



**Universidad del Azuay**  
**Facultad de Ciencia y Tecnología**

**Escuela de Ingeniería en Alimentos**

**FABRICACIÓN DE PELÍCULAS BIODEGRADABLES PARA  
PRODUCTOS CÁRNICOS, A PARTIR DE BIOPOLÍMEROS CON  
MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES ANTIMICROBIANOS**

**Trabajo de grado previo a la obtención del título de Ingeniera en Alimentos**

**Autora:**

**Miriam Ximena Altamirano Calle**

**Director:**

**María Elena Cazar Ramírez**

**Cuenca-Ecuador**

**2013**

## **Dedicatoria**

A los que me quieren.

“Anónimo”

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer profundamente a mi pilar más importante de esta vida mis padres: Segundo y Azucena y a mis hermanos: Jaime, Jorge, Fernando y Rosa, por haberme apoyado en todo momento y por la ayuda económica brindada sin eso no fuera posible la culminación de mis estudios y la realización de la presente investigación, de lo más profundo Muchas Gracias.

Quiero dejar constancia de mi más sincero agradecimiento a la PhD. María Elena Cazar, por su dedicación, paciencia y tiempo en la dirección de este trabajo de investigación, por la oportunidad de haberme permitido para trabajar juntas y enfocar este trabajo más allá de un cumplimiento si no de la importancia de la investigación para contribuir en la sociedad actual.

A los miembros del tribunal Dra. Cecilia Palacios e Ing. María Alicia Peña por su paciencia entregada. A la Ing. Ximena Orellana, Lcdo. Diego Vidal por todo el apoyo y las facilidades del laboratorio. Agradezco de manera especial a la Universidad Técnica Particular de Loja a la Red I+D+I en bioproductos por permitirme usar sus laboratorios para el desarrollo de este trabajo.

Como no olvidar un agradecimiento muy importante e incondicional a mis amigos Adita, Nelly, María, Vales, Pepito, Diego y Ariolfo que siempre estuvieron apoyándome en los momentos más arduos, muchas gracias. Un agradecimiento a la Universidad del Azuay por la oportunidad brindada para formarme profesionalmente.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Índice de contenidos.....	iv
Índice de tablas.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Resumen.....	ix
Abstract.....	x
Introducción.....	1

### **CAPÍTULO 1: FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA**

1.1 Polímeros: Generalidades.....	7
1.2 Tipos de polimerización.....	7
1.2.1 Polimerización por adición.....	7
1.2.2 Polimerización por condensación.....	8
1.3 Etapas de una polimerización.....	9
1.4 Características de un polímero.....	9
1.5 Polímeros más utilizados en la industria de alimentos.....	9
1.5.1 PET (polietileno tereftalato).....	9
1.5.1.1 Polietileno de Alta Densidad (HDPE).....	10
1.5.1.2 Polietileno de Baja Densidad (LDPE).....	10

1.5.2 Policloruro de Vinilo (PVC).....	10
1.5.3 Polipropileno (PP).....	10
1.5.4 El ácido poliláctico (PLA).....	10
1.6 Problemas conocidos al uso de polímeros.....	10
1.7 Biopolímeros.....	10
1.7.1 Materias primas utilizadas en la fabricación de biopolímeros.....	11
1.7.1.1 Almidón de yuca.....	11
1.7.1.2 Gelatina.....	13
1.7.1.3 Glicerol.....	14
1.7.1.3 Agua.....	15
1.8 Ventajas y desventajas de los biopolímeros como envases de alimentos.....	15
1.9 Envases activo.....	15
1.10.1 Aceites esenciales: generalidades.....	16
1.10.2 Especies productoras de aceites esenciales.....	17
1.10.2.1 Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	17
1.10.2.2 Apio ( <i>Apium graveolens</i> ).....	17

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

2.1 Recolección del material vegetal.....	18
2.2 Extracción de aceites esenciales.....	18
2.2.1 Destilación por arrastre con vapor de agua.....	18
2.2.2 Extracción por el método clevenger.....	19
2.3 Formulación de biopolímeros.....	20
2.3.1 Optimización de la formulación de biopolímeros antimicrobianos.....	21
2.4 Ensayo de actividad antimicrobiana de biopolímero.....	22

2.5 Ensayos de flexibilidad.....	25
2.6 Composición de los aceites esenciales.....	25
2.6.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS).....	25
2.6.2 Preparación de las muestras.....	26
2.6.3 Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5MS.....	27
2.6.4 Corridos cromatográficos: condiciones de operación del CG-MS en la columna HP-INNOWAX.....	28
2.6.5 Obtención del cromatograma.....	28

### **CAPÍTULO 3: RESULTADOS**

3.1 Diseño experimental.....	29
3.2 Análisis Microbiológico.....	30
3.3 Análisis de composición de aceites esenciales mediante cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS).....	32
3.3.1 Cromatograma de aceite de apio.....	32
3.3.2 Cromatograma del aceite de orégano.....	34

### **CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....**

### **CONCLUSIONES.....**

### **RECOMENDACIONES.....**

### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....**

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.3.2.1: Variables y niveles de medición para el experimento de desarrollo de biopolímeros.....	21
Tabla 2.3.2.2: Diseño experimental del biopolímero adicionada con los aceites esenciales de prueba.....	22
Tabla 3.1: Formulación óptima del biopolímero.....	29
Tabla 3.2.1: Pruebas de vida en estante de carne empacadas con los biopolímeros con mezclas de aceites esenciales antimicrobianas.....	30
Tabla 3.2.2: Pruebas de flexibilidad del biopolímero.....	30
Tabla 3.3.1 Composición del aceite de apio ( <i>Apium graveolens</i> ).....	33
Tabla 3.3.3: Composición de aceite de orégano ( <i>Origanum Vulgare</i> ).....	35

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.2.1: Polimerización por adición.....	8
Figura 1.2.2: Polimerización por condensación.....	8
Figura 1.7.1.1: Estructura de molécula de amilosa.....	12
Figura 2.1: Especies incluidas en el estudio.....	18
Figura 2.2.1: Extracción del aceite esencial de apio.....	19
Figura 2.2.2: Extracción de aceite esencial de orégano.....	20
Figura 2.3: Preparación del biopolímero.....	21
Figura 2.4.1: Muestras de carne empacadas con biopolímero.....	23
Figura 2.4.2 Muestras de carne empacadas e inoculadas con bacterias.....	23
Figura 2.4.3 Dilución de las muestras de carne.....	24
Figura 2.4.4: Resultados microbiológicos de las muestras de carne.....	24
Figura 2.4.5: Recuento de bacterias de ensayos de biopolímeros más aceite esencial...25	
Figura 2.5: Ensayos de flexibilidad.....	25
Figura 2.6.1: Cromatógrafo de gases Agilent 6890N.....	26
Figura 2.6.2 Preparación de la muestra para el cromatógrafo de gases Agilent 6890N.26	
Figura 2.6.3 Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5.....	27
Figura 2.6.4: Condiciones de operación del CG-MS en la columna HP-INNOWAX..28	
Figura 3.3.1: Cromatograma del aceite esencial de apio ( <i>Apium graveolens</i> ).....	32
Figura 3.3.2: Cromatograma del aceite esencial de orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	34

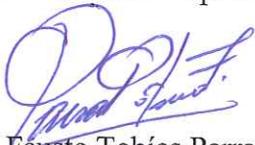
*Handwritten signature and date: 17/12/13*

## FABRICACIÓN DE PELICULAS BIODEGRADABLES PARA PRODUCTOS CÁRNICOS, A PARTIR DE BIOPOLÍMEROS CON MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES ANTIMICROBIANOS

### RESUMEN

La tendencia actual sobre el consumo de productos naturales y el cuidado del medio ambiente; se ha encaminado a encontrar empaques innovadores como elaboración de películas biodegradables con mezclas de aceites esenciales antimicrobianos para productos cárnicos. La formulación del biopolímero se realizó mediante un diseño experimental factorial completo  $2^3$ , el mismo que está constituido por 87% de gelatina, 20% de almidón y 2% de aceite esencial. Se realizaron pruebas de vida de estante para evaluar el efecto inhibitorio de la película bioactiva. La composición de los aceites de apio y orégano fue obtenida mediante cromatografía de gases acoplada a masas. Los resultados demuestran que el aceite de orégano es inhibidor de *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* y al aceite de apio como inhibidor de *Escherichia coli*. Se comprueba la efectividad del uso de biopolímeros enriquecidos con aceites esenciales como envases conservantes de productos cárnicos.

**Palabras clave:** biopolímeros, aceites esenciales, apio, orégano, antimicrobiano.



Ing. Fausto Tobías Parra Parra

Director de Escuela



Dra. María Elena Cazar Ramírez

Director del Trabajo de Grado



Miriam Ximena Altamirano Calle

Autora del Trabajo de Grado

18/12/13

## ABSTRACT

### PRODUCTION OF BIODEGRADABLE FILM FOR MEAT PRODUCTS, MADE FROM BIOPOLYMERS WITH ANTIMICROBIALS ESSENTIAL OILS BLENDS

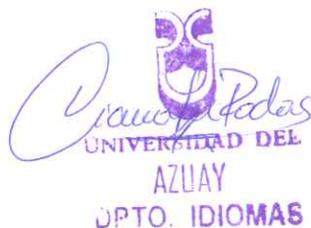
The current trend on consumption of natural products and the concern for the environment have aimed at finding innovative packaging such as the production of biodegradable films with antimicrobial essential oil blends for meat products. The Biopolymer formulation was performed using a 2<sup>3</sup> full factorial experimental design, which consists of 87% gelatin, 20% starch and 2% of essential oil. Shelf life tests were conducted to evaluate the inhibitory effect of the bioactive film. The composition of celery and oregano oils was obtained by gas chromatography coupled to mass. The results show that the oregano oil is Staphylococcus aureus and Bacillus subtilis inhibitor, and the celery oil as Escherichia coli inhibitor. The effectiveness of using biopolymers enriched with essential oils as packaging for preserving meat products is checked.

**Keywords:** Biopolymers, Essential Oils, Celery, Oregano, Antimicrobial.

  
Ing. Fausto Tobías Parra Parra  
School Director

  
Dra. María Elena Cazar Ramírez  
Thesis Director

  
Miriam Ximena Altamirano Calle  
Author



  
Translated by,  
Lic. Lourdes Crespo

Miriam Ximena Altamirano Calle

Trabajo de graduación

PhD. María Elena Cazar

Enero 2014

## **FABRICACIÓN DE PELICULAS BIODEGRADABLES PARA PRODUCTOS CÁRNICOS, A PARTIR DE BIOPOLÍMEROS CON MEZCLAS DE ACEITES ESENCIALES ANTIMICROBIANOS**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **Impacto de los plásticos en el medio ambiente**

Las actividades que desarrolla el ser humano con el fin de procurar sus necesidades afectan a la biósfera, causando daños no cuantificados y en muchas ocasiones evidenciables a largo plazo. El ritmo de vida actual exige el desarrollo de empaques que preserven alimentos, siendo éstos mayoritariamente fabricados de plástico. Este material puede permanecer 1,000.00 años en el medio ambiente. En los mares existe entre 3 y 5 kilos de plásticos y el consumo anual de polímeros por cada persona es de 40kg. (*Danm & Materiales, 2009*).

Según un reciente informe del Programa de las Naciones Unidas para el Ambiente (PNUA), los plásticos, en particular las bolsas y las botellas en PET (Tereftalato de polietileno), son los residuos marinos más difundidos en el mundo. Alrededor de 100 millones de toneladas de plástico se producen cada año, de los cuales 40 millones son producidos únicamente por los Estados Unidos. Del total de esta gran cantidad de plásticos, alrededor del 30 % se usa en material de empaque, es decir, en material de rápido desecho que tiene una corta vida útil y va a parar a los rellenos sanitarios a permanecer allí por más de 100 años. (*Corrales, 2007*).

