATCC (American Type Culture Collection) contenida en una caja petri, luego se introdujo el asa bacteriológica en un tubo de ensayo que contenía caldo nutritivo. Posteriormente se incubó durante 24 horas a 37 °C.



3.3 Preparación de medios de cultivo

- **Medio de cultivo líquido para el mantenimiento de bacteriano**

Para la preparación del medio de cultivo líquido se formuló un caldo nutritivo para el crecimiento de bacterias, con la composición siguiente, la cual se presenta a continuación en la tabla 7:

Tabla 7. Composición del medio de cultivo líquido

Componentes	Peso (g) para 100 mL
Peptona	0.5
Extracto de levadura	0.3
NaCl	0.5

Los componentes se pesaron en una balanza analítica y se disolvieron en agua destilada, se agitó con una varilla de vidrio hasta total disolución. Posteriormente el caldo nutritivo se llevó a la autoclave de marca TRIDENT EA- 632 (121 °C y 1.5 atm por 15 minutos). Luego de la esterilización el caldo fue almacenado en refrigeración a 4 °C.

- **Medio de cultivo sólido para el mantenimiento bacteriano**

La composición es igual al del medio de cultivo líquido de la Tabla 6, pero en este se incorpora el agar nutritivo el cual hace que el medio se solidifique. El medio de cultivo sólido tiene la siguiente composición, la cual se presenta a continuación en la tabla 8:

Tabla 8. Cantidad de los compuestos para el medio sólido

Componentes	Peso (g) para 100 mL
Peptona	0.5
Extracto de levadura	0.3
NaCl	0.5
Agar	1.5

Los componentes se pesaron en una balanza analítica y se disolvieron en agua destilada a temperatura de ebullición (92 °C), se agitó con una varilla de vidrio hasta total disolución. Posteriormente el caldo nutritivo se sometió a autoclavado (121 °C y 1.5 atm por 15 minutos). Luego de la esterilización se llevó a la estufa para enfriar la solución

a 40 °C, una vez enfriada la solución fue utilizada para el bioensayo de actividad antibacteriana de los aceites esenciales.

3.4 Bioensayo de actividad antibacteriana de los aceites esenciales

Este bioensayo se lo realizó siguiendo el procedimiento descrito por (Manual GIBEX, 2014). Las bacterias propuestas para este estudio fueron *E. coli*, *S. aureus* y *Enterococcus sp*, porque este tipo de bacterias son comunes en los alimentos y además son las cepas bacterianas de las cuales se disponía en el laboratorio de microbiología. Primero se esterilizó todo el material de plástico a utilizar en el ensayo (puntas de plástico para pipetas, tubos eppendorf). Se utilizó una cabina de seguridad biológica para realizar el bioensayo. Se colocó dentro de la cabina todo el material de plástico, los frascos que contienen el medio de cultivo líquido y el medio sólido, las placas de 24 pocillos, los tubos que contienen los aceites esenciales de apio, tomillo y laurel y tubos de vidrio que contienen las cepas bacterianas, como se observa en la ilustración 22.

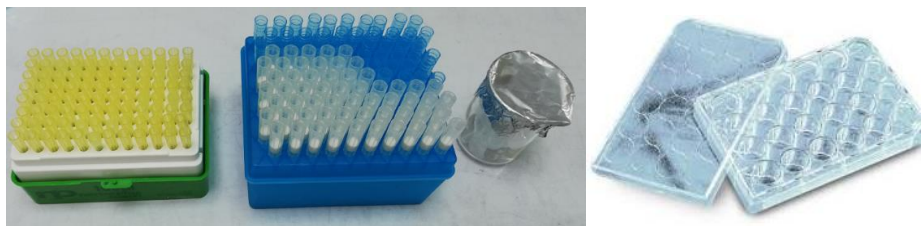


Ilustración 23. Material de plástico y placas de 24 pocillos

Luego el medio de cultivo sólido descrito anteriormente se mezcló con los aceites esenciales cuyos volúmenes se detallan en la tabla 9. Se colocó un volumen de 400 μL en cada pocillo de las placas de 24 pocillos, como se muestra el diseño experimental en la ilustración 23.

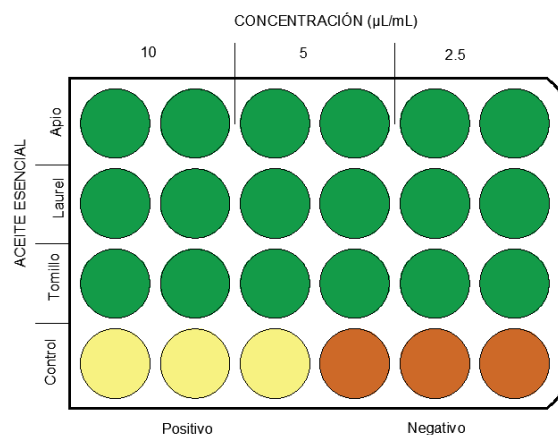


Ilustración 24. Diseño experimental para el ensayo



Tabla 9. Concentración de los aceites esenciales para el ensayo antimicrobiano

Volumen de medio de cultivo sólido (mL)	Concentración del aceite ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Volumen de aceite (μL)
4	10	40
4	5	20
4	2.5	10

El medio de cultivo líquido preparado según lo descrito anteriormente fue inoculado con el repique bacteriano preparado según 3.3 en una relación de 1:10, en cada pocillo se agregó un volumen de 100 μL . Además, se preparó una placa de control con medio de cultivo sin aceite esencial. Todo esto se lo realizó antes de que el medio de cultivo se solidifique.

Una vez realizado todo este procedimiento, las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. Cada recalar que este ensayo se lo hizo por triplicado.

Transcurrido el tiempo de incubación se procederá a realizar el revelado de placas por reacción con MTT para verificar si existe crecimiento bacteriano. Cabe mencionar que al término del ensayo se seleccionaran 2 de los 3 aceites esenciales los cuales presenten una mejor inhibición al crecimiento bacteriano.

- **Ensayo del MTT (Bromuro de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)**

Partimos del compuesto (Bromuro de 3- (4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) más conocido como MTT el cual se preparó siguiendo la relación de 5 mg por cada mL de agua destilada. Una vez preparada la solución de MTT se la guardó en refrigeración a 4 °C.

Para esto se adicionó un volumen de 20 μL de la solución de MTT en cada pocillo y se esperó alrededor de 10 minutos para evidenciar si existe crecimiento bacteriano o no, en caso de dar positivo la solución del pocillo cambiará de color claro a oscuro. En ocasiones el cambio de color se puede observar a los pocos minutos de agregar el MTT, pero para obtener resultados más fiables se puede esperar de 24 hasta 48 horas antes de anotar los resultados.

A continuación, se describe que representa cada cambio de color:

- ✓ Color purpura oscuro: extracto sin actividad antimicrobiana.



- ✓ Color púrpura medio: extracto con actividad antimicrobiana baja.
- ✓ Color púrpura pálido: extracto con actividad antimicrobiana moderada.
- ✓ Color amarillo: extracto con actividad antimicrobiana alta (Manual GIBEX, 2014).

3.5 Formulación de los films

Los films fueron elaborados a partir de almidón de yuca y quitosano. Para la formulación del film de quitosano se siguió lo descrito por (Ojagh, Rezaei, Razavi, & Hosseini, 2010), mientras que para la formulación del film a partir de almidón de yuca se partió de lo mencionado en (During, 2001).

Cabe recalcar que para la formulación de los films biodegradables se adicionó los aceites esenciales de apio y laurel en una concentración del 5% (v/v), el aceite esencial de tomillo no se usó para la formulación de los films debido a su bajo nivel de inhibición bacteriana.

- **Films de almidón de yuca**

Se utilizó almidón de yuca, agar, aceite esencial, glicerina comercial, aceite esencial de apio y laurel y agua, cuya formulación se encuentra detallada a continuación en la tabla 10:

Tabla 10. Componentes del film a base de almidón de yuca

Componentes	Cantidad	% (p/p)
Almidón de yuca	3 g	0.73
Agar	3 g	0.73
Glicerina 1% v/v	360 mL	88.67
Agua	40 mL	9.85

Se empleó 200 μ L de aceite esencial, ya que según el análisis antibacteriano que se realizó se debe utilizar 5 μ L de aceite esencial/1 mL de agua.

Todos los componentes fueron mezclados en un vaso de precipitación a excepción de los aceites esenciales, esta mezcla fue calentada a 140 °C con agitación continua durante 15 minutos, tal como se evidencia en la ilustración 24.



Ilustración 25. Calentamiento de la solución del polímero.

- **Films a base de quitosano**

Para la formulación del film a base quitosano se utilizó glicerina comercial, quitosano, ácido láctico, agua y los aceites esenciales de apio, laurel.

Inicialmente se disolvió 2.4 g de quitosano con una solución de ácido láctico al 1% (v/v) en una concentración de 2% (p/v), con la ayuda de un agitador magnético por un tiempo de 6 horas a una temperatura de 40 °C.

Transcurrido este tiempo se agregó la glicerina al 1% (v/v) en una relación de 0.75 mL glicerina/1 g de quitosano, esto se lo mezcló con agitación continua durante 30 minutos.

