

**Desarrollo, caracterización y validación de un
bioplástico reforzado con orégano con acción
antifúngica contra alternaria (*Alternaria
alternata*)**

Alendy Cesar

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Desarrollo, caracterización y validación de un
bioplástico reforzado con orégano con acción
antifúngica contra alternaria (*Alternaria
alternata*)**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Alendy Cesar

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2018

Desarrollo, caracterización y validación de un bioplástico reforzado con orégano con acción antifúngica contra alternaria (*Alternaria alternata*)

Alendy Cesar

Resumen. Los biopolímeros han generado mucho interés en la industria de los plásticos y en la sociedad debido a la reducción en el impacto ambiental. Los revestimientos a base de biopolímeros le confieren ciertos aspectos a los productos que los consumidores valoran. Durante la última década, los revestimientos han servido como vehículo para incorporar sustancias como: vitaminas, antioxidantes, sustancias antimicrobianas y antifúngicas. El objetivo de este estudio fue elaborar un bioplástico con orégano, utilizando el método de casting y evaluar su efecto en las propiedades físicas y como antifúngico. Se utilizó la metodología superficie de respuesta definiendo como variables independientes la concentración de orégano y proporción de almidones de maíz con respecto al de yuca. Las variables dependientes fueron: grosor, propiedades de barrera, propiedades ópticas y mecánicas. La adición de orégano en polvo presentó un efecto positivo en las propiedades óptica y antifúngicas. Se generaron seis regresiones matemáticas: cuatro de carácter tendencioso y dos de carácter predictivo. La combinación que optimizó las propiedades de los bioplásticos corresponde a 1.7% de orégano y una relación de 77.60 y 22.40% de almidón de maíz/yuca, respectivamente. Las películas con mayor concentración de orégano presentaron mayor diámetro de inhibición del hongo patógeno.

Palabras clave: Biopelículas, carvacrol, compuesto, glicerol.

Abstract. Biopolymers have generated a lot of interest in the plastics industry and in the society due to the reduction in the environmental impact. Coatings based on biopolymer give certain aspects to the products that consumers value. During the last decade, coatings have served as vehicles to incorporate substances such as: vitamins, antioxidants, antimicrobials and antifungals. The objective of this study was to elaborate a bioplastic with oregano, using the casting method and to evaluate its effect on the physical properties and its antifungal effect. The response surface methodology was used, defining as independent variables the concentration of oregano and the proportion of corn starch with respect to cassava starch. The dependent variables or response evaluated were: thickness, barrier properties, optical properties and mechanical properties. The addition of oregano powder had a positive effect on the optical and antifungal properties. Six mathematical regressions were generated: four of tendentious character and two of predictive character. The combination that optimized the properties of the bioplastics were 1.7% of oregano and a ratio of 77.20 and 22.40% of corn starch / cassava, respectively. The films with the highest concentration of oregano had a greater diameter of inhibition of the pathogenic fungus.

Key words: Bioplastics, carvacrol, composite, glycerol.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros, Figuras y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
4. CONCLUSIONES	28
5. RECOMENDACIONES	29
6. LITERATURA CITADA.....	30
7. ANEXOS	34

ÍNDICE DE CUADROS, FIGURAS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Equipo utilizado para elaborar y analizar los bioplásticos.	3
2. Niveles codificados de las variables del experimento.	5
3. Diseño experimental completo con valores codificados y decodificados.	6
4. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en el grosor en mm de los bioplásticos.	10
5. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para grosor de bioplástico.	11
6. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la opacidad a 500 nm de los bioplásticos.	11
7. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para opacidad de bioplástico.	12
8. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la diferencia de color de los bioplásticos.	14
9. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para diferencia de color de bioplástico.	15
10. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la resistencia en Newton/mm (N/mm) de los bioplásticos.	16
11. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para la resistencia a la perforación de bioplástico.	17
12. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la fuerza de tensión en Newton de los bioplásticos.	18
13. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para fuerza de tensión de bioplástico.	19
14. Módulo de elasticidad de bioplásticos con variables de combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca.	21
15. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para módulo de elasticidad de bioplástico.	21
16. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la solubilidad en agua (%) de los bioplásticos.	22
17. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para solubilidad de bioplástico.	23
18. Permeabilidad a vapor de agua en g.mm/h.m ² .kPa de los bioplásticos con los variables de combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca. ..	24
19. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para permeabilidad a vapor de agua de bioplástico.	25