En Ecuador en el año 2002 según el análisis realizado por la Organización Panamericana de la Salud: se produjeron 336 ton/día de residuos plásticos; provenientes de origen doméstico, industrial y agroindustrial. (OPS, 2002). Según datos obtenidos de la EMAC, en Cuenca se genera alrededor del 22% por año de plásticos del total de materiales reciclables. (18 mil toneladas) (Espinoza et al., 2013). Los plásticos usados intensivamente son en su mayoría, de baja biodegradabilidad. Y generan una gran cantidad de residuos. Los plásticos sintéticos son macromoléculas de gran estabilidad estructural por lo tanto son muy resistentes a las agresiones del medio. (Meneses et al., 2007).

### **Polímeros biodegradables**

Aunque los empaques tradicionales han contribuido al desarrollo de los sistemas de distribución de los alimentos, la tecnología actual demanda mejoras, dadas las exigencias de la sociedad actual. Recientemente, una serie de polímeros biodegradables y naturales de origen sintético con buena biodegradabilidad y biocompatibilidad se han desarrollado. (Luckachan & Pillai, 2011).

Los polímeros biodegradables han atraído la atención del consumidor creando productos innovadores. Como opción de sustitución a los plásticos derivados del petróleo. Los plásticos dependen en su totalidad de este recurso no renovable, incrementando la dependencia de la humanidad en el petróleo. Las películas y recubrimientos preparados a partir de materiales biodegradables son cada vez más utilizados en la industria de envasado de alimentos, ((Kuorwel, Cran, Sonneveld, Miltz, & Bigger, 2011a). los mismos que pueden ser producidos a partir de recursos renovables y pueden descomponerse fácilmente en el entorno.

Entre sus ventajas más importantes se encuentran:

- Menor impacto ambiental generado.
- Preservación, protección de todo tipo de productos, siendo los alimentos y las materias primas el campo de mayor prioridad.
- Incremento de la vida útil y de la calidad del producto empacado.

- Menor consumo energético para su producción.
- Potencial para añadir valor agregado a subproductos provenientes de las industrias y su biodegradabilidad. (*Danm & Materiales, 2009*).

### **Polímeros biodegradables como envases de alimentos**

Los productos alimenticios pueden ser susceptibles a la contaminación microbiana que es causada principalmente por bacterias, levaduras y hongos. (*Kuorwel K. et al., 2011*). Muchos de estos microorganismos pueden causar reacciones indeseables que deterioran el sabor, olor, color y la textura de los alimentos. El desarrollo de microorganismos en productos alimenticios es una preocupación importante debido a su asociación con enfermedades transmitidas por alimentos.

Para inhibir el crecimiento de microorganismos en alimentos se han usado aditivos químicos. Algunos aditivos como nitritos, nitratos, sulfitos, etc. están creando el desarrollo de enfermedades; por lo que actualmente está creciendo el interés de consumir productos naturales por lo cual la industria alimentaria ha priorizado la sustitución de aditivos químicos por compuestos naturales como respuesta a una alimentación sana y segura. (*Rodríguez, 2011*).

Los empaques antimicrobianos pueden reducir, inhibir o retardar el crecimiento de microorganismos que se encuentran presentes en los alimentos. La contaminación en los alimentos reduce la vida útil de los mismos y aumenta el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos. Los microorganismos se encuentran en la superficie del producto y los empaques antimicrobianos, a través del contacto con los alimentos y la liberación de los compuestos antimicrobianos, cumplen con la función de la conservación de los alimentos.

### **Aceites esenciales como aditivos antimicrobianos**

El aumento de la conciencia sobre resistencia a los antibióticos y los efectos adversos de los conservantes sintéticos ha reactivado la búsqueda de fuentes naturales de antimicrobianos como conservantes alternativos en los productos cárnicos. (*Hernández*

*et al.*, 2011). Por lo tanto el uso de especias como conservantes se ha incrementado en los últimos años. Debido a esto los aceites esenciales son una nueva alternativa para la protección de los alimentos.

Las actividades biológicas de los aceites esenciales dependen de su composición. No obstante, la composición de un aceite esencial puede variar en función de la especie y de la subespecie, ubicación, tiempo de cosecha, parte de la planta y método de extracción utilizado. (*Hernández et al.*, 2011). Algunos aceites esenciales muestran mejores propiedades antibacterianas cuando se aplican en los productos cárnicos, principalmente debido a los niveles de proteína rica en grasas de estos alimentos. El aceite esencial se disuelve en la grasa, que es relativamente menos disponible para actuar contra el microorganismo que en la fase acuosa. (*Hernández et al.*, 2011).

### **Avances en el desarrollo de biopolímeros antimicrobianos**

Hasta el presente no se han sustituido completamente los polímeros sintéticos por naturales. Se han desarrollado evaluaciones de la actividad de polisacáridos biodegradables elaborados con proteínas. Estas películas mostraron el potencial para una amplia gama de aplicaciones en el envasado de alimentos donde el crecimiento microbiano indeseable es una preocupación. Los estudios han demostrado que los sistemas de envasado puede aumentar la vida útil de los alimentos al extender la fase de latencia y reducir la tasa de crecimiento de microorganismos que se deterioran. (*Kuorwel K. et al.*, 2011).

Numerosos estudios se han centrado en la incorporación de conservantes en alimentos, tales como ácidos orgánicos, sus sales y anhídridos en las películas de embalaje. En los últimos años, la investigación de envasado de alimentos se ha centrado en películas biodegradables y / o comestibles a base de polímeros naturales. Estos polímeros pueden ser proteínas de origen agrícola y su naturaleza química determina las propiedades físicas de las películas resultantes. (*Aguirre, Borneo, & León*, 2013).

Las propiedades antimicrobianas de varios aceites esenciales han sido ampliamente estudiadas. No obstante su aplicación en la industria de alimentos como conservantes se

ve comprometida dado que no se cuenta con estudios que establezcan su efectividad posterior a tratamientos térmicos. Solamente un número reducido de preservantes de alimentos formulados con aceites esenciales está disponible comercialmente. (*Burt, 2004*).

Estas películas tienen una amplia gama de aplicaciones en el envasado de alimentos donde el crecimiento microbiano indeseable es una preocupación. Algunas películas y recubrimientos comestibles han sido ampliamente utilizados para las frutas frescas, verduras, dulces, alimentos congelados, y productos cárnicos. Sin embargo, muchas películas comestibles tienen limitaciones en mecánica o propiedades de barrera, o son prohibitivamente caros. (*Tongdeesoontorn et al., 2011*). Tradicionalmente, los antimicrobianos son adicionados en la formulación del alimento, pero su actividad puede ser inhibida por muchas sustancias de interferencia del propio alimento. Este factor hace que los recubrimientos antimicrobianos sean más eficientes en la conservación de alimentos.

En esta investigación se desarrollaron películas biodegradables para productos cárnicos, a partir de biopolímeros con mezclas de aceites esenciales antimicrobianos. El plástico fue formulado a partir de recursos naturales renovables, cuyo desecho no genera impactos sobre el medio ambiente. Esta iniciativa puede ser abordada por la industria de alimentos ecuatoriana para mejorar la tecnología actual de envases y disminuir la afectación al medio ambiente que se realiza con los empaques de alimentos tradicionales.

El presente estudio ha generado los lineamientos para el desarrollo de biopolímeros a nivel industrial, lo cual representan una alternativa viable en nuestro país en el empaque de alimentos. La adición de aceites esenciales antimicrobianos permite formular empaques biodegradables que prolonguen la vida del alimento empaqueado y mejorar la calidad del producto con características conservantes. Por este motivo se enfocan esfuerzos investigativos a extender la vida de estante de los alimentos; el uso de esta tecnología significa una opción productiva para empresarios en las 3 regiones de nuestro país.

Se obtuvo la formulación óptima para el desarrollo de un biopolímero aplicable en la fabricación de empaques biodegradables con el fin de obtener una respuesta amigable con el ambiente. Además se verificó el cumplimiento de los requisitos de biodegradabilidad e higiene para evitar el desarrollo de microorganismos dañinos para los alimentos y la salud del consumidor.

Se realizó un bioensayo de actividad antimicrobiana mediante el cual los polímeros formulados fueron evaluados en un ensayo “in vitro”. Las bacterias objetivos que se evaluaron son: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*

## CAPÍTULO 1

### FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

#### 1.1 Polímeros: Generalidades

Un polímero es un compuesto molecular que se distingue por tener una masa molar grande, que comprende desde miles a millones de gramos, y por estar formado por muchas unidades que se repiten. Las propiedades físicas de los polímeros, también conocidos como macromoléculas, son muy distintas a las de las moléculas pequeñas comunes, las que se unen mediante enlaces covalentes. (*Chang, 2010*).

La Polimerización es un proceso químico por el cual se obtiene macromoléculas a partir de monómeros. El número de unidades que se repiten en una molécula grande se llama **grado de polimerización**. (*Chang, 2010*). Para preparar un polímero, debemos enlazar entre sí una gran cantidad de monómeros de bajo peso molecular. El grado de polimerización y peso molecular, son las características más importantes de las sustancias macromoleculares, porque casi todas las propiedades en solución y en la mayor parte dependen de estos.

#### 1.2 Tipos de polimerización

El grado de polimerización indica el número de unidades de monómero se unen para formar la cadena polimérica. (*Educarchile, 2007*). Para el desarrollo de un polímero se puede aplicar 2 tipos de polimerización:

**1.2.1 Polimerización por adición.**-los monómeros se adicionan unos con otros que tienen uno o más enlaces dobles y triples, de tal manera que el producto polimérico contiene todos los átomos del monómero inicial.

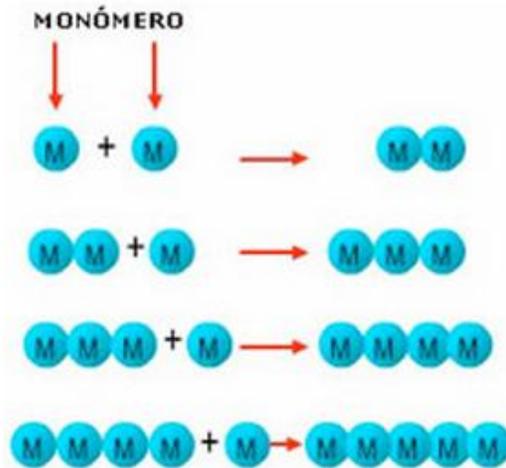


Figura 1.2.1: Polimerización por adición.

Fuente: Educarchile, 2007

**1.2.2 Polimerización por condensación.-** es el resultado de una reacción de condensación entre monómeros para formar una molécula más grande, no todos los átomos del monómero forman parte del polímero, para que dos monómeros se unan, una parte de éste se pierde.

Los polímeros producidos por reacciones de condensación pueden ser lineales o no lineales, dependiendo del número de grupos funcionales por monómero. La polimerización se puede realizar en estado líquido o sólido.

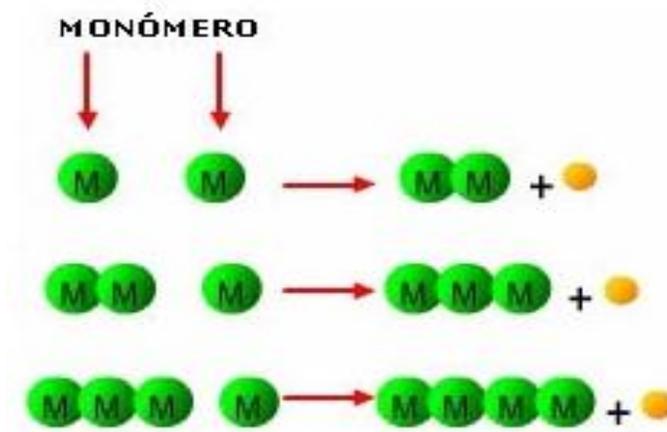


Figura 1.2.2: Polimerización por condensación

Fuente: Educarchile, 2007

### 1.3 Etapas de una polimerización

La polimerización consta de las siguientes etapas:

- **Iniciación.**- para este proceso se emplean diversos tipos de catalizadores como los peróxidos orgánicos que actúan como generadores de radicales libres.
- **Propagación.**- es el aumento de la cadena por incorporación de sucesivas unidades de monómeros.
- **Terminación.**- la polimerización puede concluir cuando se adiciona un radical a la cadena o cuando dos cadenas en crecimiento se combinan. (*Chang, 2010*).