- **Sonificación**

Tanto los films de almidón de yuca como de quitosano se los retiró del calor y se los dejó enfriar por alrededor de unos 10 minutos ya que, si se adicionaba el aceite esencial con la mezcla aún caliente este podría degradarse. Transcurrido este tiempo se añadió los 200 μ L de aceite esencial en cada uno de los films, luego se los llevó al sonificador de marca BRANSON 2800 durante 5 minutos, tal como se muestra en la ilustración 25. Para su uso el sonificador debe estar llenado con agua.



Ilustración 26. Sonificación de la solución del film con el aceite esencial.

Una vez terminado la sonificación se procedió a verter las soluciones de cada uno de los films en los recipientes, estos deben tener superficie antiadherente y se expandió la solución del film por todo el envase o gran parte de ella para facilitar el secado, tal como se observa en la ilustración 26. Luego se colocó la muestra en una estufa por 8 horas a una temperatura de 45 °C para eliminar los restos de humedad. Una vez secado los films se los debe almacenar en un lugar seco.



Ilustración 276. Film biodegradable con adición de aceite esencial de apio y laurel.

3.6 Ensayos físicos en los polímeros

Los ensayos físicos que se realizaron fueron el de solubilidad, densidad y espectroscopia infrarroja; se optó por realizar la prueba de solubilidad según lo descrito en (Norma Técnica Colombiana NTC 1027, 2001) porque mediante este ensayo se puede tener la certeza de si el film tiene un porcentaje elevado de solubilidad ya que en pruebas posteriores el film va a estar en contacto con medios acuosos. Cabe recalcar que los films que fueron usados son los de almidón de yuca y quitosano con la adición de aceites esenciales de apio y laurel, para este no se consideró los films adicionados

con aceite esencial de tomillo debido a que no se obtuvieron buenos resultados en el bioensayo de actividad antibacteriana realizado anteriormente.

Para el ensayo de densidad se basó en lo descrito por la norma (ASTM D792, 2007), esto se realizó para no solo saber cuan pesado fue el film, sino que también proporciona valores que permiten caracterizar, y así saber si será funcional para aplicaciones futuras. Vale mencionar que este ensayo se realizó con los films de almidón de yuca sin la adición de aceite esencial de apio y con la adición de aceite esencial de apio, no se realizó este ensayo con el film de almidón de yuca con adición de aceite esencial de laurel ya que en el ensayo de actividad antibacteriana no se obtuvieron buenos resultados por tal razón se optó por hacer este ensayo solo con los films mencionados anteriormente. Cabe recalcar que se descartó los films a base de quitosano ya que al ser 100% solubles en agua iba a presentar dificultades al momento de realizar este ensayo.

- **Determinación de la solubilidad**

Para determinar la solubilidad del film se utilizó agua como agente degradador, el ensayo se lo realizó según lo descrito por (Menese & Corrales, 2007), el cual se tomó una muestra de 50 x 50 mm con un espesor nominal no mayor a 0.25 mm tal como lo describe la norma (Norma Técnica Colombiana NTC 1027, 2001), el cual primero se determinó el peso inicial de la muestra, luego la muestra se lo llevó a una probeta con agua en donde permaneció por 24 horas tal como se muestra en la ilustración 27, transcurrido este tiempo, el agua se desechó y se pesó la muestra nuevamente, por último la muestra se llevó a una estufa en donde permaneció por un tiempo de 2 horas a una temperatura de 50°C, después de ese tiempo se pesó y se calculó el porcentaje de solubilidad de los polímeros.

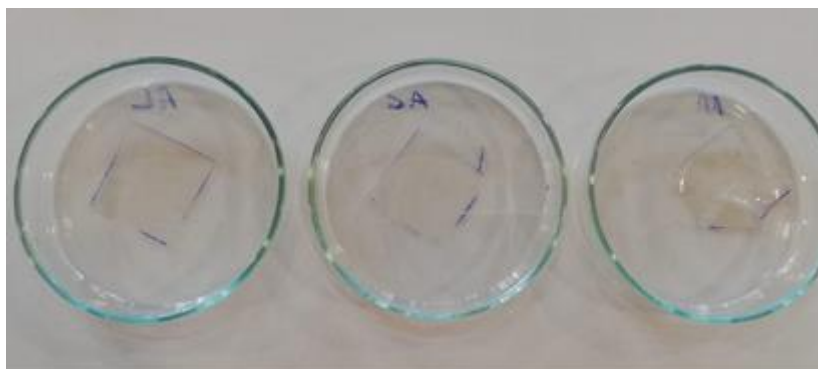


Ilustración 287. Ensayo de solubilidad del polímero biodegradable con almidón de yuca

- **Ensayo de densidad**

El ensayo para la determinación de la densidad del film se basó en un método de la norma ASTM D792, para lo cual se utilizó un picnómetro, la muestra del film biodegradable y agua destilada, los pesos se realizaron a una temperatura de 23 °C. Se siguió el procedimiento siguiente, primero se picó la muestra del film en pedazos pequeños, luego se pesó 1 g de muestra, después se obtuvo los pesos del picnómetro vacío y con agua destilada, y por último se pesó el picnómetro con el agua destilada más la muestra tal como se observa en la ilustración 28, ya con todos los pesos se realizó los cálculos para determinar la densidad del film biodegradable. Cabe mencionar que para este ensayo solo se usó las muestras de films de almidón de yuca con y sin aceite esencial de apio por duplicado.



Ilustración 298. Picnómetro

3.7 Ensayo de caracterización por Espectroscopia Infrarroja

Para este ensayo se usó tanto los films a base de almidón de yuca como de quitosano sin la adición de aceites esenciales y con la adición de aceites esenciales de apio y laurel.

Antes de iniciar con el análisis infrarrojo se seleccionó las muestras que serán sometidas al ensayo, para lo cual se recortó una porción pequeña de los films antes mencionados tal como se observa en la ilustración 29.

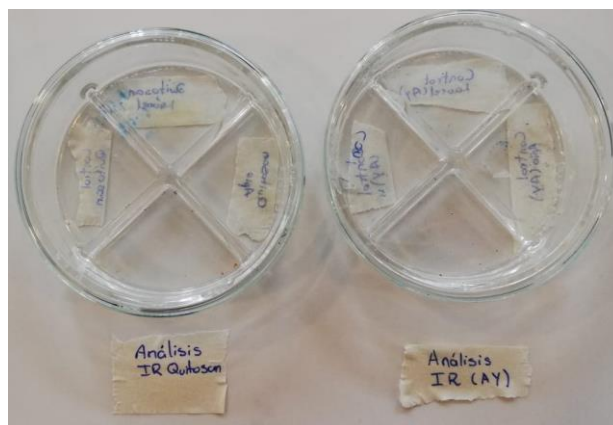


Ilustración 29. Muestras para el ensayo infrarrojo

Para la determinación de los espectros se utilizó el equipo THERMO Scientific como se observa en la ilustración 30, el cual se encendió y se esperó aproximadamente 15 minutos para que esté se estabilice. Una vez estabilizado el equipo, se limpió con alcohol la celda donde va la muestra.

Después de limpiar la celda se colocó la muestra y se comenzó con el análisis. Terminado el análisis se guardó el resultado obtenido. Al final se retiró la muestra y se procedió a limpiar la celda con alcohol para realizar el siguiente análisis con otra muestra diferente.

Terminado todos los análisis asegurarse de limpiar correctamente la celda del equipo con alcohol.

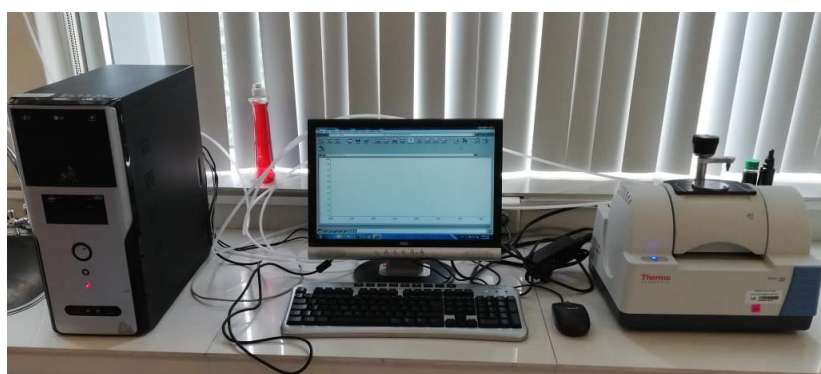


Ilustración 30. Equipo de infrarrojo

3.8 Actividad antibacteriana en los films biodegradables

Este ensayo se basó en el método de Kirby- Bauer según (Picazo, 2000), cabe recalcar que se usó tanto los films a base de almidón de yuca como de quitosano con la adición de aceites esenciales de apio y laurel y sin la adición de los mismos. Vale mencionar que este ensayo de actividad antibacteriana se lo efectuó solamente con la bacteria *E. coli*.

Antes de iniciar el ensayo se cortó discos de 5 mm como se observa a continuación en la ilustración 31.