Cuadros	Página
20. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en el diámetro de inhibición en centímetros contra <i>Alternaria alternata</i>	27

Figuras	Página
1. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la opacidad de los bioplásticos.....	13
2. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la diferencia de color de los bioplásticos.....	15
3. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la resistencia a la perforación de los bioplásticos.	17
4. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la fuerza de tensión de los bioplásticos.	20
5. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la solubilidad de los bioplásticos.....	23
6. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la permeabilidad a vapor de agua de los bioplásticos.	25
7. Valores óptimos de las variables independientes sobre las propiedades ópticas, mecánicas y de barrera de un bioplástico con orégano y combinación de almidón de maíz y yuca.	26

Anexos	Página
1. Conteo de esporas en cámara Neubauer.....	34
2. Espectrofotometría de las películas de almidón de yuca y maíz con diferentes concentraciones de orégano.....	34
3. Zona de inhibición de bioplásticos con diferentes concentraciones de orégano.	35

1. INTRODUCCIÓN

Las frutas y hortalizas poseen una corta vida de anaquel y es que su calidad no deja de disminuir una vez que son cosechadas. Para solucionar dicho problema se han utilizado sustancias químicas que se pueden aplicar de forma directa o a través de un vehículo como bioplásticos. Los biopolímeros han generado mucho interés en la industria de los plásticos y en la sociedad debido a la reducción en el impacto ambiental que tienen. Un biopolímero puede cumplir las mismas funciones que un polímero a base de petróleo; sin embargo, lo que le da valor agregado a este producto es que no contamina el ambiente y es fabricado a base de recursos renovables o biodegradables. Una de las técnicas actuales para la aplicación de los biopolímeros en frutas y hortalizas es el revestimiento (Vásquez-Briones 2013).

El revestimiento con biopolímeros ha tomado una importancia muy grande en la industria alimentaria ya que puede potencialmente alargar la vida útil de las frutas y además les confiere un aspecto brillante el cual es muy valorado por los consumidores (Alvarez 2012). Existen diferentes técnicas para producir biopolímeros como: casting, prensado, moldeado, y extrusión termoplástica. Durante la última década, los revestimientos han servido como vehículo para incorporar sustancias como: vitaminas, antioxidantes, sustancias antimicrobianas y antifúngicas. Sin embargo, los polímeros hidrocoloidales presentan dos grandes desventajas que son: su permeabilidad a la humedad y son poco resistentes al manejo mecánico. Consecuentemente, los investigadores han enfocado sus estudios para determinar cómo mejorar las propiedades mecánicas de dichos biopolímeros (Durango *et al.* 2011).

Los almidones tienen un alto potencial para su aplicación como plásticos biodegradables a pesar de su alta permeabilidad al vapor de agua. Para mejorar las propiedades mecánicas y de barrera de las películas de almidón, se puede incorporar nanocompuestos en la matriz, proteínas, fibras, y arcillas (González *et al.* 2016). Los compósitos refuerzan las películas debido a su gran área interfacial, lo cual ayuda a cambiar la movilidad molecular y consecuentemente las propiedades mecánicas y de barrera del polímero (Kamperepappum *et al.* 2007).