### 1.4 Características de un polímero

Las características deseables de un polímero incluyen:

- Bajo punto de fusión, que permite procesarlo fácilmente para darle forma.
- Baja densidad, lo cual los hace útiles en la industria por ser productos ligeros.
- Pobre conductividad eléctrica y térmica, permite usarlos como aislantes.
- Poca reactividad química, permite tenerlos en contacto con alimentos sin riesgos.
- Su alta estabilidad térmica le permite trabajar durante mucho tiempo a una temperatura de 100°C en el aire.
- También es resistente al punto de ebullición pudiendo esterilizarse a temperaturas de hasta 140°C sin temor a la deformación. (*Cedron et al., 2011*).

## **1.5 Polímeros más utilizados en la industria de alimentos**

En la industria de alimentos los polímeros tienen gran acogida. A continuación se describen los más utilizados en esta área.

1.5.1 PET (polietileno tereftalato).- utilizado para el envasado de alimentos.(*Sierra, Plazas, Guillén, & Rodríguez, 2010*), ocupa el 43%. Se puede obtener dos tipos de polietileno:

1.5.1.1 Polietileno de Alta Densidad (HDPE).- Es un termoplástico fabricado a partir del Etileno (elaborado a partir del Etano, uno de los componentes del gas natural).

1.5.1.2 Polietileno de Baja Densidad (LDPE).- Se produce a partir del gas natural, su transparencia y flexibilidad hacen que esté presente en una diversidad de envases.

1.5.2 Policloruro de Vinilo (PVC).- Se produce a partir de dos materias primas naturales: 43% gas y 57% sal común.

1.5.3 Polipropileno (PP).- Es un termoplástico que se obtiene por polimerización del propileno.

1.5.4 El ácido poliláctico (PLA).- es un biopolímero termoplástico cuya molécula precursora es el ácido láctico. Debido a su biodegradabilidad, propiedades de barrera y biocompatibilidad. (*L. S. C & A, 2003*). En la industria alimenticia se utiliza como preservante y acidulante.

## **1.6 Problemas conocidos al uso de polímeros**

La contaminación generada por desperdicios sintéticos no pueden ser degradados por el entorno, debido a que son residuos difíciles de manejar por su alta resistencia a la corrosión, al agua y a la descomposición, los convierte en residuos difíciles de eliminar debido a la degradación que sufren con la temperatura y el tiempo de servicio. (*Pardo et al., 2011*). Hoy en día, el plástico es responsable en gran parte de los residuos contaminantes que se acumulan en nuestro planeta, cuando se lo desecha permanece en el ambiente por muchos años.

## **1.7 Biopolímeros**

Los biopolímeros son definidos como: “variedad de macromoléculas, producidas por sistemas biológicos, como animales, plantas o microorganismos”. Los biopolímeros pueden ser sintetizados químicamente, pero como requisito sus unidades poliméricas deben ser derivadas de sistemas biológicos, como: aminoácidos, azúcares, lípidos, entre otros. (*Background Paper, 1992*).

Los empaques biodegradables son generalmente producidos a partir de materiales poliméricos naturales, abundantes y renovables tales como: proteínas, polisacáridos, lípidos, o la combinación de estos. Este material debe ser completamente biodegradable en un período de tiempo corto, contribuyendo así con la protección del medio ambiente. (*Durango et al., 2011*). Además tienen un gran potencial para evitar el deterioro de muchos productos alimenticios, protegiéndoles y extendiendo su vida de anaquel.

### **1.7.1 Materias primas utilizadas en la fabricación de biopolímeros**

En la formulación de biopolímeros se emplean diversos materiales. A continuación se describen las características fisicoquímicas y potenciales de materias primas seleccionadas

**1.7.1.1. Almidón de yuca.-** es considerado como uno de los principales materiales biodegradables comestibles con mayor aplicación, debido a su abundancia, bajo costo, fácil manipulación, procesamiento y por su contenido de amilosa. El almidón posee propiedades termoplásticas hidrofílicas, por lo que pueden ser un sustituto de plásticos tradicionales. Los gránulos de almidón están compuestos por capas externas de amilopectina y capas internas de amilosa. Es un polisacárido formado por unidades glucosídicas, es decir, es una macromolécula formada por gran cantidad de moléculas de glucosa que se repiten. (*Meneses et al., 2007*).

La amilosa, el almidón de alta amilosa y el almidón de alta amilosa hidroxipropilado han sido usados para elaborar envases que contienen soluciones acuosas. Las películas de almidón a menudo tienen buenas propiedades de barrera al oxígeno y dióxido de

carbono puede proteger a los lípidos de la oxidación. No obstante presentan una mala barrera al vapor de agua. Esto se debe a que los almidones poseen gran afinidad con el agua. (Pardo L et al., 2011).

Este polímero presenta propiedades de semicristalinidad, debido a la presencia de puentes de hidrógeno, entre los grupos hidroxilo en las cadenas lineales de la molécula de amilopectina y por cadenas externas de amilopectina unidas con porciones de amilosa. (Meneses et al., 2007).

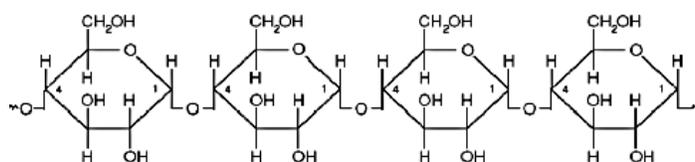


Figura 1.7.1.1: Estructura de molécula de amilosa

Fuente: (Meneses et al., 2007).

Estructuralmente, el almidón de yuca se compone de 17% de amilosa, siendo este responsable de sus características de formación de película. (Tongdeesoontorn, Mauer, Wongruong, Sriburi, & Rachtanapun, 2011). El contenido de agua del almidón puede variar desde un almidón seco hasta un contenido de humedad del 25 % en peso. Otros reportes indican que el contenido de agua del almidón original o inicial, debe estar preferiblemente entre 2 y 5 %. (Enríquez M et al., 2012).

El uso solo de almidón en la formulación de biopolímeros, produce materiales quebradizos y muy sensibles al agua, con propiedades mecánicas pobres. (Enríquez et al., 2012); por lo que es muy importante combinar con otros materiales poliméricos que mejoren sus propiedades mecánicas, resistencia al agua le otorguen mayor flexibilidad y resistencia al rompimiento. Cabe recalcar que los materiales utilizados en la combinación del almidón deben tener buena biodegradabilidad y ser hidrófobos o apolares.

Los plastificantes son pequeñas moléculas agregadas para suavizar un polímero por debajo de su transición vítrea para reducir su cristalinidad o punto de fusión (Valarezo,

M 2012). Los plastificantes comunes utilizados en la producción de películas de almidón son: agua, glicerol, sorbitol, y otros compuestos de bajo peso molecular. El glicerol y el sorbitol son ampliamente utilizados como plastificantes, debido a su estabilidad y comestibilidad. (Tongdeesoontorn *et al.*, 2011).

**1.7.1.2 Gelatina-** Fue uno de las primeras macromoléculas empleadas en la producción de biomateriales. Su producción es abundante en todo el mundo, tiene un costo relativamente bajo y posee excelentes propiedades funcionales y filmógena. (Rangel *et al.*, 2008).

La gelatina es un derivado de proteína de colágeno obtenido por ebullición. Es una proteína soluble comestible, biodegradable y posee propiedades para la formación de películas y capacidad para impartir impermeabilidad al oxígeno y excelente propiedad de barrera a los gases. Esta sustancia es la principal proteína constituyente fibroso en los huesos, los cartílagos y pieles. Por lo tanto los factores que influyen en las propiedades intrínsecas de las gelatinas: el tipo de animal, la edad y el tipo de colágeno de donde se extrae la gelatina. (Gómez-Guillén, Giménez, López-Caballero, & Montero, 2011).

La gelatina es un sólido vítreo que tiene un color amarillo pálido, los usos dependerá de sus propiedades características. (Gul-E-Noor *et al.*, 2010). Esta proteína que se obtiene mediante la ruptura de las cadenas de colágeno por hidrólisis y temperatura de 60°C y formando películas termorreversibles. Con respecto a sus propiedades mecánicas, son inferiores a las de materiales provenientes de polímeros sintéticos. (Pardo *et al.*, 2011). La diversidad estructural de las unidades de la cadena de gelatina determinara las características específicas de las propiedades de esta sustancia. (Moscow *et al.*, 1981).

A continuación se enumeran las características más sobresalientes de la gelatina; relacionados con la formación de biopolímeros.

- Presenta capacidad para formar una estructura helicoidal triple cadena específica; esto no se observa en polímeros sintéticos.

- Desarrolla una interacción específica con el agua que es diferente a la que se ha observado con polímeros hidrófilos sintéticos, la misma que regula la estructura y las propiedades mecánicas de gelatina en estado sólido.

El estado conformacional de las macromoléculas de la gelatina está determinado por la temperatura de la solución, la velocidad de secado, la concentración de gelatina inicial, la naturaleza del disolvente y el contenido de diversos desnaturalizantes. (*Gómez-Guillén et al., 2011*).

Las películas basadas en gelatina presentan buena resistencia mecánica, a pesar de su reducido espesor, barrera de vapor de agua. También presentan alta susceptibilidad a la temperatura ambiente y la humedad relativa debido a la naturaleza hidrófila de la gelatina. Según Zarama, (2012). Las biopelículas de gelatina son frágiles y susceptibles al agrietamiento debido a ser altamente hidrofílicas y a su fuerte energía cohesiva. La gelatina es biodegradable y tiene una buena biocompatibilidad, lo que hace que se utilice como reemplazo de tejidos (*Gul-E-Noor et al., 2010*).

Es de vital importancia utilizar en su formulación sales inorgánicas como el cloruro de sodio; las cuales mejoran las propiedades del polímero como la transparencia y evitan que se forme un biopolímero blanco; lo que causa inconvenientes e inconformidad con el consumidor.

**1.7.1.3 Glicerol.-** esta sustancia es utilizada por ser un plastificante que ayuda en la lubricación. Su presencia es fundamental para que el biopolímero tenga la elasticidad necesaria, lo cual hace que se adapte fácilmente a los moldes. Los glicerolos son agentes suavizantes para los almidones, mejorando la flexibilidad de las películas resultantes. El glicerol se adiciona en bajas concentraciones, las cuales son suficientes para modificar significativamente las propiedades mecánicas de las películas.

Esta sustancia brinda al producto final características elásticas, permitiendo su maleabilidad, incrementando su permeabilidad al vapor. Esto se debe a la naturaleza

hidrofílica del glicerol, el cual fácilmente forma puentes de hidrógeno con las moléculas de agua. (*Enríquez M et al., 2012*).

El calentamiento de la mezcla se hace con el fin de gelatinizar el almidón, fundir otras sustancias y evitar la formación de burbujas que pueden afectar la calidad final de la película luego al secado.

**1.7.1.3 Agua.-** es recomendado como el mejor plastificante, aunque no debe encontrarse en proporciones muy altas con relación al almidón, debido a que en el proceso de polimerización es necesario elevar la temperatura de la mezcla hasta la temperatura de ebullición del agua, lo que puede degradar la estructura del almidón (*Valarezo, M 2012*).

## **1.8 Ventajas y desventajas de los biopolímeros como envases de alimentos**

Los biopolímeros presentan significativas ventajas en relación a polímeros sintéticos. A continuación se encuentran algunas de ellas:

- Biodegradables.
- Mejora las características organolépticas del producto empacado como: olor, apariencia, sabor.
- Puede incorporar antioxidantes y agentes antimicrobianos.
- Reduce el volumen y residuos de empaque. (*Elizondo & Gallo, 2011*).

Existen algunas desventajas de los biopolímeros como sustituyentes de polímeros, entre los más relevantes se encuentran:

### **Desventajas**

- Bajas barreras de gas y humedad.
- Propiedades mecánicas pobres.
- Además es necesario mejorar rendimientos de obtención y optimización de los procesos de producción de biopolímeros. (*Enríquez et al., 2012*).