Ilustración 301. Muestras de film biodegradable en forma de disco

Posteriormente se preparó el agar nutritivo sobre la cual se inoculó la cepa bacteriana. Para la preparación del agar nutritivo se pesó 0.3 g de agar y se disolvió en 300 mL de agua destilada, se agitó y luego se calentó hasta ebullición. Se retiró del calor y se lo depositó en un frasco que se llevó a la autoclave por 15 minutos a 121 °C a 1.5 atmósferas de presión.

Transcurrido este tiempo se retiró el frasco de la autoclave y se lo enfrió a 40 °C aproximadamente para poder inocular la bacteria, ya que si se inocular a una temperatura alta la cepa bacteriana puede morir.

Una vez inoculada la bacteria se procedió a depositar una cierta cantidad de agar en las placas, luego se colocó los discos de muestras de los films sobre el agar nutritivo, tal como se observa en la ilustración 32.

Una vez terminado todo este proceso se selló correctamente las placas y se las incubó en una estufa a 45 °C por 24 horas.

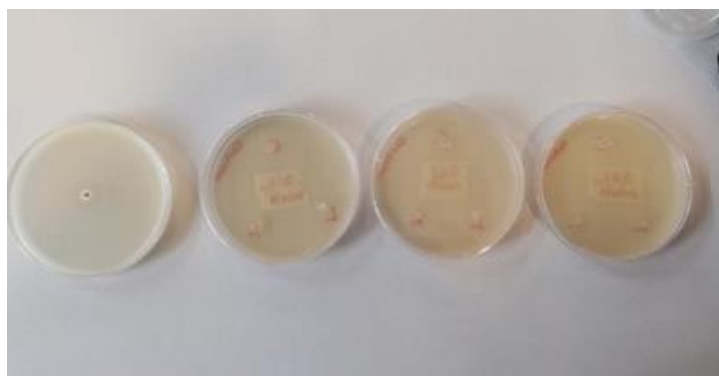


Ilustración 312. Colocación de las muestras en agar nutritivo

3.9 Propiedad térmica de los films.

- **Calorimetría de barrido diferencial (DSC)**

Para este ensayo se usó el film a base de almidón de yuca con la adición de aceite esencial de apio ya que con este fue que se obtuvo los mejores resultados en el ensayo de actividad antibacteriana realizado anteriormente, y adicionalmente se realizó el DSC del almidón de yuca.

Se utilizó el equipo METTLER TOLEDO del laboratorio de humidificación tal como se observa en la ilustración 33, el equipo se encendió y se esperó unos minutos a que se estabilice, posteriormente se programó en la computadora la rampa de temperatura a la cual se llevó a cabo el ensayo.

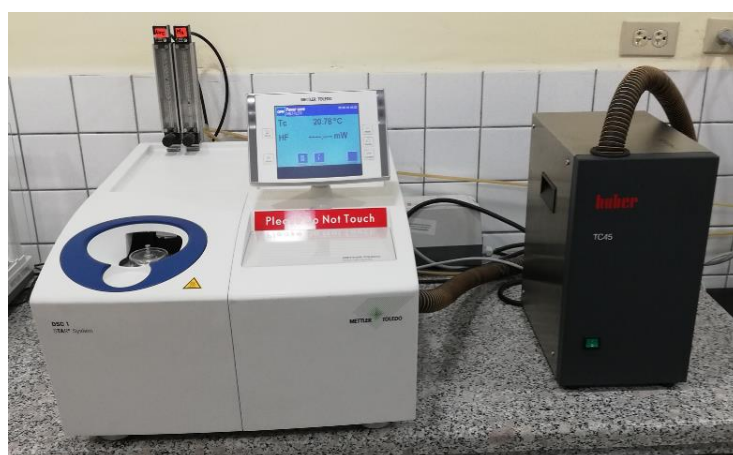


Ilustración 323. Equipo de DSC

Se pesó 10 mg de muestra del film a base de almidón de yuca con adición de aceite esencial de apio. Se colocó en un crisol de aluminio el cual una vez depositada la muestra se lo selló correctamente con la ayuda de una prensa para evitar que la muestra se derrame como se observa en la ilustración 34. Luego se colocó el crisol de aluminio

en el equipo y se procedió con el ensayo como se aprecia en la ilustración 35, para este caso en específico el tiempo aproximado que duró el experimento fue de 78 minutos.



Ilustración 334. Prensa para sellar el crisol



Ilustración 345. Colocación de la muestra en el equipo

La rampa de temperatura comenzó con un borrado térmico el cual se lo hace calentando entre 25 y 200°C, en atmósfera de nitrógeno, a una velocidad de 20°C/min. Luego se enfrió entre 200 y -40°C, a una velocidad de 20°C/min. Por último se calentó entre -40 y 200°C, a 10°C/min. , para determinar la temperatura de transición vítrea (Ruiz Avilés, 2005).

Se obtuvo también el DSC del almidón de yuca, para lo cual se realizó el mismo procedimiento anteriormente descrito.

3.10 Ensayo de vida de estante acelerado.

Para este ensayo se utilizó carne de res debido a que su degradación es rápida y es susceptible de sufrir alteraciones tanto físicas, químicas y microbianas y además es un medio adecuado para el crecimiento y desarrollo de bacterias. Cabe mencionar que se usó la bacteria *E. coli*, y el film utilizado fue el de almidón de yuca con la adición de aceite esencial de apio, no se realizó con el film de quitosano porque al tener una

solubilidad alta probablemente se iba a disolver al contacto con la carne de res por el gran contenido de humedad que tiene. Este ensayo se lo realizó por duplicado.

Para este ensayo se utilizó 3 tipos de films: el film comercial de marca Flexiplast el cual está hecho con una mezcla de polietileno y polipropileno, el segundo film fue el de almidón de yuca más aceite de apio y el tercer film el de almidón de yuca sin aceite esencial.

Este ensayo se realizó siguiendo la metodología descrita por (Altamirano, 2013) para lo cual se cortó 6 pedazos de carne de res de aproximadamente 1 g cada porción tal como se observa en la ilustración 36. Además, se preparó la solución de agar nutritivo que es el medio de cultivo en el cual se va a realizar el ensayo.

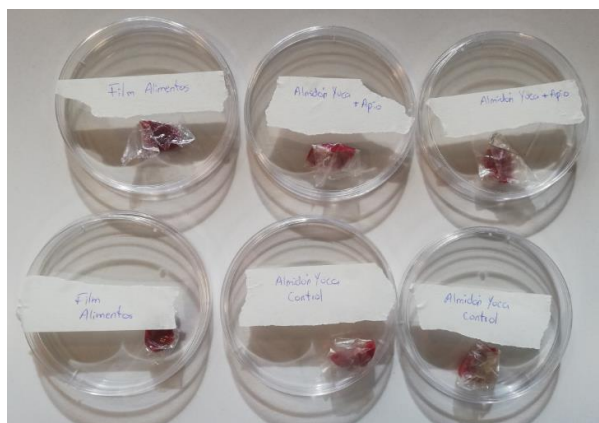


Ilustración 356. Muestras de carne envueltas con polímeros

Una vez cortadas las 6 porciones de carne de res se inoculó la bacteria en cada una de los pedazos, posteriormente se cubrió cada pedazo de carne de res con los films antes mencionados y se los colocó dentro de una caja petri, y se las incubó por 72 horas a 37 °C en una estufa.

Antes de retirar las cajas petri de la estufa se debe tener preparada el agua peptonada, ya que esta ayudará a que el conteo de las colonias de bacterias sea más sencillo, se debe colocar 10 mL de agua peptonada en cada tubo de ensayo.

Se retiró las cajas petri de la estufa y se quitó la envoltura que contenía las porciones de carne, luego se colocó los pedazos de carne en los distintos tubos de ensayo y agitamos durante un 1 minuto con la ayuda de vortex como se observa a continuación en la ilustración 37.



Ilustración 367. Vortexeado de la muestra

Luego del agitado se colocó el contenido líquido de los tubos de ensayo sobre una placa petri que contenía la solución de agar nutritivo y sellamos correctamente cada una de las cajas con su respectiva identificación, a continuación, se observa en la ilustración 38.

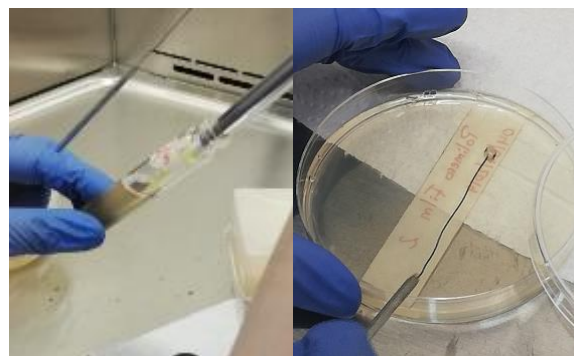


Ilustración 38. Colocación del cultivo bacteriano y esparcimiento en la placa con agar nutritivo

Una vez selladas las cajas correctamente se las depositó en una estufa a 37 °C por 24 horas para su incubación. Transcurrido este tiempo se retiró las cajas de la estufa y se contó las colonias de bacterias formadas y se anotó los resultados obtenidos.