El mango se clasifica dentro de los cinco frutos tropicales más finos. La producción de mango al nivel mundial se estima en 92.2 millones de toneladas y representa el 51% de la producción de las principales frutas tropicales (FAO 2017). Sin embargo, los índices de pérdidas post cosecha son altos. Se reporta hasta un 50% de daños causados por microorganismos a pesar de los esfuerzos realizados con la ayuda de la tecnología (López *et al.* 2013). Uno de los principales hongos fitopatógenos que afecta al mango durante la postcosecha es la *Alternaria alternata*. Este hongo causa una enfermedad conocida como

la mancha negra del fruto. Los frutos se oscurecen y la pulpa se ablanda a medida las manchas penetran la cáscara. Esto provoca una mala apariencia en la fruta y consecuentemente el rechazo inmediato por parte del consumidor (Sullon 2012).

El uso de productos naturales en la conservación de alimentos ha incrementado en la última década. Los aceites esenciales de ciertas hierbas como (orégano, tomillo, canela, entre otros) han sido utilizados para contrarrestar los efectos dañinos de ciertos microorganismos. El orégano contiene dos componentes químicos (carvacrol y timol) que actúan como agentes inhibidores de bacterias y hongos (García-Camarillo *et al.* 2006).

Esta investigación tuvo como objetivo formular un biopolímero utilizando una mezcla de almidón de maíz y tapioca, glicerol y orégano deshidratado además de evaluar el efecto antifúngico de este último.

Se definieron los siguientes objetivos específicos:

- Determinar la combinación de almidón, glicerol y orégano que optimice las propiedades mecánicas y de barrera del bioplástico.
- Evaluar las propiedades antifúngicas de las hojas de orégano aplicado a un biopolímero.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio.

Los experimentos se realizaron en la Escuela Agrícola Panamericana Zamorano, Honduras. Los bioplásticos se elaboraron en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano (LAAZ) y la evaluación de susceptibilidad se realizó en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano (LMAZ).

Obtención del orégano en polvo.

El orégano fue adquirido de la unidad de agricultura orgánica de la Escuela Agrícola Panamericana. Las hojas fueron secadas en el horno a 50 °C por 24 horas según la metodología propuesta por Velásquez-Santos y Acevedo-Álvarez (2014) con adaptaciones. Una vez secado, el orégano se trituró utilizando un molino de rodillo. Posterior al triturado, se tamizó el compósito con la ayuda de un juego de tamices de 850 micras. Finalmente, el orégano en polvo se almacenó en una bolsa plástica a temperatura ambiente. Los equipos utilizados para la elaboración de los bioplásticos se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Equipo utilizado para elaborar y analizar los bioplásticos.

Equipo	Marca/Modelo
Texturómetro	BROOKFIELD CT3 4500
Estufa agitador	Barnstead Thermolyne
Cámara de estabilidad	NORLAKE Scientific
Balanza analítica	OHAUS ADVENTURER
Colorímetro	Colorflex Hunterlab
Espectrofotómetro	Agilent Tech

Elaboración de los bioplásticos.

Para elaborar los filmes se realizaron pruebas preliminares para determinar: la cantidad de glicerol (% peso/volumen), la proporción de mezcla de almidón de maíz (AM) y almidón de yuca (AY), la cantidad de orégano y agua a utilizar. Se diluyó 5 ml de glicerol con agitación magnética constante en dos tercios de agua destilada del volumen total (100ml) hasta alcanzar una temperatura de 65 °C. Paralelamente se procedió a mezclar, en una placa de calentamiento a temperatura ambiente, el resto del agua con el almidón y el orégano. Posteriormente, se agregó la mezcla con almidón a la solución de glicerol. Se calentó y se agitó la mezcla de almidones y glicerol a 65 ± 2 °C. Al iniciar la gelatinización de los almidones se sacó el vaso de precipitado de la placa de calentamiento y se enfrió la solución a 50 °C.