## 1.9 Envases activo

Un envase activo es un sistema en el que el producto, el envase y el medio ambiente interactúan de una manera positiva para extender período de conservación de la seguridad microbiana o propiedades sensoriales, al igual que el mantenimiento de la calidad de los productos alimenticios. (Kuorwel, Cran, Sonneveld, Miltz, & Bigger, 2011b)(Kuorwel K. et al., 2011). Los polímeros son los materiales usados para empaques activos debido a sus propiedades intrínsecas que constituyen un soporte ideal para los principios activos.

El aprovechar los recursos renovables como fuente de conservación y reciclaje los convierte en una excelente opción de innovación como nuevos productos biodegradables. Su total biodegradación en CO<sub>2</sub>, agua y posteriormente en abono orgánico es una gran ventaja frente a los plásticos sintéticos, causando menor impacto en el medio ambiente. En el proceso de biodegradación intervienen agentes biológicos como: enzimas, bacterias y microorganismos. (Luckachan, 2011).

### 1.10.1 Aceites Esenciales: Generalidades

Los Aceites Esenciales son líquidos aceitosos aromáticos contenidos en el material vegetal (flores, brotes, semillas, hojas, ramas, cortezas, hierbas, madera, frutos y raíces)(Burt, 2004). Los aceites esenciales, categorizados como GRAS (generalmente reconocidos como seguros), puede ser considerado como las alternativas potenciales a los aditivos sintéticos. (Aguirre et al., 2013). Estas sustancias sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada. (Rodríguez., et al., 2012).

Los aceites esenciales y sus constituyentes principales inhiben los microorganismos a través de mecanismos tales como ruptura de la membrana citoplasmática, inhibición de la síntesis de las proteínas, mediante enzimas asociadas con la síntesis de la pared celular y la destrucción de la integridad osmótica de la membrana de la célula. Aunque estas sustancias pueden inhibir el crecimiento de microorganismos cuando se incorpora en materiales de embalaje, es necesario evaluar las propiedades organolépticas de los

productos alimenticios envasados, ya que es posible que el aceite esencial transfiera olores o sabores que rebasan los umbrales de aceptación sensorial del producto.

Varios estudios han demostrado que los sistemas de envasado con actividad antimicrobiana pueden aumentar la vida útil de los alimentos envasados al extender la fase de latencia y reduciéndola tasa de crecimiento de microorganismos que deterioran a los alimentos perecederos. (Aguirre *et al.*, 2013).

### **1.10.2 Especies productoras de aceites esenciales**

**1.10.2.1 Orégano (*Origanum vulgare*).**- Varias especies del género *Origanum* son nativas del Mediterráneo. La influencia del clima, estación y el suelo sobre la composición del aceite esencial es mayor que la diferencia entre las diversas especies. Los efectos positivos de orégano en la salud humana ya se han atribuido a su actividad antioxidante tanto en el aceite esencial y la fracción fenólica soluble (Sook Chumet *al.*, 2005).

El orégano es una especie genéticamente heterogénea debido a polinización cruzada natural, por lo tanto resulta en gran variación en el contenido fenólico lo que limita su uso como un ingrediente en alimentos funcionales.

**1.10.2.2 Apio (*Apium graveolens*).**- pertenece a la familia de las umbelíferas. En la India se produce alrededor de 40.000 toneladas de apio y las exportaciones de 29.250 toneladas. Se cultiva comercialmente en los EE.UU, Francia y otras partes de Europa.(Sowbhagya, Srinivas, & Krishnamurthy, 2010). Se valora como una especia y confieren un olor característico; esto se debe a compuestos oxigenados presentes en el aceite, anhídrido de ácido a saber sedanolide y sedanonic. Su sabor cálido, agradable y utilizado como condimento en el sabor de los alimentos como: sopas enlatadas, salsas, encurtidos, productos de tomate, carnes y salchichas. La presencia de los D-limoneno, selineno y algunos alcoholes sesquiterpeno se ha establecido en la semilla. (Papamichail *et al.*, 2000).

El aceite esencial de apio presta un olor floral a perfumes orientales a los que se imparte caliente. Su semilla contiene en un aceite volátil cuyos componentes mayoritarios son de limoneno y selineno, que constituyen el 60 y 20%, respectivamente. (*Sowbhagya, Sampathu, & Krishnamurthy, 2007*). En los últimos años, ha habido una mayor demanda de estos aceites y oleorresinas en el mercado de exportación, los mismos que son utilizados en su mayor cantidad en la industria de alimentos.

## CAPÍTULO 2

### MATERIALES Y MÉTODOS

**2.1 Recolección del material vegetal.-** Las muestras de las plantas aromáticas incluidas en este estudio (*Apium graveolens*, *Origanum vulgare*) empleados para la extracción de aceites esenciales fueron adquiridos en mercados locales de la ciudad de Cuenca, Azuay. Ejemplares de las plantas fueron entregados al Herbario “Azuay” de la Universidad del Azuay para su identificación botánica.

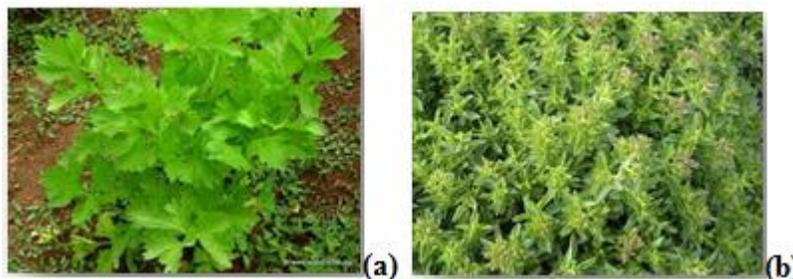


Figura 2.1: Especies incluidas en el estudio (a) *Apium graveolens*. (b) *Origanum vulgare*

### 2.2 Extracción de aceites esenciales

**2.2.1 Destilación por arrastre con vapor de agua.-** La muestra fue sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado. La esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. La extracción del aceite de apio se realizó en un equipo de hidrodestilación de marca “Albrigi-Luigi”, en el Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad del Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología.

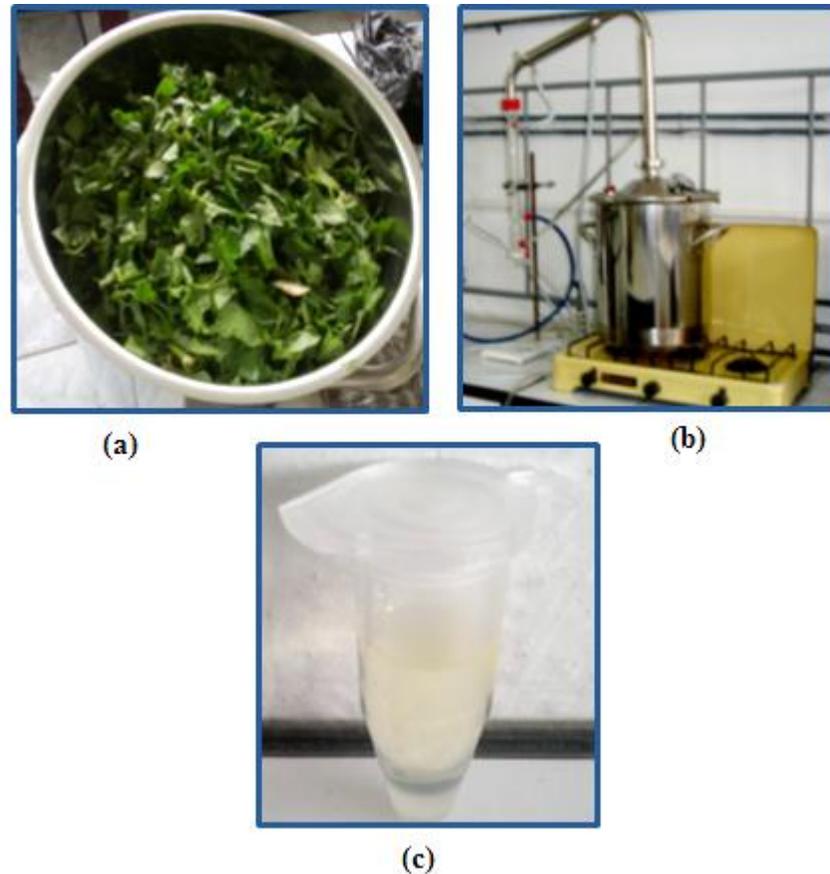


Figura 2.2.1: Extracción del aceite esencial de apio. (a) Material vegetal recolectado y listo para la extracción. (b) Equipo de extracción de aceites esenciales. (c) Obtención del aceite esencial de apio.

**2.2.2 Extracción por el método clevenger.-** el aceite **esencial de orégano** fue extraído mediante un equipo tipo Clevenge, ensamblado en el Laboratorio de Biotecnología de Productos Naturales. El material vegetal se coloca en un balón de fondo redondo de 5 litros, el cual se acopla a un refrigerante y a un sistema de codos y uniones para recolectar el material vegetal. El aceite se extrae de las hojas de orégano mediante la adición de agua al balón y evaporación por generación de calor en una fuente eléctrica. El aceite es recolectado en un eppendorf para su posterior centrifugación, con el fin de separar toda el agua del aceite esencial.

El equipo extractor a escala de laboratorio se ensambló según se observa en la figura 2.2.1.

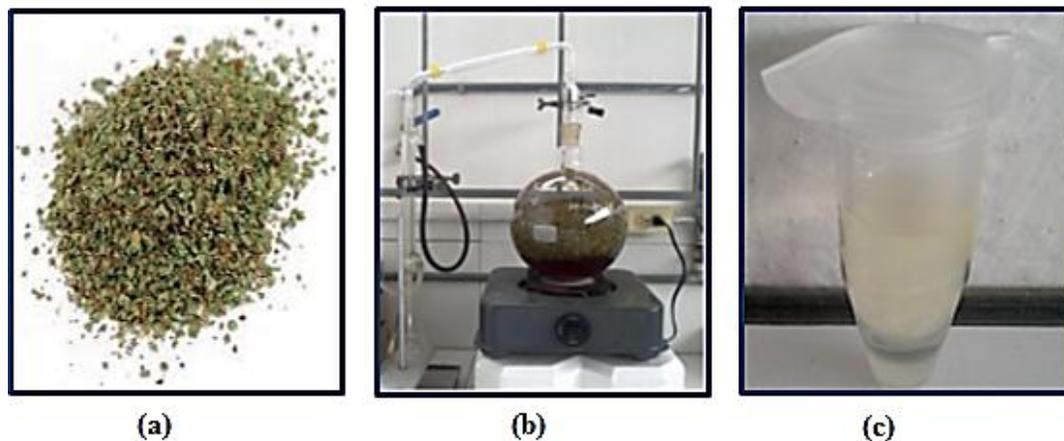


Figura 2.2.2: Extracción de aceite esencial de orégano. (a) Muestra de orégano para la extracción. (b) Aparato Clevenger. (c) Obtención del aceite esencial de orégano.

### 2.3 Formulación de biopolímeros

Los biopolímeros preparados para el presente estudio se formularon según el procedimiento que se describe a continuación:

- Pesarse cada una de la materia prima utilizada para desarrollar el biopolímero.
- Calentar la mezcla a  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  o al punto de formación de espuma inicial; agitar la mezcla durante el calentamiento, no debe haber grumos visibles, el tiempo necesario para la disolución es de 30 minutos.
- Sonicar por 5 minutos, para una completa dilución del almidón de yuca.
- Mezclar con la dosis de aceite esencial.
- Colocar cuidadosamente la mezcla en un molde de secado que ya ha sido colocado en una posición nivelada.
- Colocar en la estufa a  $40^{\circ}\text{C}$  por un tiempo de 2 horas.
- El período de secado depende de la temperatura ambiente y la humedad.