4 RESULTADOS

4.1 Rendimiento de los aceites esenciales

Para calcular el rendimiento de los aceites esenciales se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \frac{\text{Volumen (ml)}}{\text{Peso (g)}} * 100$$

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 11:

Tabla 11. Rendimiento de los aceites esenciales

Especie	Estado de la materia prima	Volumen (ml)	Peso (g)	Rendimiento (%)
Apio	Fresco	0.41	4479.29	0.009
Laurel	Seco	1.4	145.15	0.96
Tomillo	Seco	0.6	389.71	0.15

4.2 Actividad antimicrobiana en los aceites esenciales

- **Control positivo de crecimiento**

Para el ensayo se realizó controles positivos, en los cuales la bacteria creció en el medio de cultivo sin adicionar aceites esenciales. Después de 24 horas de incubación, el revelado con MTT evidenció que existió crecimiento bacteriano, por el cambio de color de amarillo a púrpura, Ilustración 39. Los controles negativos consistieron en pocillos con el medio de cultivo sin inóculo bacteriano, los cuales no reaccionaron ante el revelado con MTT. Este control evidencia las condiciones de esterilidad del ensayo.

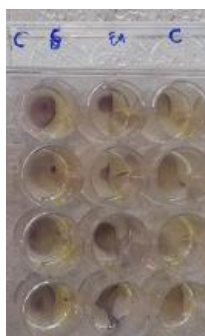


Ilustración 39. Observación del crecimiento microbiano en controles positivos



- **Actividad antibacteriana de aceites esenciales ante *S. aureus*, *E. coli* y *Enterococcus sp.***

Los resultados del ensayo se presentan a continuación en la tabla 12, se observó que los mejores resultados de inhibición de crecimiento bacteriano se obtuvieron con los aceites esenciales de apio y laurel.

Tabla 12. Actividad antibacteriana de los aceites esenciales.

Aceites esenciales	Dosis (µL/mL)	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Enterococcus sp</i>
Apio	2.5	-	-	-
	5	-	+	-
	10	+	+	-
Laurel	2.5	-	+	-
	5	-	+	-
	10	+	+	-
Tomillo	2.5	+	-	-
	5	-	-	-
	10	-	-	-

4.3 Solubilidad de los films biodegradables

Para calcular la solubilidad de los films biodegradables se utilizó la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de solubilidad} = \left(\frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \right) * 100$$

Con los pesos obtenidos en el ensayo se calculó el porcentaje de solubilidad de los films a partir de quitosano y de almidón de yuca, que se muestra a continuación en la tabla 13 y 14 respectivamente:

Tabla 133. Solubilidad del film biodegradable de quitosano con aceites esenciales

Film Biodegradable	Peso inicial (g)	Peso con agua (g)	Peso final (g)	% Solubilidad
Control	0.0552	-	-	100
Laurel	0.0688	-	-	100
Apio	0.0708	-	-	100



Tabla 144. Solubilidad del film biodegradable con almidón de yuca con aceites esenciales

Film Biodegradable	Peso inicial (g)	Peso con agua (g)	Peso final (g)	% Solubilidad	Incremento de masa
Control	0.0404	0.2598	0.0219	45.79	84.45
Laurel	0.0653	0.296	0.0289	55.74	77.94
Apio	0.0988	0.3789	0.0325	67.11	73.92

4.4 Densidad de los films biodegradables

Para la determinación de la densidad del film biodegradable se realizó el método del picnómetro descrita en la norma ASTM D792, el cual se realizó en dos muestras diferentes, una muestra de polímero biodegradable con aceite esencial de apio y otra muestra sin aceite esencial de apio, los resultados obtenidos son los siguientes que se muestran a continuación en las tablas 15 y 16 respectivamente. Para determinar la densidad de los films antes mencionados se usó la fórmula descrita en la norma la cual se muestra a continuación:

$$Densidad = \left(\frac{b - e}{w - e} \right)$$

donde:

e= peso del picnómetro vacío

w= peso del picnómetro con agua destilada

b= peso del picnómetro con agua destilada más la muestra

Tabla 155. Densidad del film biodegradable de almidón de yuca con aceite esencial de apio

Muestra apio	Peso picnómetro vacío (g)	Peso con agua destilada (g)	Peso con agua destilada y muestra(g)	Densidad (g/cm ³)
1	10.1183	15.3011	16.3031	1.1933
2	10.1183	15.3061	16.3001	1.1916
			Promedio	1.1925

Tabla 166. Densidad del film biodegradable de almidón de yuca

Muestra sin apio	Peso picnómetro vacío (g)	Peso con agua destilada (g)	Peso con agua destilada y muestra(g)	Densidad (g/cm ³)
1	10.1183	15.3011	16.3591	1.2041
2	10.1183	15.3061	16.3361	1.1985
Promedio				1.2013

4.5 Caracterización de films por Espectroscopia Infrarroja

El análisis infrarrojo nos permite identificar los grupos funcionales de compuestos orgánicos que existen en la estructura del film biodegradable. Los espectros obtenidos en la región del infrarrojo se presentan a continuación en las ilustraciones 40, 41, 42, 43, 44 y 45:

- Film a base de quitosano

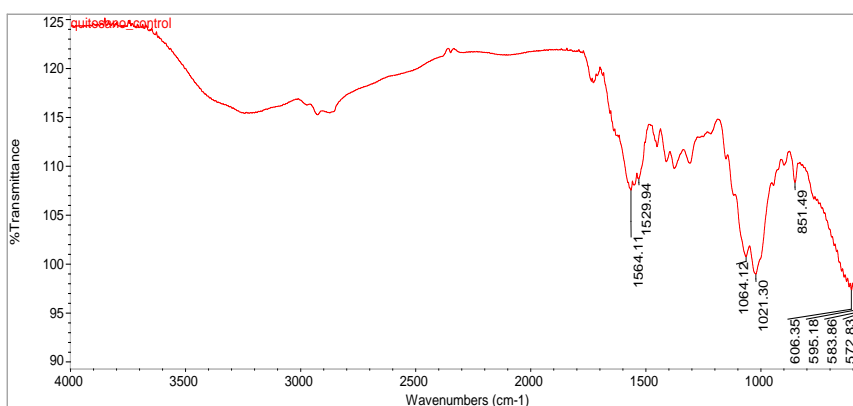
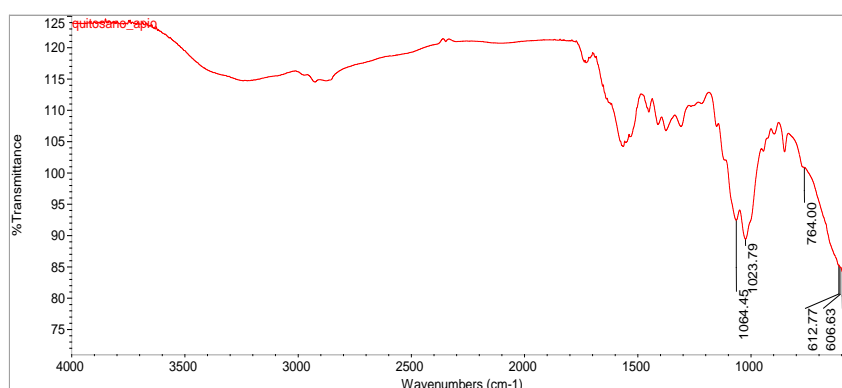


Ilustración 40. Espectro del film biodegradable a base de quitosano

- Film a base de quitosano con adición de aceite esencial de apio



- Film a base de quitosano con adición de aceite esencial de laurel

Ilustración 41. Espectro del film biodegradable a base de quitosano con adición de aceite esencial de apio.

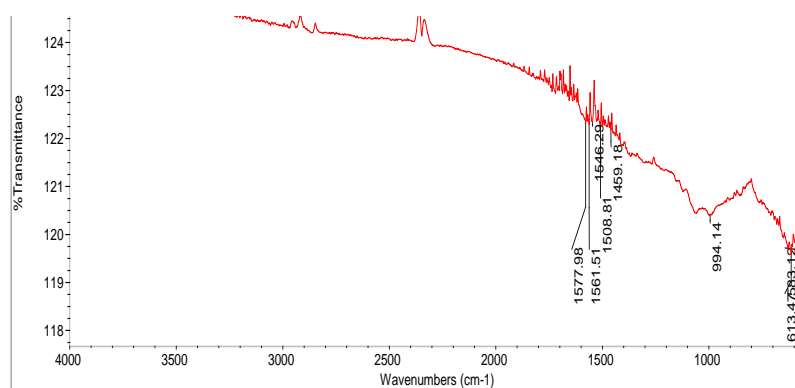


Ilustración 42. Espectro del film biodegradable a base de quitosano con aceite esencial de laurel

A continuación, en la tabla 17 se muestran probablemente los grupos funcionales presentes en los espectros anteriormente ilustrados:

Tabla 177. Grupos funcionales de los espectros de los films de quitosano.

Grupo funcional	Longitud de onda (cm ⁻¹)
Alquilo	1485- 1415
Alquilo con sustituyente hidroxilo o amino	1470- 1365
-OH o -NH-	1200- 950
Alcohol alifático	1205- 885
	1480- 1405
	1075- 1000
Amina alifática primaria	1690- 1635
	1430- 1385
	1160- 1080

Fuente: (Vanegas, 2014).