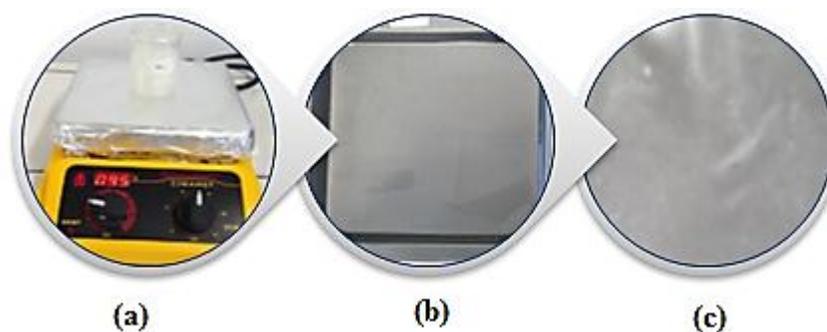


Figura 2.3: Preparación del biopolímero. (a) Mezclado de componentes. (b) Secado. (c) Obtención de biopolímeros.

### 2.3.1 Optimización de la formulación de biopolímeros antimicrobianos

Para obtener la mejor formulación del biopolímero en función de su actividad antimicrobiana se investigó la influencia de tres variables a dos niveles (máximo y mínimo). La respuesta experimental fue el recuento de bacterias totales luego del almacenamiento en un envase sellado con el polímero de prueba y un sustrato impregnado con materias de prueba.

Las variables a investigar y los niveles de prueba se presentan a continuación:

Variables	Dominio Experimental	
	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
Porcentaje de almidón	0,29%	0,36%
Porcentaje de gelatina	1,26%	1,01%
Dosis de Aceite Esencial	5%	10%

Tabla (2.3.2.1) Variables y niveles de medición para el experimento de desarrollo de biopolímeros

En un diseño factorial completo se determina la influencia de todas las variables experimentales, factores y efectos de interacción (Lundstedt et al., 1998). A continuación se presenta la matriz del diseño a aplicar para obtener la formulación óptima de biopolímero.

Exp.	Gelatina	Almidón	AE.
1	70,00%	20%	1%
2	87,00%	20%	1%
3	0,7	25%	1%
4	87,00%	25%	1%
5	0,7	20%	2%
6	87,00%	20%	2%
7	0,7	25%	2%
8	87,00%	25%	2%

Tabla (2.3.2.2) Diseño experimental del biopolímero adicionada con los aceites esenciales de prueba

Los biopolímeros se elaboraron de acuerdo al modelo factorial completo  $2^3$ , siendo 8 el número de experimentos a realizarse más 2 réplicas a la formulación testigo. Los experimentos se realizarán por triplicado, dando un total de 60 experimentos para evaluar el potencial de los dos aceites esenciales en estudio como aditivos del biopolímero.

#### **2.4 Ensayo de actividad antimicrobiana de biopolímero**

El biopolímero de mejores propiedades antimicrobianas fue obtenido de las condiciones del experimento número 6. Esta película fue evaluada en un ensayo “in vitro”. Las bacterias de prueba fueron: *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus subtilis* y *Escherichia Coli*.

Se empacaron las muestras de carne con la envoltura de biopolímero impregnada con aceites esenciales. La carne empacada fue inoculada con un cultivo bacteriano y almacenadas a temperatura ambiente por un tiempo de 72 horas. Además se empaco una muestra con un biopolímero sin aceite esencial, como control.

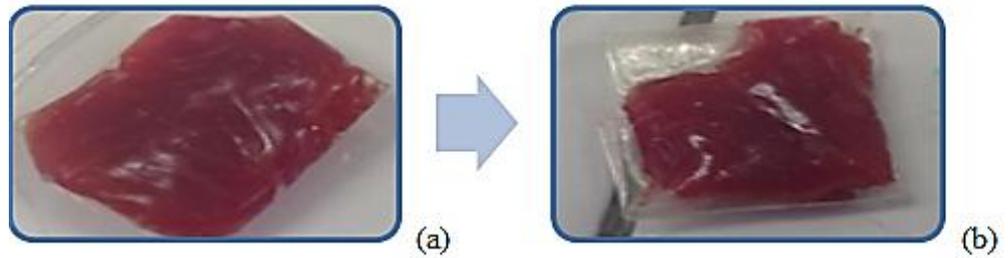


Figura 2.4.1: Muestras de carne empacadas con biopolímero. (a) Carne empacada e inoculada. (b) Control positivo.

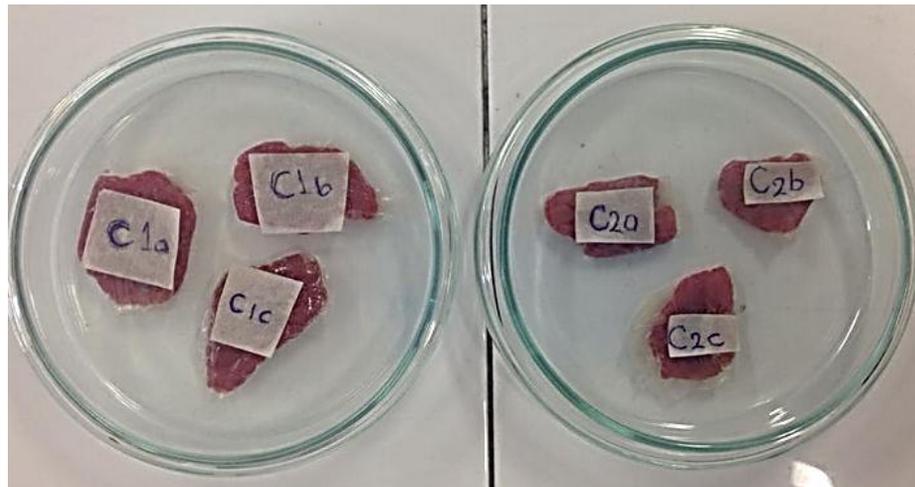


Figura 2.4.2: Muestras de carne empacadas e inoculadas con bacterias.

Transcurrido el tiempo de 72 horas a temperatura ambiente, se procedió a colocar cada una de las muestras de carne en agua de peptona y agitar en vortex con el fin de homogenizar la dilución. Se transfirió 1 ml del sobrenadante y se sembró sobre placas de agar, y, luego de 24 horas de incubación se procedió al recuento de colonias visibles.



Figura 2.4.3: Dilución de las muestras de carne

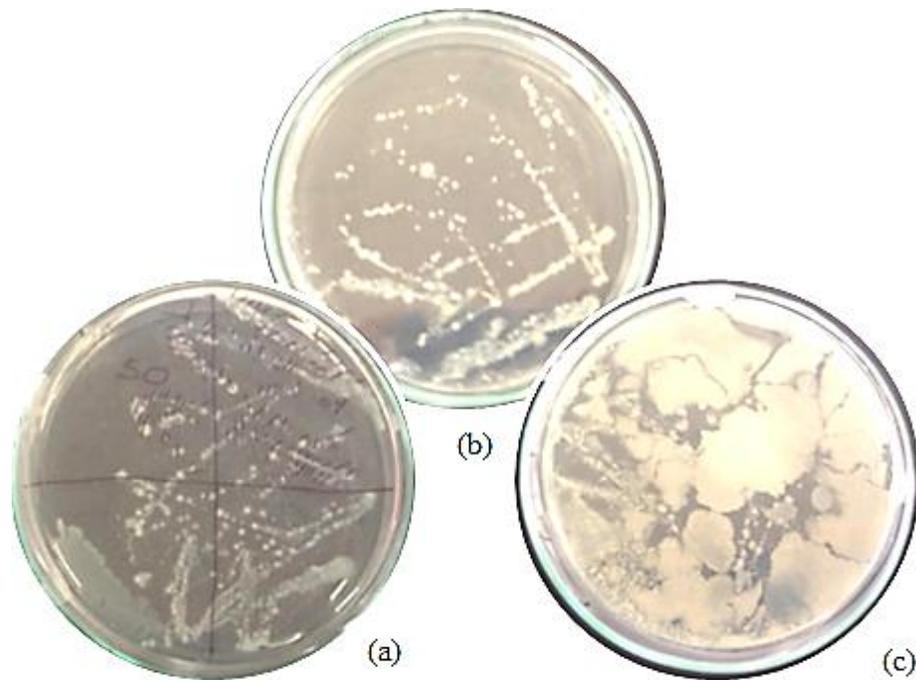


Figura 2.4.4: Resultados microbiológicos de las muestras de carne. (a) Conteo de colonias (b) Placa biopolímero y aceite. (c) Control positivo.

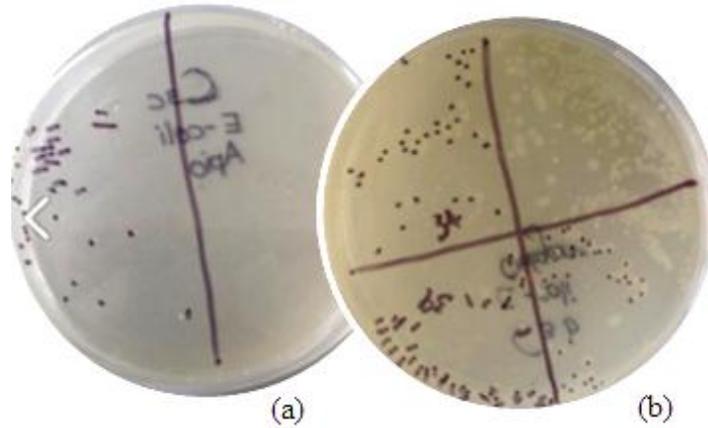


Figura 2.4.5: Recuento de bacterias de ensayos de biopolímero más aceite esencial. (a) E-coli Apio. (b) E-coli Orégano.

## 2.5 Ensayos de flexibilidad

Los biopolímeros formulados con los aceites esenciales, se colocaron a temperatura de refrigeración y congelación por un tiempo de 48 horas, también se colocó un control positivo para poder visualizar los cambios en función de la temperatura de refrigeración.

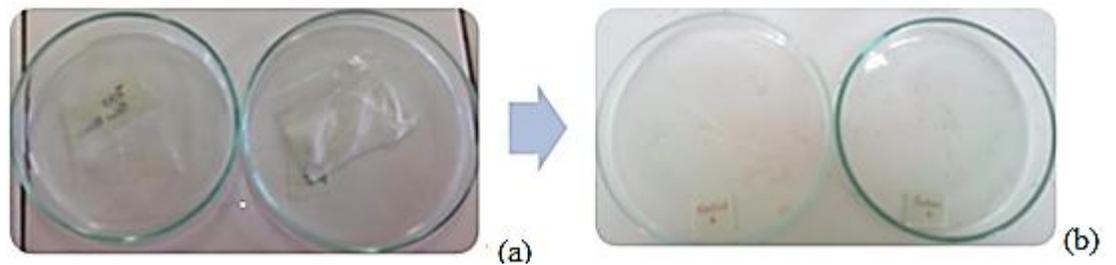


Figura 2.5: Muestras de biopolímeros para pruebas de flexibilidad sometidas a refrigeración y congelación. (a) Biopolímero (b) Control positivo.

## 2.6 Composición de los aceites esenciales

### 2.6.1 Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de masas (CG-MS)

La identificación de los componentes químicos del aceite esencial de Apio y Orégano se realizó por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrómetro de Masas (CG-MS) se hizo mediante un Cromatógrafo de Gases Marce Agilent y la obtención de los espectros de cada compuesto individual. Las respectivas inyecciones se realizaron en las columnas capilares DB-5MS (5%-Fenil-metilpolisiloxano) y HP-INOWAX. (Rosillo, 2012).

El ensayo se realizó en el Instituto de Química de la Universidad Técnica Particular de Loja, Loja.



Figura 2.6.1: Cromatógrafo de Gases Agilent 6890N

### 2.6.2 Preparación de las muestras

Para la preparación de las muestras de aceites esenciales para inyecciones cromatográficas se realizó una dilución (990 $\mu$ l de diclorometano grado HPLC y 10  $\mu$ l de aceite) en un vial. Se prepararon 2 disoluciones con los 2 aceites obtenidos y se hicieron las respectivas corridas cromatográficas.