- Film a base de almidón de yuca

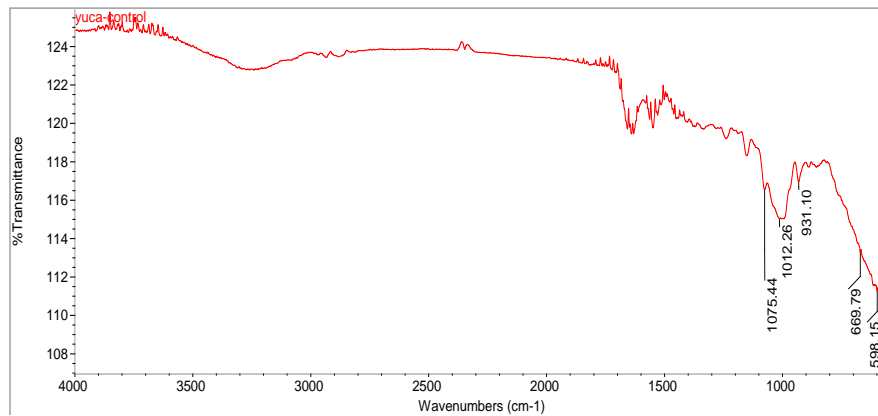


Ilustración 43. Espectro del film biodegradable a base de almidón de yuca.

- Film a base de almidón de yuca con adición de aceite esencial de apio

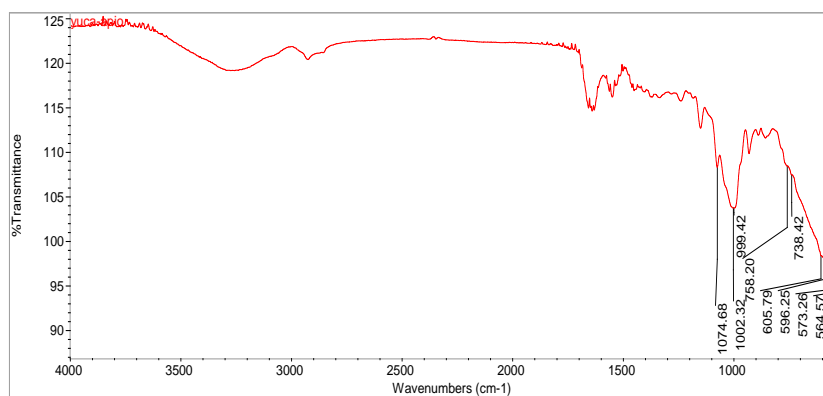


Ilustración 44. Espectro del film biodegradable de almidón de yuca con aceite esencial de yuca

- Film a base de almidón de yuca con adición de aceite esencial de laurel

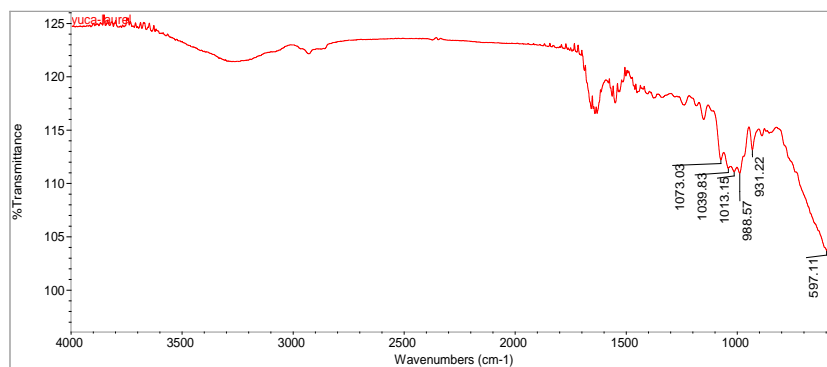


Ilustración 45. Espectro del film biodegradable con almidón de yuca con aceite Esencial de laurel

A continuación, en la tabla 18 se presentan los grupos funcionales que podrían estar presentes en los espectros mostrados anteriormente:

Tabla 18. Grupos funcionales de los espectros de los films de almidón de yuca.

Grupo funcional	Longitud de onda (cm ⁻¹)
Ácido carboxílico: Estiramiento del grupo C-O	1100- 1000
Éteres: vibración del C-O	
Alcanos: vibraciones de los enlaces C-H	2900
Alcoholes	4000- 3500
Hidroxilos libre: estiramiento de los enlaces OH	3500- 3300
Fenoles	3600

Fuente: (Almario & Durango, 2018).

4.6 Análisis antimicrobiano en los films biodegradables

De todas las muestras de los films analizados, aquel que inhibió el crecimiento de la bacteria *E. coli* fue el formulado con aceite esencial de apio, el cual formo un halo cuyo diámetro fue de 14 mm. El control positivo de ampicilina generó un halo de inhibición cuyo diámetro fue de 18 mm, tal como se muestra en la ilustración 46. El resultado de este ensayo indica que el film de almidón de yuca enriquecido con aceite de apio, presenta una actividad antibacteriana moderada ante la bacteria propuesta.

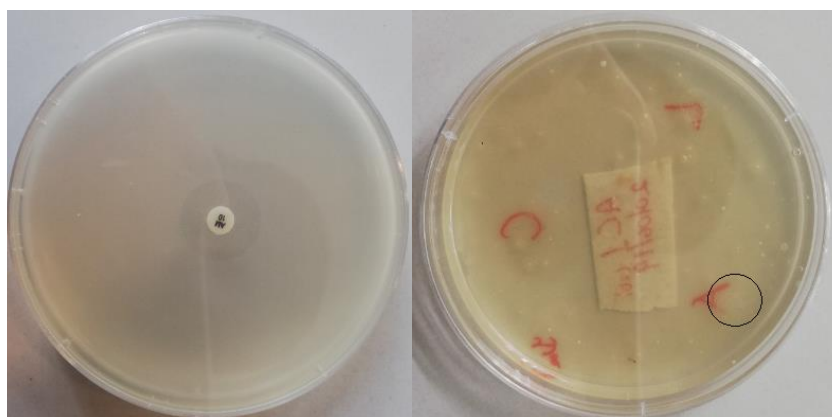


Ilustración 46. Muestra con ampicilina y muestra del film de almidón de yuca

4.7 Ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se obtuvo un termograma del almidón de yuca donde se pudo observar un fenómeno endotérmico tal como se muestra en la ilustración 47.

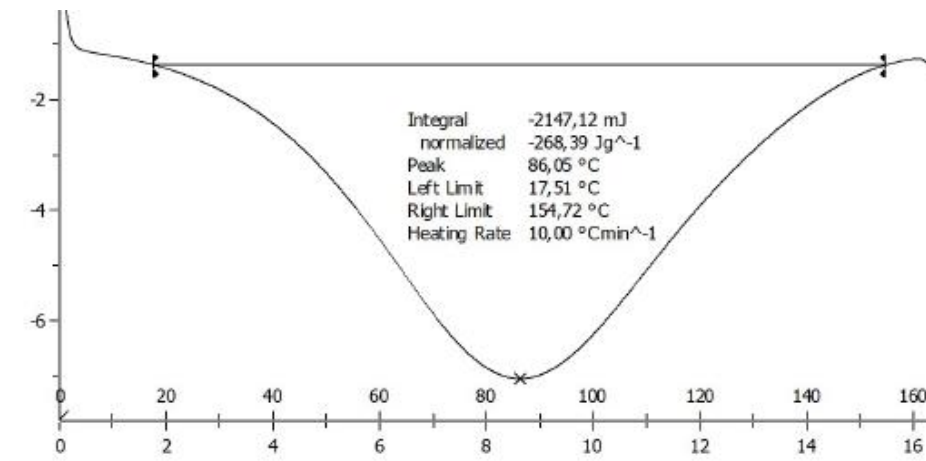


Ilustración 377. Termograma de almidón de yuca

El termograma que nos dio el film biodegradable de almidón de yuca con la adicción de aceite esencial de apio es la ilustración 48, en donde se puede observar la temperatura de fundición del material, pero no se puede observar la temperatura de transición vítrea.

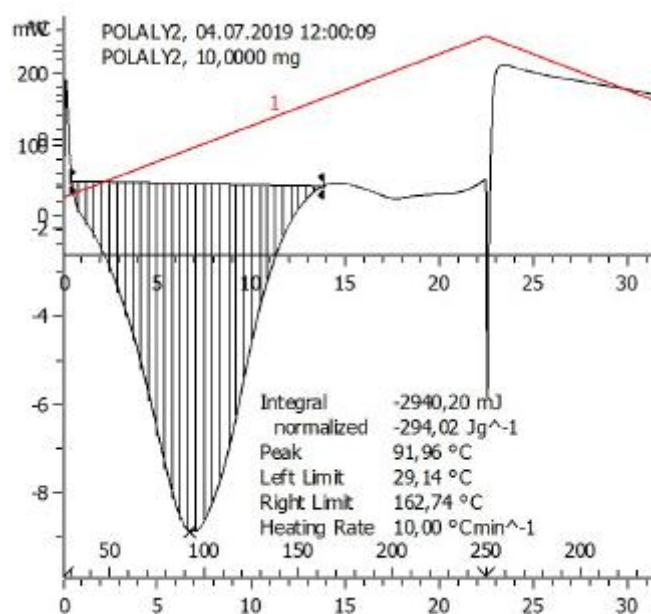


Ilustración 388 Termograma del film

4.8 Vida de estante acelerado

Después de las 24 horas de incubación se procedió a contar el número de colonias bacterianas presentes en cada una de las muestras. Con las muestras envueltas con el film comercial Flexiplast se evidenció que hubo un crecimiento bacteriano el cual no se pudo contabilizar debido a que el número de colonias que se desarrollaron fueron incontables como se observa en la ilustración 49, en cambio con las muestras del film a base de almidón de yuca con aceite esencial de apio hubo un menor crecimiento bacteriano en donde sí se pudo contar las colonias bacterianas presentes tal como se visualiza en la ilustración 50, además se realizaron muestras de control con el film de almidón de yuca sin adición de aceite esencial como se observa en la ilustración 51.

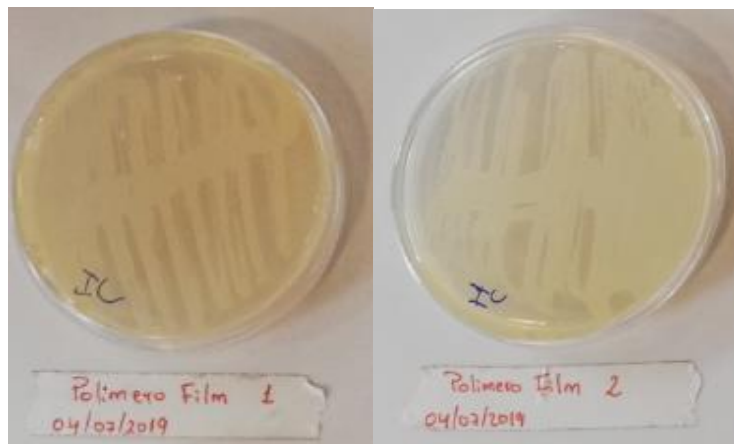


Ilustración 399. Crecimiento bacteriano en la muestra del film comercial

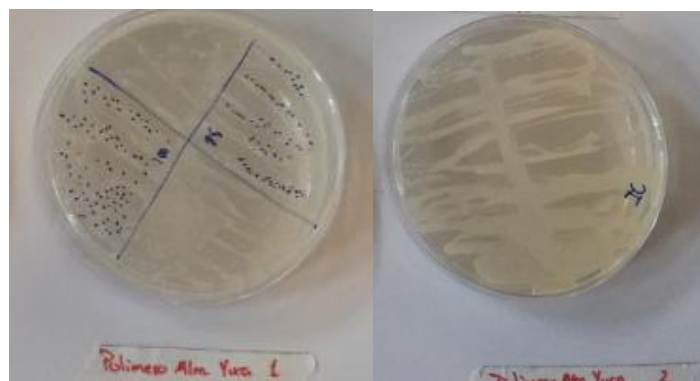


Ilustración 50. Crecimiento bacteriano en la muestra del film biodegradable con almidón de yuca

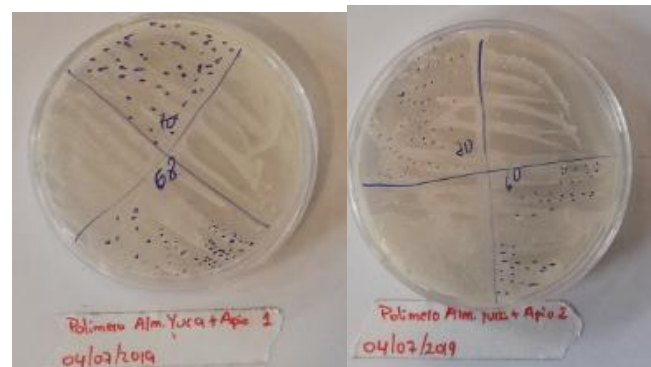


Ilustración 51. Crecimiento bacteriano en la muestra del film biodegradable con almidón de yuca y aceite esencial de apio

Con el recuento de las colonias bacterianas de las placas del ensayo y de las placas de control se pudo calcular el porcentaje de inhibición el cual se utiliza la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(1 - \frac{\text{Recuento de colonias del ensayo}}{\text{Recuento de colonias desde el control}}\right) * 100$$

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(1 - \frac{64.5}{92.5}\right) * 100$$

$$\text{Porcentaje de inhibición} = 30.27\%$$

Se obtuvo un porcentaje de inhibición con el polímero a base de almidón con adición de aceite esencial de apio de 30.27%



5 DISCUSIÓN

5.1 Rendimientos de los aceites esenciales

El rendimiento del apio es muy bajo comparado con el rendimiento obtenido en la investigación (Calderón, Castañeda, & Romero, 2003) el cual fue 0.04%, y en este estudio el rendimiento obtenido fue de 0.009%, esto se debe a que varía las condiciones de trabajo, la especie de apio es diferente, y además el proceso de extracción por arrastre de vapor suele tener rendimiento bajos.

El porcentaje de rendimiento consultado para la extracción de aceite esencial de tomillo fueron inferiores a los proporcionados por (Morales Castro, 2015) que obtuvo un rendimiento de 0.6% y en este estudio fue de 0.15%, esto se debe a las condiciones ambientales en las que se desarrolla este cultivo en nuestro país, a las diferentes condiciones de trabajo, y cabe mencionar que con el proceso de extracción por arrastre de vapor se suele tener rendimientos bajos.

Se obtuvo un rendimiento del 0.96% de extracción del aceite esencial de laurel siendo este superior al reportado por (Andreatta, Longo, Utrera, Saavedra, & Foco, 2012) los cuales obtuvieron un rendimiento del 0.39%, esto pudo ser por la especie de laurel y a las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo en nuestro país y por las condiciones de trabajo.

De manera general se obtuvo poca cantidad de aceite esencial de las especies antes mencionadas debido a que el método de extracción empleado tiene rendimiento bajo y requiere mucho tiempo de extracción. Cabe mencionar que el equipo de extracción utilizado fue el único equipo del que se disponía en el laboratorio.

5.2 Análisis antimicrobiano de los aceites esenciales

Como consecuencia de los ensayos realizados en el laboratorio con tres tipos diferentes de aceites esenciales y con tres cepas distintas de bacterias se describe lo siguiente:

Se destacó la eficacia en cuanto a inhibición bacteriana del aceite esencial de apio al 5 y 10% ante la bacteria *E. coli*, con la concentración de 2.5% se tuvo un control negativo es decir no existió inhibición. El efecto antibacteriano del apio se debe a la alta concentración del agente activo que es el limoneno el cual constituye el 60% del aceite esencial (Altamirano, 2013).



También se obtuvo un control positivo frente a la bacteria *E. coli* con el aceite esencial del laurel a las concentraciones de 2.5, 5 y 10%. Este efecto antibacteriano del laurel se debe a que en su composición del aceite tiene un compuesto activo que el cineol el cual se encuentra en una concentración del 30 al 60% (Beatriz Santiago Pinazo, 2015).

En el caso del tomillo no se obtuvieron controles positivos frente a ninguna cepa bacteriana ya que probablemente el compuesto activo que tiene el aceite esencial en este caso el timol que se encuentra en un 31% no tiene la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano para las bacterias propuestas en este estudio (Morales Castro, 2015).

5.3 Análisis de los films biodegradables de quitosano y almidón de yuca

Los films formulados a partir del almidón de yuca y quitosano presentaron características similares al film comercial Flexiplast. Al momento de adicionar el aceite esencial a su formulación se pudo percibir que este proporcionada un olor característico. Se pudo constatar que al adicionar el aceite esencial al film este hace que pierda la humedad más rápidamente. Visualmente el film de almidón de yuca es más translucido con respecto al film de quitosano. Estéticamente el film a base de quitosano es mejor.

Al momento de la formulación del film, el almidón se disuelve más fácilmente que el quitosano, ya que el quitosano necesita de un ácido para su disolución en este estudio se usó el ácido láctico. En cuanto al grosor y a la elasticidad los films de quitosano presentaron un grosor y elasticidad mayor, cabe mencionar que esto se analizó empíricamente.

5.4 Solubilidad de los polímeros biodegradables

Se realizó el ensayo de solubilidad la cual nos indicó la cantidad de material que se desplaza del film a la fase acuosa, para esta prueba se usó una muestra de film de almidón de yuca con aceite esencial de apio, film de almidón de yuca con aceite esencial de laurel y una muestra de film de almidón de yuca sin aceite esencial, donde se pudo observar que el film de almidón de yuca con aceite esencial de apio tuvo un mayor porcentaje de solubilidad.



El porcentaje de solubilidad probablemente va a depender de la estructura del film, ya que a menor organización de las moléculas, el film biodegradable tendrá mayor porcentaje de solubilidad, en este estudio se tuvo una solubilidad del 67% para el film de almidón de yuca con aceite esencial de apio el cual indicó que el film va a ser susceptible a la degradación, porque podría garantizar que el film en un medio acuoso se va a degradar fácilmente (Meneses & Corrales, 2007).