Figura 2.6.2: Preparación de la muestra para el cromatógrafo de gases Agilent 6890N

### 2.6.3 Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5MS

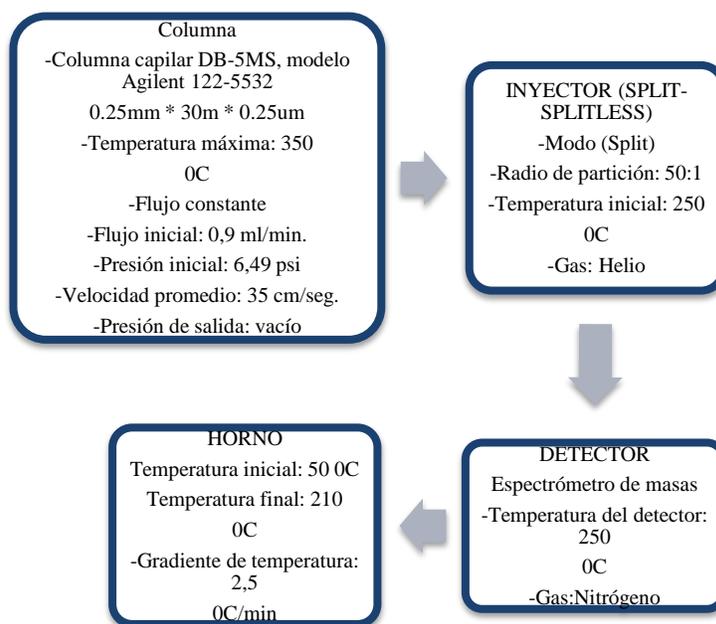


Figura 2.6.3: Condiciones de operación del CG-MS en la columna DB-5MS

Fuente:(Rosillo, 2012).

## 2.6.4 Corridos cromatográficos: condiciones de operación del CG-MS en la columna HP-INNOWAX

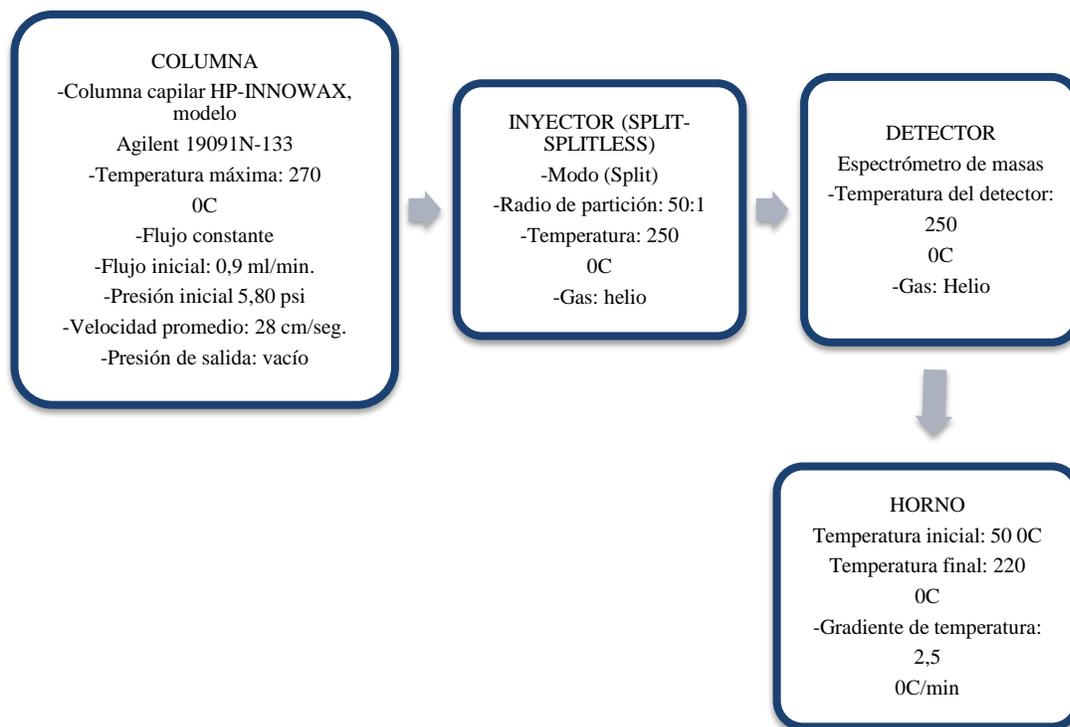


Figura 2.6.4: Condiciones de operación del CG-MS en la columna HP-INNOWAX  
Fuente:(Rosillo, 2012).

## 2.6.5 Obtención del cromatogramas

El cromatograma muestra el tiempo en el cual que eluye cada soluto con solventes y las áreas de los picos señalan la cantidad de cada componente de la mezcla.

La identificación de componentes se realiza por comparación con una biblioteca de compuestos, basados en el patrón de fragmentación del espectro de masas

## CAPÍTULO 3

### RESULTADOS

#### 3.1 Diseño experimental

De acuerdo al número de experimentos realizados del biopolímero, se obtuvo la mejor formulación que fue el experimento número 6, en función a sus características de dureza, flexibilidad y transparencia. Esta formulación fue utilizada para realizar las pruebas de vida útil y ensayos de actividad antimicrobiana. Se tomaron como valores constantes la cantidad de glicerol y sal.

Componente	%
Gelatina	87%
Almidón	20%
A.E Apio/ Orégano	2%
Glicerol	67,5 %
Sal	0,02%

Tabla (3.1) Formulación óptima del biopolímero

### 3.2 Análisis Microbiológico

Los cálculos fueron realizados de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{Inhibición} = 1 - \frac{\text{colonias crecidas en el film}}{\text{colonias de control}} \times 100$$

El biopolímero con adición de aceite esencial de Apio inhibe un 99,9% de bacterias *Escherichia coli*, lo cual indica su efectividad inhibitoria de microorganismos, seguido del biopolímero con aceite esencial de orégano con capacidad inhibitoria de microorganismos como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Aceite Esencial	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Escherichia coli</i>
Apio ( <i>Apium graveolens</i> )	98%	74%	99,9%
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	98,6%	99%	99%
Control Positivo.	NA	NA	NA

Tabla (3.2.1) Pruebas de vida en estante de carne empacadas con los biopolímeros con mezclas de aceites esenciales antimicrobianas

NA: No activo

Los valores son promedios de tres repeticiones expresados en porcentaje.

Luego de haber transcurrido el tiempo de exposición 48 horas del biopolímero a temperatura de refrigeración y congelación, se analizaron las diversas características de flexibilidad y dureza, observando que presento las mejores propiedades el biopolímero que se formuló con el aceite esencial en relación al control positivo.

	Dureza		Flexibilidad	
	Refrigeración	Congelación	Refrigeración	Congelación
<b>Biopolímero</b>	+	+	+	+
<b>Control</b>	-	+	-	+

Tabla (3.2.2) Pruebas de flexibilidad del biopolímero

- +: Conserva sus propiedades originales.
- : No conserva sus propiedades originales.

### 3.3 Análisis de Composición de Aceites Esenciales mediante Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC-MS)

#### 3.3.1 Cromatograma de Aceite de Apio

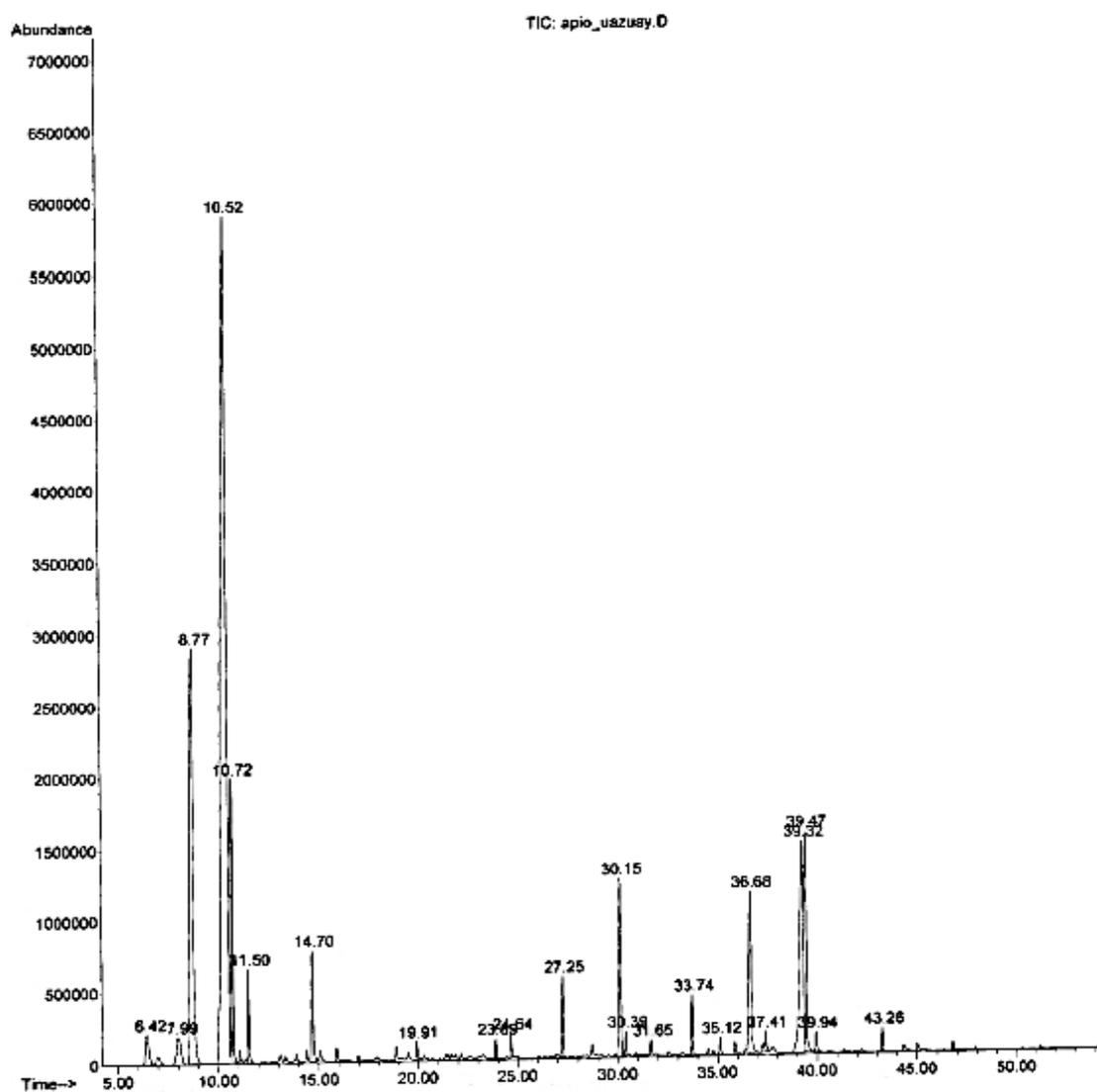


Figura 3.3.1: Cromatograma del aceite esencial de apio (*Apium graveolens*)

N°	Compuesto	%
1	$\alpha$ -pinene	1,34
2	$\beta$ -pinene	1,4
3	$\beta$ -Myrcene	16,13
4	Limonene	46,79
5	$\beta$ -Ocimene	4,06
6	$\gamma$ -terpinene	1,29
7	Alloocimene	1,71
8	Carvone	0,34
9	2-cyclohexen-1-ol	0,26
10	Cis-limonene oxide	0,41
11	Trans-caryophyllene	1,13
12	$\beta$ -selinen	3,15
13	$\beta$ -selinene	0,34
14	Myristicin	0,28
15	Caryophyllene oxide	0,87
16	Myrcene	0,26
17	Butylphthalide	4,69
18	Eudesma	0,36
19	a-selinene	0,34
20	1-hydroxy-2-methylbencene	8,98
21	3-isobutylidenphthalide	5,57
22	Trimethylpyrrole	0,32
23	Neophytadiene	0,32

Tabla (3.3.1) Composición del aceite de apio (*Apium graveolens*)