Con respecto al film biodegradable a base de quitosano, este tuvo un porcentaje de solubilidad alta, ya que se solubilizo casi por completo formando un gel, por lo tanto, se dificulto su cuantificación, debido a que el quitosano es una base fuerte que cuenta con grupos aminos primarios con valores de $pK_a = 6.3$, estos causan alteraciones en el estado de las cargas y en las propiedades del quitosano. Cabe mencionar que a pH menores a 6 estas aminas se protonan y se cargan positivamente, haciendo al quitosano un polielectrolito catiónico soluble en agua (González, Valbuena, Celis, Perentena, & Colina, 2015).

5.5 Densidad del polímero biodegradable a base de almidón de yuca

La densidad que se obtuvo de los films probablemente es similar al valor de la densidad de los polímeros de baja densidad porque en su estructura contienen átomos que son muy livianos como el carbono, hidrógeno, oxígeno entre otros, y que la distancia que existe entre cada átomo es muy grande (Meneses & Corrales, 2007).

Los valores obtenidos de densidad para los films de almidón de yuca con y sin adición de aceite esencial de apio fueron de 1.19 y 1.20 g/cm^3 respectivamente, por lo que se podría evidenciar que no existe una gran diferencia entre ambos films, debido a que la cantidad de aceite esencial añadida en la formulación fue mínima por lo que no afecto significativamente en su estructura.

La densidad del film biodegradable de almidón de yuca descrita por (Meneses & Corrales, 2007), fue de 1.27 g/cm^3 , que es un valor cercano al obtenido en este estudio el cual fue de 1.19 g/cm^3 , la diferencia que existe es que en el film formulado en este estudio se añadió aceite esencial.



5.6 Análisis del ensayo del infrarrojo

Con este ensayo se pudo identificar que grupos funcionales componen los films biodegradables de almidón de yuca como el, CH, C=O, OH, C-O, RCOOR los cuales son característicos de los poliésteres. Se pudo evidenciar el estiramiento de los de grupos OH lo cual representa un polímero higroscópico, esa amplitud podría mostrar la presencia de puentes de hidrogeno los cuales son producidos por la incorporación del glicerol y del agua en la formulación del film. (Mendoza & Velilla, 2011).

En el film biodegradable a base de quitosano probablemente se pudo observar longitudes de ondas característicos, en donde presentaron estiramientos de banda en grupos O-H y N-H, que son específicos de las aminas, alcoholes y amidas (Blanquicet & Flores, 2015).

En algunos espectros no se pudo distinguir claramente los grupos funcionales en ciertas longitudes de onda y esto es debido a que se obtuvo una muestra sólida y al momento de inducirle a radiación infrarroja las partículas no tienen tanta libertad de movimiento, haciendo que la radiación no se difracte correctamente produciendo interferencias y esto se refleja en los espectros obtenidos.

5.7 Análisis antimicrobiano en los polímeros biodegradables

Los films biodegradables con propiedades antimicrobianas podrían ser una solución prometedora para el creciente uso de plásticos para el almacenamiento de alimentos. El uso de materiales asequibles para formular el empaque activo podría destacar el potencial de este desarrollo para la industria alimentaria (Meneses & Corrales, 2007).

Los resultados obtenidos permiten evidenciar probablemente la viabilidad de los films biodegradables como empaques activos, los cuales podrían representar una opción factible frente a los empaques que existen en la actualidad los cuales solo nos garantizan que el producto se conserve por un tiempo determinado, mientras que con un empaque activo se mantendrá por un periodo más largo de tiempo.

De todas las muestras analizadas el que formó un halo de inhibición fue el film de almidón de yuca con aceite esencial de apio cuyo diámetro fue de 6 mm, lo que demostró que la adición de aceites esenciales en un film probablemente lo convierte en un empaque activo ante los microorganismos.



Los autores (Abruzzo et al., 2012) nos indican que los films biodegradables a base de quitosano no forman un halo de inhibición sobre la bacteria *S. aureus*, *E.coli*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*. En este estudio ocurrió de manera similar ya que, en los films a base de quitosano dio negativo a la inhibición de microorganismos.

5.8 Análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se obtuvo dos temperaturas de fusión, la primera fue del film de almidón de yuca con aceite esencial de apio y otro se usó el almidón de yuca los cuales fueron de 91.96 °C y 86.05 °C respectivamente, la temperatura de fusión aumento en el primer caso y esto se debe a la mezcla que existe entre al almidón yuca, la glicerina y el agua.

No se pudo observar en el termograma la temperatura de transición vítrea debido a la baja concentración de almidón en la mezcla del film biodegradable, según (Avil & Ruiz, 2005) con un porcentaje del 70% almidón, 12% glicerina, y 16% de agua les dio como resultado una temperatura de transición vítrea de 12.47 a 37 °C, en este estudio el porcentaje de los componentes usados en la formulación fue de 0.74% de almidón, 88.6 glicerina al 1% y 9.8 de agua, en donde se pudo ver que existe una gran diferencia de porcentaje de almidón usado y también se muestra una cantidad mayor de agua lo cual aumenta el volumen libre a las cadenas de almidón. Según (Aichayawanich & Nopharatana, 2010) describe que otro factor importante que afecta la transición vítrea del film es la humedad ya que al tener un contenido de humedad mayor al 40% el equipo no detecta la temperatura transición vítrea, como lo que ocurrió en esta investigación.

5.9 Análisis del ensayo de vida de estante acelerado

El ensayo de vida de estante acelerado con carne de res fresca produjo los resultados esperados ya que existió una inhibición del crecimiento bacteriano del 30%.

El crecimiento de la bacteria de prueba se inhibió debido al efecto antimicrobiano transferido del aceite esencial de apio el cual fue utilizado como conservante. El *E. coli* es una bacteria comúnmente transmitida por los alimentos mal almacenados, debido a su relación con las enfermedades entéricas bacterianas (Crump, Griffin, & Angulo, 2002).

Este film puede ser utilizado como empaque activo para el almacenamiento de alimentos debido al componente activo que tiene el aceite esencial de apio que es limoneno el



cual se demostró que inhibe el crecimiento bacteriano como se evidenció en pruebas realizadas anteriormente.



6 CONCLUSIONES

- Se desarrolló a escala de laboratorio films biodegradables a base de almidón de yuca con efecto antibacteriano al adicionar en su formulación aceites esenciales.
- Se realizó el ensayo microbiológico en los aceites esenciales por el método de Kirby- Bauer obteniendo resultados que posiblemente inhiben el crecimiento bacteriano con los aceites esenciales de apio y laurel en una dosis de 5 y 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$.
- Con el análisis infrarrojo posiblemente se determinó los grupos funcionales característicos de cada uno de los films formulados en esta investigación.
- Con el ensayo de vida de estante acelerado probablemente se obtuvo inhibición del crecimiento bacteriano con el film de almidón de yuca con aceite esencial de apio.
- Con este trabajo de investigación se presenta una alternativa viable que podría solucionar el problema de la contaminación producida por los polímeros sintéticos.



7 RECOMENDACIONES

- Realizar análisis anti fúngicos, para verificar si también tienen la capacidad de inhibir hongos estos films biodegradables con la adición de aceites esenciales.
- Esta investigación es base para futuras líneas de investigación relacionado a la industria alimenticia.



8 BIBLIOGRAFIA

- Abruzzo, A., Bigucci, F., Cerchiara, T., Cruciani, F., Vitali, B., & Luppi, B. (2012). Mucoadhesive chitosan/gelatin films for buccal delivery of propranolol hydrochloride. *Carbohydrate Polymers*, 87(1), 581–588.
<https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2011.08.024>
- Aguilar, M. (2017). *Síntesis de plásticos bio-basados a partir de monómeros bi-funcionales obtenidos de compuestos derivados de ácidos grasos*.
- Aichayawanich, S., & Nopharatana, M. (2010). Agglomeration mechanisms of cassava starch during pneumatic conveying drying. *Carbohydrate Polymers*.
- Almario, A., & Durango, L. (2018). Estudio de las propiedades absorbentes de un biopolímero a base de almidón de yuca. *Espacios*, 39, 15.
- Altamirano, M. (2013). *FABRICACIÓN DE PELÍCULAS BIODEGRADABLES PARA PRODUCTOS CÁRNICOS, A PARTIR DE BIOPOLÍMEROS CON MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES ANTIMICROBIANOS*. Retrieved from <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/3603/1/10285.pdf>
- Andreatta, A., Longo, M., Utrera, C., Saavedra, M., & Foco, G. (2012). *CARACTERIZACIÓN DE ACEITES ESENCIALES DEL DEPARTAMENTO SAN JUSTO (CÓRDOBA)*. Córdoba.
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3(2), 113–126.
[https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(02)00012-7)
- Avella, M., De Vlieger, J. J., Errico, M. E., Fischer, S., Vacca, P., & Volpe, M. G. (2005). Biodegradable starch/clay nanocomposite films for food packaging applications. *Food Chemistry*, 93(3), 467–474.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.10.024>
- Avil, & Ruiz, G. (2005). *Polímeros Biodegradables A Partir Del Almidón De Yuca*. 1.
- Beatriz Santiago Pinazo. (2015). Los aceites esenciales de Laurel (*Laurus nobilis*) y Clavo (*Syzygium aromaticum*) una alternativa frente a *Fusarium sambucinum* aislado del arroz. Retrieved from <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/69106/IRLES> - Efecto de la



concentración de cloruro y amonio de la solución nutritiva sobre el comporta....pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Bentacur Ancona, D. (2008). Ciencia e tecnología de alimentos : publication of the Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. In *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (Vol. 28). SBCTA.
- Betina Tonelli, Sergio Alí, N. S. (2011). *Cátedra Horticultura EL CULTIVO DEL APIO Realizado por*. Retrieved from [http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3353/apio Open.pdf](http://www.innovacion.gob.sv/inventa/attachments/article/3353/apio%20Open.pdf)
- Biomodel. (2006). Ensayo del MTT. Retrieved May 20, 2019, from Test website: <http://biomodel.uah.es/tecnicas/cel/MTT.htm>
- Blanquicet, R., & Flores, C. (2015). Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Polimeros Ciencia y Tecnologia*.
- BOSTON PUBLIC HEALTH COMMISSION. (2019). *E. coli (Escherichia coli) | E. coli | CDC*. Retrieved from <https://www.cdc.gov/ecoli/index.html>
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>
- Calderón, J., Castañeda, J., & Romero, R. (2003). *Caracterización y aprovechamiento del extracto y aceite esencial de apio, para uso farmacéutico, a través de un proceso de destilación a nivel de planta piloto*.
- Canabal, A. (2017). *Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales y de bacterias endófitas extraídas de lippia alba y lippia organoides contra bulkholderia glumae*.
- Carretero Accame, M. E. (n.d.). *Propiedades medicinales del laurel*. Retrieved from <http://www.botanical-online.com/achiote-Bixa-orellana.htm>
- Coello, V., & Garcés, C. (2012). *Análisis de propiedades térmicas durante la gelatinización en tres variedades de arroz INIAP aplicando el DSC*.
- Crump, J. A., Griffin, P. M., & Angulo, F. J. (2002). Bacterial Contamination of Animal Feed and Its Relationship to Human Foodborne Illness. *Clinical Infectious Diseases*, 35(7), 859–865. <https://doi.org/10.1086/342885>



- Cultivo de Apio: Taxonomía y Morfología. (n.d.). Retrieved April 10, 2019, from <http://cultivodeapio.blogspot.com/2013/09/taxonomia-y-morfologia.html>
- Daniel Francisco Arencibia Arrebola, Luis Alfredo Rosario Fernández, D. L. C. S. (2003). Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. In *Retel*. Retrieved from http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003.pdf
- DIANA DEL PILAR GUIZA PÉREZ, & LINA MARÍA RINCÓN PRIETO. (2007). *ESTUDIO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE Minthostachys mollis COMBINADO CON INACTIVACIÓN TÉRMICA, SOBRE CEPAS DE Listeria monocytogenes y Bacillus cereus*. (PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA). Retrieved from <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis101.pdf>
- Dominguez, C., & Munguia, J. (2012). Películas comestibles formuladas con polisacáridos: propiedades y aplicaciones. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 110–121.
- During. (2001). *bioplastics_formulation.pdf*.
- Eduardo, Sandoval-Aldana, A., & Fernández-Quintero, A. (2007). EVALUACIÓN DE LA RETROGRADACIÓN DEL ALMIDÓN EN HARINA DE YUCA PRECOCIDA. In *Revista Colombiana de Química* (Vol. 36). Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Química.
- G. Alma Veronica. (2015). *Obtención de un polímero biodegradable a partir de almidón de maíz*. p. 49.
- González-Prolongo. (1997). *Propiedades químicas y físicas de polímeros INTRODUCCIÓN*. Retrieved from https://ruc.udc.es/dspace/bitstream/handle/2183/9641/CC_32_art_3.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- González, C., Valbuena, A., Celis, B., Perentena, L., & Colina, M. (2015). Degradación oxidativa de quitosano con peróxido de hidrógeno. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 16(1), 43–68.
- Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., & Bourke, P. (2008). The Anti-Microbial Efficacy of Plant Essential Oil Combinations and Interactions with Food Ingredients Recommended



Citation. *International Journal of Food Microbiology*, 124, 91–97.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.028>

Hernández, L., Gonzales, A., Gutiérrez, N., Muñoz, L., & Quintero, A. (2011). Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. In *Revista Mexicana de Ingeniería Química* (Vol. 10).

Retrieved from <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmiq/v10n3/v10n3a11.pdf>

In Food Quality. (2011). Microorganismos y alimentos. *Education and Culture Lifelong Learning Programme*, pp. 1–28. Retrieved from

http://www.epralima.com/infoodquality/materiais_espanhol/Manuais/3.Microorganismos_y_alimentos.pdf

Javier, O. H. (2017). *PELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO Y ALMIDÓN ADICIONADAS CON GLUCONATO DE CLORHEXIDINA*. INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL.

José Calderón, Carlos Castañeda, H. R. (2003). *Caracterización y aprovechamiento del extracto y aceite esencial de apio, para uso farmacéutico, a través de un proceso de destilación a nivel de planta piloto*. Retrieved from

http://glifos.concyt.gob.gt/digital/fodecyt/fodecyt_2001.41.pdf

Manual GIBEX. (2014). *Manual GIBEX*.

María Luisa Carillo Inungaray, A. R. M. (2013). *Vida útil de los alimentos*. 25. Retrieved from <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Dialnet-VidaUtilDeLosAlimentos-5063620.pdf>

Mendoza, R., & Velilla, W. (2011). Metodología para la caracterización termo-mecánica de películas plásticas biodegradables. *Procesos y Tecnologías de Fabricación*, 48.

Menese, J., & Corrales, C. (2007). SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE UN POLÍMERO BIODEGRADABLE A PARTIR DEL ALMIDÓN DE YUCA. In *Revista EIA*. Escuela de ingeniería de Antioquia.

Ministerio de Salud y Protección Social, Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA, I. N. de S. I. (2011). *EVALUACIÓN DE RIESGOS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXIGÉNICO EN*



ALIMENTOS PREPARADOS NO INDUSTRIALES EN COLOMBIA República de Colombia. Retrieved from

<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-staphylococcus.pdf>

Montano Aragón, A. (2013). *Modificación física del almidón de maíz a escala nanométrica para su uso en la industria alimentaria.*

Morales Castro, A. F. (2015). *Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial del tomillo (Thymus vulgaris) sobre la contaminación de Listeria monocytogenes en queso Ricotta.* Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/50994/>

Moran, S. (2018). Basura: los números rojos de Ecuador. *Plan V*, p. 1.

Norma Técnica Colombiana NTC 1027. (2001). *NTC.*

Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033>

Organización Mundial de la Salud. (2008). E. coli. Retrieved May 27, 2019, from R288 website: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>

Peña, C. (2014). *LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA Y PATOBIOLOGÍA CATEDRA DE MICROBIOLOGIA GENERAL GUIA DE PRACTICA N° MATERIALES Y EQUIPOS DE USO MÁS FRECUENTE EN MICROBIOLOGIA.* Retrieved from https://www.academia.edu/14016318/LABORATORIO_DE_MICROBIOLOGIA_Y_PATOBIOLOGÍA_CATEDRA_DE_MICROBIOLOGIA_GENERAL_GUIA_DE_PRACTICA_N_MATERIALES_Y_EQUIPOS_DE_USO_MÁS_FRECUENTE_EN_MICROBIOLOGIA

Picazo, J. (2000). Derbyshire joint area prescribing committee (japc). In *Seimc* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2016.05.008>

Quintero, D. F., & Ramírez, J. A. (2013). *Estudio del Mecanismo de Gelatinización del Almidon de Yuca.* 21.

Rojas, Q. C. S. B. (2011). *Escherichia coli.* Retrieved from



- <https://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/Escherichia-coli-I.pdf>
- Ruiz Avilés, G. (2005). *POLÍMEROS BIODEGRADABLES A PARTIR DEL ALMIDÓN DE YUCA*. Retrieved from https://repository.eafit.edu.co/bitstream/handle/10784/7364/Gladys_RuizAviles_2005.pdf?sequence=2
- Ruth, E. H. (2010). *QUITOSANTO, UN BIOPOLÍMERO CON APLICACIONES EN SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE FÁRMACOS*. COMPLUTENSE DE MADRID.
- Santiago, M. (2015). *Elaboración y caracterización de películas biodegradables obtenidas con almidón nanoestructurado*.
- Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639–644.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.01.013>
- Tharanathan, R. . (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71–78.
[https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)
- Tomillo - EcuRed. (n.d.). Retrieved April 10, 2019, from https://www.ecured.cu/Tomillo#Aspectos_generales_de_la_planta
- Torrente Sánchez, F. (1985). *El Tomillo : aprovechamiento y cultivo*. Retrieved from http://cataleg.upc.edu/record=b1285855~S1*cat
- Trujillo Rivera, C. (2014). *Obtención de películas biodegradables a partir de almidón de yuca doblemente modificado para uso en empaque de alimentos*.
- Vanegas, M. G. (2014). *OBTENCIÓN DE PELÍCULAS BIODEGRADABLES A PARTIR DE MEZCLAS DE QUITOSANO DE CÁSCARAS DE CAMARÓN Y AGENTES PLASTIFICANTES*.
- Villaviciencio, C. (2018). *Diseño de modelos de negocios para producir y comercializar platos biodegradables*.
- Zaritsky, N. (2013). *Películas biodegradables y recubrimientos comestibles para la protección de alimentos*.