**Nota:** El número de compuestos de la tabla corresponde al número indicado en el cromatograma.

### 3.3.2 Cromatograma del aceite de Orégano

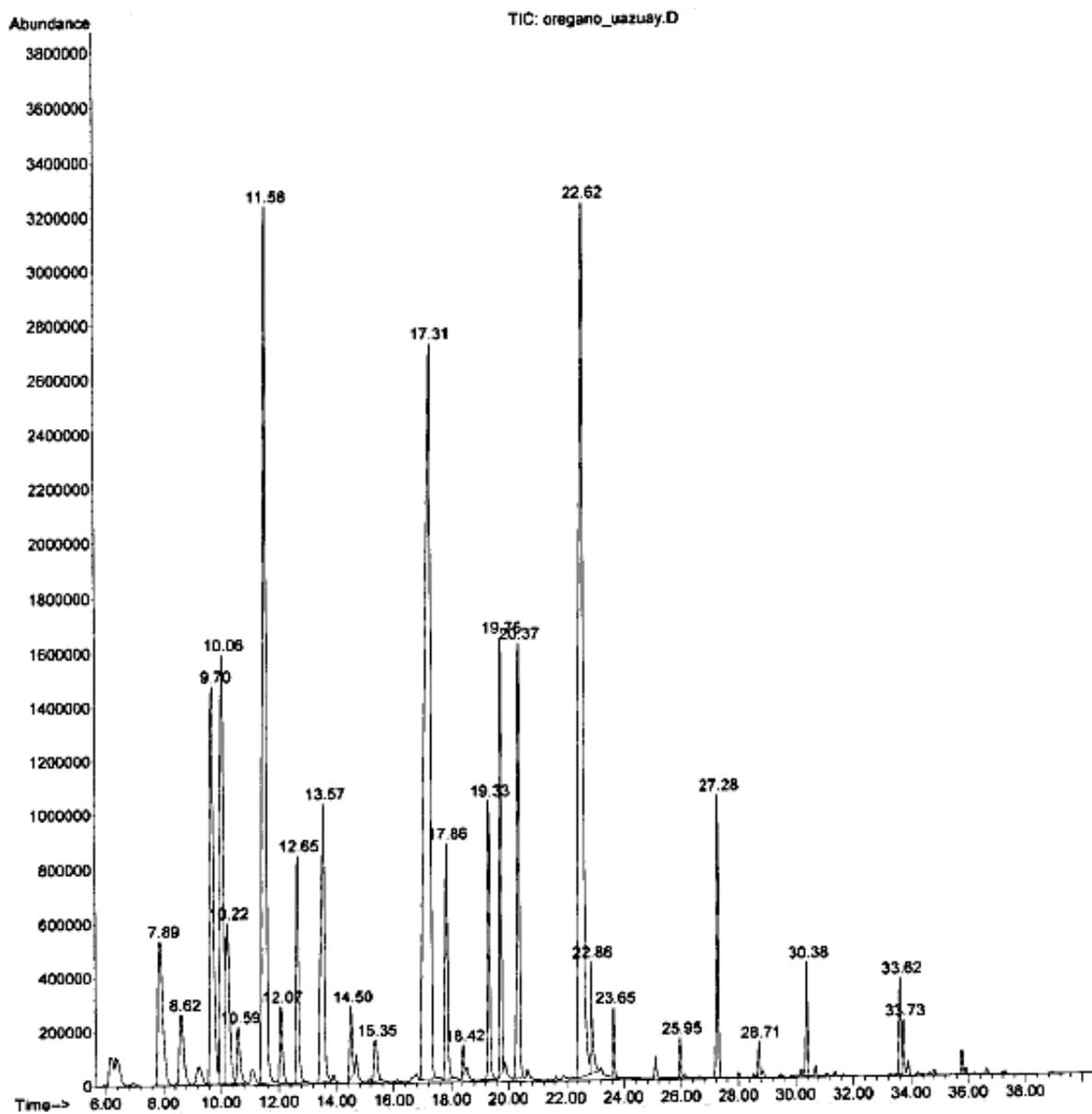


Figura 3.3.2 : Cromatograma del aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare*).

N°	Compuesto	%
1	Sabinene	3,18
2	Myrcene	1,33
3	$\alpha$ -terpinene	7,36
4	p-cymene	6,43
5	Trans-b-ocymene	2,56
6	Cis-ocymene	0,78
7	$\gamma$ -terpinene	13,3
8	Trans-sabinene-hydrate	0,93
9	$\alpha$ -terpinenolene	2,42
10	Linalylacetate	4,91
11	2-cyclohexen-1-ol	0,79
12	Terpinene-1-ol	0,68
13	Terpinene-4-ol	18,63
14	$\alpha$ -terpineol	2,56
15	Trans-piperitol	0,2
16	Thymyl	2,35
17	Carvacrol	3,98
18	$\beta$ -linalool	4,91
19	Thymol	15,91
20	Hydroxy-p-cymene	1,09
21	Camphem	0,53
22	Lavandulylacetate	0,34
23	Trans-caryophyllene	2,51
24	$\beta$ -selinene	0,23
25	Byclogermacren	0,86
26	OH-azepino	0,79
27	Caryophyllene oxide	0,43
28	$\alpha$ -thujene	3,18
29	$\beta$ -myrcene	1,33

Tabla (3.3.2) Composición de aceite de orégano (*Origanum Vulgare*)

**Nota:** El número de compuestos de la tabla corresponde al número indicado en el cromatograma.

## CAPÍTULO 4

### DISCUSIÓN

Es una preocupación general el hecho que los residuos de los envases de alimentos en general es un problema creciente a nivel mundial. Actualmente se enfocan esfuerzos investigativos orientados a extender la vida de estante de los alimentos. No obstante, una estrategia válida es investigar el potencial de materiales biodegradables de fuentes naturales en el desarrollo de envases de alimentos.

El consumo de productos naturales y de calidad se ha orientado a encontrar productos sanos e innovadores. La formulación de biopolímeros con mezclas de aceites esenciales y su potencial antimicrobiana, ofrece una opción en la conservación de alimentos. Estos envases pueden almacenar alimentos sin alterar sus características lo cual, además de satisfacer al consumidor, ayuden a prevenir las enfermedades transmitidas por microorganismos.

Los peligros de la contaminación por bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*, son los riesgos de contaminación más frecuentes en carne, la preocupación por las intoxicaciones por la carne contaminada es un tema prioritario después de algunos brotes significativos. Estos brotes causan enfermedades en el ser humano, presentan síntomas como: diarrea, dolor abdominal y vomito. (Agrimundo, 2013)

Dutta, Tripathi & Dutta (2012) reportaron la formulación de películas antimicrobianas de quitina, quitosano y sus oligosacáridos para usos en alimentos. Esta investigación se realizó debido a los recientes brotes de contaminación asociados a los alimentos. Igualmente se reportó el desarrollo de empaques biodegradables a partir de gelatina y

almidón de yuca; que presentan capacidad antimicrobiana y la flexibilidad adecuada para su uso en alimento.

Aguirre *et al.*, (2013) reportaron las propiedades de empaques antimicrobianos aplicados en alimentos. En este trabajo no se incluyen ensayos de eficiencia de envasado de productos cárnicos. En literatura se encuentran pocos trabajos con un ensayo que permite evaluar el efecto de una película biodegradable en la conservación de cárnicos. En nuestro modelo experimental se escogió la carne cruda por ser un sustrato susceptible a contaminación por bacterias en con un tiempo relativamente corto y con gran carga bacteriana.

Los resultados obtenidos permiten evidenciar la factibilidad del desarrollo de un empaque activo, que representen una alternativa viable en nuestro país; con usos potenciales en el envasado de productos cárnicos.

Según Rodríguez (2011) el uso de agentes antimicrobianos en la conservación de frutas y hortalizas, es una alternativa viable. Se destaca la capacidad inhibitoria del aceite esencial de orégano ante bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*.

Seydim & Sarikus (2006) reportaron que los empaques que contiene 1% de aceite esencial de orégano no fueron eficaces contra los microorganismos de prueba y la cantidad mínima de aceite esencial de orégano que mostró inhibición fue del 2% para las pruebas ante: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En relación a los resultados obtenidos en la presente investigación, se utilizó la dosis del 2% de aceite esencial, siendo nuestros resultados acordes con los reportados por Seydim y Sarikus.

El efecto antibacteriano del orégano se debe a la elevada concentración de carvacrol y *p*-cymene. Dadalioglu & Evrendilek (2004). En la presente investigación se obtuvieron 3.98% de carvacrol y 6.43% de *p*-cymene, en relación a Bonfantiet *al.*, (2012) los valores reportados fueron de 2,49 % de carvacrol y 0,11% *p*-cymene.

En otras publicaciones sobre la composición química del aceite esencial de *Origanum vulgare*, informan diferente composición según su proceso de extracción y el lugar de

recolección de la muestra. (*Bonfantiet al., 2012*). En el presente trabajo se obtuvo valores altos en los siguientes compuestos: 15,91% thymol, 13,3%  $\gamma$ -terpinene, 7,36%  $\alpha$ -terpinene, 6,43% p-cymene, 4,91%  $\beta$ -linalool, 3,98% carvacrol, 2,56%  $\alpha$ -terpineol.

En cuanto a la composición química del aceite esencial de apio, en nuestra investigación se encontraron los siguientes compuestos: 16,13% Myrcene, 46,79% Limonene, 4,06% b-ocimene que no coinciden según Bjeldanes *et al.*, Kim (1976) reportaron en su composición 3-n-butyl phthalide y sedanolide.

La presente investigación genera bases para la investigación e innovación en el desarrollo de biopolímeros. Es de importancia tener en cuenta todos los impactos ambientales asociado con el ciclo de vida del producto; además de fortalecer el sustento de nuevas investigaciones que se enfoquen en el mejoramiento de las características de envases activos.

Se recomienda que este proyecto sea transferido a las empresas dedicadas a la elaboración de productos cárnicos, las mismas que podrán utilizar este tipo de empaque biodegradable; pues su aplicación disminuirá el uso de aditivos químicos y la conservación del producto será mucho mayor incrementado el valor agregado de productos alimenticios.

## CONCLUSIONES

La presente investigación concluye en lo siguiente:

1. Mediante estrategias de diseño experimental se logró desarrollar biopolímeros enriquecidos con aceites esenciales con el fin de inhibir el crecimiento microbiano, ante muestras cárnicas.
2. De acuerdo a los resultados microbiológicos; se comprueba que los biopolímeros pueden inhibir eficazmente el crecimiento de las bacterias: *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*. Este resultado fundamenta su uso como empaque de alimentos destinado a proteger de la contaminación microbiana durante procesos de manipulación y alargar su tiempo de vida útil.
3. El uso de empaque activos puede reducir el riesgo de enfermedades transmitidas por alimentos asociados con microorganismos, señalando a los biopolímeros como opción válida para el desarrollo de empaques activos.
4. Los compuestos antimicrobianos de los aceites esenciales con sus componentes principales carvacrol, p-cymene, linalool, thymol, terpinene-4-ol, limonene,  $\beta$ myrcene, 1-hydroxy-2-methylbenzene, 3-isobutylidenphthalide están adaptados para su utilización en alimentos, debido a la naturaleza de las bacterias sensibles a los aceites esenciales, eso justifica su uso como conservantes antimicrobianos y poder sustituir gradualmente el uso de aditivos químicos.
5. Será una alternativa de solución a la gran contaminación generada por plásticos sintéticos; además, se ofrecerá a los consumidores la posibilidad de acceder a alimentos libres de preservantes químicos y con mejor vida de estante utilizados en la conservación de productos cárnicos.

6. El biopolímero obtenido demuestra que puede ser utilizado a temperaturas de congelación y refrigeración ya que conserva todas las propiedades del empaque y se adhiere fácilmente al producto.
7. La fabricación de películas biodegradables para productos cárnicos, a partir de biopolímeros con mezclas de aceites esenciales antimicrobianos, se puede utilizar a nivel de la industria de alimentos mejorando cada uno de los estándares de calidad de los productos y alargando su tiempo de vida útil, además de su bajo costo para la elaboración en relación a los plásticos sintéticos.
8. El desarrollo de esta investigación demuestra que puede impactar positivamente, a mediano plazo, en el público consumidor de alimentos y en los productores de especies vegetales productoras de aceites esenciales. De la misma manera esta iniciativa puede ser abordada por la industria de alimentos ecuatoriana para mejorar la tecnología actual de envases y disminuir la afectación al medio ambiente que se realiza con los empaques de alimentos tradicionales.

## RECOMENDACIONES

El desarrollo de la presente investigación permite realizar las siguientes recomendaciones para futuros estudios en esta línea de investigación.

- Durante el proceso de elaboración de las películas biodegradables; dentro de los factores que se deben tomar en cuenta para la incorporación de los aceites esenciales a las películas y/o recubrimientos se encuentran: las propiedades de los aceites esenciales, los materiales de empaque y del alimento a utilizar como modelo de conservación.
- Son importantes las condiciones de proceso de elaboración de los empaques, las interacciones entre los agentes antimicrobianos y las sustancias e ingredientes formadoras de películas, la temperatura de mezclado y secado, así como el costo e inocuidad de los agentes antimicrobianos.
- Se recomienda realizar análisis microbiológicos con otras bacterias que se encuentran presentes en carnes y comprobar totalmente la efectividad de los empaques biodegradables en carnes, estos ensayos deben acompañarse con un estudio de biodegradación de la película.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### Bibliografía:

AGUIRRE, a., BORNEO, R., & LEÓN, a. E. (2013). Antimicrobial, mechanical and barrier properties of triticale protein films incorporated with oregano essential oil. *Food Bioscience*, 1, 2–9. doi:10.1016/j.fbio.2012.12.001

ALBADO, E. SAEZ, G. ATAUCUSI, G. (2001). “Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano)” *Rev Med Hered* 12 (1), 2001

BONFANTI, C., Iannì, R., MAZZAGLIA, A., LANZA, C. M., NAPOLI, E. M., & Ruberto, G. (2012). Emerging cultivation of oregano in Sicily: Sensory evaluation of plants and chemical composition of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 160–165. doi:10.1016/j.indcrop.2011.06.029

BURT, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *International journal of food microbiology*, 94(3), 223–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022

CAMACHO E. , VEGA Baudrit, J., & CAMPOS GALLO, A. (2011). Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Rev. Soc. Quím. Perú*, 77(4), 292-306.

CORRALES, M. (2007). Síntesis y Caracterización de un Polímero Biodegradable a partir del Almidón de Yuca, 57–67.

SERNA. L, & ALBÁN, F. (2003). Ácido Poliláctico ( PLA ): Propiedades y Aplicaciones, (1), 16–26.

DANM, G., & Materiales, N. (2009). Congreso SAM / CONAMET 2009 Buenos Aires , 19 al 23 de Octubre de 2009 Obtención de un Biopolímero Conductor a Partir de Almidón de Yuca. Congreso SAM / CONAMET 2009 Buenos Aires , 19 al 23 de Octubre de 2009, (1), 2059–2063.

DURANGO, A. SOARES. N, ARTEAGA, M. (2011) “Filmes y Revestimientos Comestibles como Empaques Activos Biodegradables en la Conservación de Alimetos. *SciELO* Vol 9 N<sup>o</sup>1 (112 -118) Enero-Junio 2011

DUTTA, J., TRIPATHI, S., & DUTTA, P. K. (2012). *Progress in antimicrobial activities of chitin, chitosan and its oligosaccharides: a systematic study needs for food applications*. *Food science and technology international = Ciencia y tecnología de los alimentos internacional* (Vol. 18, pp. 3–34). doi:10.1177/1082013211399195

ENRÍQUEZ, M. VELASCO, R. ORTIZ, V. (2012) “Composición y Procesamiento de Películas Biodegradables Basadas en Almidón” *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* Vol 10 No. 1 (182 - 192) Enero - Junio 2012

ELIZONDO, M. C., & Gallo, A. C. (2011). Use of nanomaterials in biopolymers for food, *77*(4), 292–306.

ESCUADERO, L. (2011) Determinación de la Biodegradabilidad y Toxicidad de Materiales Plásticos. Ingeniero Técnico Industrial. Colombia, Universidad Politécnica de Cartagena.

ESPERANZA, D. (2009) Estudio de la Producción de Empaques Plásticos Biodegradables a partir de Bioresinas. Ingeniero Químico. Venezuela. Universidad Industrial de Santander.

ESPINOZA, J. y NARANJO, T. (2013) Obtención de Combustibles a partir de Residuos Sólidos Plásticos Mediante el Proceso de Pirolisis. Tesis de Ingeniería. Cuenca, Universidad Politécnica Salesiana.

FARHANA, G. MUBARAK, A. SUSHANTA, G. RUHUL, A. RUSSEL, A. MAZID, A. SARWARUDDIN, C. (2010) “Effect of Urea on the Mechanical Properties of Gelatin Films Photocured with 2-Ethylhexyl Acrylate” *Springer Science+Business Media*, 18:224–230

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C., GIMÉNEZ, B., LÓPEZ-CABALLERO, M. E., & MONTERO, M. P. (2011). Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8), 1813–1827. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.02.007

GUL-E-NOOR, F., KHAN, M. a., GHOSHAL, S., KHAN, R. a., MAZID, R. a., & SARWARUDDIN CHOWDHURY, a. M. (2010). Effect of Urea on the Mechanical Properties of Gelatin Films Photocured with 2-Ethylhexyl Acrylate. *Journal of Polymers and the Environment*, 18(3), 224–230. doi:10.1007/s10924-010-0172-5

HERNÁNDEZ-OCHOA, L., AGUIRRE-PRIETO, Y. B., NEVÁREZ-MOORILLÓN, G. V., GUTIERREZ-MENDEZ, N., & SALAS-MUÑOZ, E. (2011). Use of essential oils and extracts from spices in meat protection. *Journal of Food Science and Technology*, (Burt 2004). doi:10.1007/s13197-011-0598-3

KUORWEI, K. K., CRAN, M. J., SONNEVELD, K., MILTZ, J., & BIGGER, S. W. (2011a). Essential oils and their principal constituents as antimicrobial agents for

synthetic packaging films. *Journal of food science*, 76(9), R164–77. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02384.x

KUORWEL, K. K., CRAN, M. J., SONNEVELD, K., MILTZ, J., & BIGGER, S. W. (2011b). Antimicrobial activity of biodegradable polysaccharide and protein-based films containing active agents. *Journal of food science*, 76(3), R90–R102. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02102.x

LUCKACHAN, G. E., & PILLAI, C. K. S. (2011). Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. *Journal of Polymers and the Environment*, 19(3), 637–676. doi:10.1007/s10924-011-0317-1

MENESES, J. CORRALES, C. VALENCIA, M. (2007) “Síntesis y Caracterización de un Polímero Biodegradable a Partir del Almidón de Yuca” Revista EIA, ISSN 1794-1237 Número 8, p. 57-67. Diciembre 2007

MISHARINA, T. A., & POLSHKOV, A. N. (2005). Antioxidant Properties of Essential Oils : Autoxidation of Essential Oils from Laurel and Fennel and of Their Mixtures with Essential Oil from Coriander, 41(6), 610–618.

MOSCOW, M. (1981) “ Polymer reviews: The structure and properties of solid gelatin and the principles of their modification” *Elsevier* Volumen 24, Número 6 , Pages 651-666

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD., (2012) Análisis Sectorial de Residuos Sólidos Ecuador. Ecuador, Organización Panamericana de la Salud.

ORTIZ, M, (2012) Caracterización Mecánica, Termodinámica y Morfoestructural de Biopelículas Nanoestructuradas. Maestría en Ciencias en Desarrollo de Productos Bióticos. Mexico. Instituto Politécnico Nacional

PAPAMICHAIL, V. & LOULI, K. MAGOULAS (2000) “Supercritical fluid extraction of celery seed oil” *Journal of Supercritical Fluids* 18 (2000) 213 – 226

PARDO, L.; MENÉNDEZ, J, GIRAUDO, M.” Envases Biodegradables: una necesidad de compromiso” *La Alimentación Latinoamericana* N° 292, 2011

RANGEL, S., HERNÁNDEZ, M., SILVA, R., RUELAS, X., Universidad, R. L., Agraria, A., ... Fax, T. (2008). Aplicación del aceite esencial de orégano (, (1), 2–3.

RODRÍGUEZ, M. ALCARAZ, L. Real, S. (2012). “Procedimiento para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas”. Proyecto Sagarpa-Conacyt 126183

ROSILLO, M. (2012) Determinación fisicoquímica y evaluación de la actividad biológica del aceite esencial de *Baccharis latifolia* ( Asteraceae) de la Provincia de Loja. Tesis de Bioquímica y Farmacia. Loja, Universidad Particular de Loja. based edible films

incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39(5), 639–644. doi:10.1016/j.foodres.2006.01.013

SIERRA, N., PLAZAS, C. E., GUILLÉN, L. F., & RODRÍGUEZ, P. A. (2010). Protocolo para el control de calidad de envases de plástico , utilizados en la industria farmacéutica , de cosméticos y de alimentos Resumen Quality control guide of the packing employed in the Introducción, 39(2), 149–167.

SILVA, G. SOBRAL, P. CALVALHO, R. BERGO, P. TABOADA, M. (2008) “Biodegradable Films Based on Blends of Gelatin and Poly (Vinyl Alcohol): Effect of PVA Type or Concentration on Some Physical Properties of Films” Springer Science+Business Media, LLC 2008

SOWBHAGYA, H. B., SAMPATHU, S. R., & KRISHNAMURTHY, N. (2007). Evaluation of size reduction on the yield and quality of celery seed oil. *Journal of Food Engineering*, 80(4), 1255–1260. doi:10.1016/j.jfoodeng.2006.09.019

SOWBHAGYA, H. B., SRINIVAS, P., & KRISHNAMURTHY, N. (2010). Effect of enzymes on extraction of volatiles from celery seeds. *Food Chemistry*, 120(1), 230–234. doi:10.1016/j.foodchem.2009.10.013

TONGDEESOONTORN, W., MAUER, L. J., WONGRUONG, S., SRIBURI, P., & RACHTANAPUN, P. (2011). Effect of carboxymethyl cellulose concentration on physical properties of biodegradable cassava starch-based films. *Chemistry Central journal*, 5(1), 6. doi:10.1186/1752-153X-5-6

VALAREZO, M. (2012) Desarrollo de Biopolímeros a partir de Corteza de Yuca. Tesis de Ingeniería. Loja, Universidad Técnica Particular de Loja.

### **Referencias electrónicas.**

AGRIMUDO, (2013) . Riesgos de Contaminación con E. coli en carne ablandada mecánicamente. [En línea]. Disponible en: <http://www.agrimundo.cl/?p=21875>, Fecha de consulta: 15/12/2013.

CEDRÓN, J. LANDA, V. ROBLES, J. (2011) Química General. Material de enseñanza. Lima: Pontificia Universidad Católica del Perú. [En línea], Disponible en: <http://corinto.pucp.edu.pe/quimicageneral/unidades/unidad-8-materiales-modernos>, Fecha de consulta: 12/10/2013.

EDUCARCHILE, (2007). Polimeros Sintéticos y Naturales. [En línea], Disponible en: <http://www.educarchile.cl/ech/pro/app/detalle?GUID=956d0e27-85f4-48ec-bd90-137b6963f06c&ID=136400>, Fecha de consulta: 13/08/2013.

GARCÍA, Alejandro. (2009). Estadísticas de Contaminación por Plástico. [En línea]. Disponible en <http://tradecorpreciclaje.blogspot.com/2009/06/estadisticas-de-contaminacion-por.html>, Fecha de consulta: 20/05/2013.

SLOW Fish., (2011) “La contaminación” [En línea]. Disponible en [http://www.slowfood.com/slowfish/pagine/esp/pagina.lasso?-id\\_pg=46](http://www.slowfood.com/slowfish/pagine/esp/pagina.lasso?-id_pg=46), Fecha de consulta: 16/05/2013.