Finalmente se vertieron 30 ± 0.5 g de solución filmogénica en platos Petri de plástico de 169 cm^2 . Los films o biopelículas se secaron en una cámara de estabilidad a 33 ± 2 °C y 55% de humedad relativa durante 24 horas. Al finalizar el secado, las biopelículas fueron separadas de los platos manualmente y almacenadas por 7 días en un desecador a temperatura ambiente (25 °C) con una solución saturada de hidróxido de sodio al 60%.

Diseño experimental.

Para evaluar el efecto combinado de los polímeros y orégano como sustancia antifúngica, se utilizó una metodología experimental basada en el análisis de superficie respuesta con una probabilidad de significancia del 10% (Box *et al.* 1978). Los parámetros del proceso fueron establecidos como variables independientes estudiadas en tres niveles codificados como -1,0, 1, y se calcularon de acuerdo a la ecuación 1:

$$x_i = [(X_i \times Z) / \Delta x_i] \quad [1]$$

Dónde:

x_i : Valor codificado de la variable x_i

X_i : el valor real de la variable

Z: valor real de la variable en el punto central

Δx_i : intervalo de la variable x_i

Este modelo presenta dos niveles de variables axiales, que son codificadas como $+\alpha$ y $-\alpha$. El valor de α depende del número factorial ($F=2^k$) del diseño y del número de variables independientes ($K=2$), en el caso de este experimento se definió según la ecuación 2:

$$\pm \alpha = (f)^{1/4} = (2^k)^{1/4} = (2^2)^{1/4} = 1.4142 \quad [2]$$

Para calcular el número de tratamientos se utilizó un diseño factorial completo con la ecuación 3.

$$n = 2^k + 2k + m \quad [3]$$

Dónde:

2^k = número de puntos factoriales

$2k$ = número de puntos axiales

m = número de repeticiones del punto central.

De esta manera, los tratamientos se distribuirán de la siguiente manera:

$2^k = 2^2 = 4$ puntos factoriales

$2k = 2 \times 2 = 4$ puntos axiales

$m =$ 4 replicados del punto central
12 unidades experimentales

La amplitud en el rango de las variables se determinó según los resultados de las pruebas preliminares, literatura consultada y experiencia del investigador. Para analizar los resultados se usó un modelo que describe el comportamiento de la variable independiente (Y_i) o respuesta, en función de las variables dependientes (X^k). La respuesta fue evaluada

en función de los niveles en que los factores fueron combinados. La variable independiente fue definida por la ecuación 4, según Humberto y Román (2008).

$$Y_i = F(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad [4]$$

Para predecir el comportamiento de cada variable se realizó un análisis de regresión ajustada con un polinomio cuadrático con las variables (X_k) para cada respuesta (Y). La ecuación [5] se utilizó para predecir cada respuesta.

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon \quad [5]$$

Dónde:

Y_i = Función respuesta;

X_1, X_2 = Valores de las variables independientes;

B_0 = Coeficiente relativo a la interpretación del plan con la respuesta en el eje;

B_1, B_2, B_3 = Coeficientes lineales estimados por el mínimo cuadrado;

B_{11}, B_{22}, B_{33} = Coeficientes de variables cuadráticas;

B_{12}, B_{13}, B_{22} = Coeficiente de interacción entre las variables independientes;

ε = Error experimental.

En el cuadro 2 se presentan los niveles codificados (-1, 0, +1) y los valores axiales ($-\alpha$ y $+\alpha$). Posteriormente, se describen los niveles codificados y los valores reales de los tratamientos a evaluar en el cuadro 3.

Cuadro 2. Niveles codificados de las variables del experimento.

Variables Independientes	Niveles				
	- α	-1	0	1	+ α
% Orégano	0.00	0.90	3.00	5.10	6.00
% AM:AY*	67.90	70.00	75.00	80.00	82.10

*Hace referencia a la proporción de almidón de maíz (AM) el restante es almidón de yuca (AY)

Cuadro 3. Diseño experimental completo con valores codificados y decodificados.

Tratamientos	Niveles reales de variables			
	% Orégano	Almidón Maíz/Yuca	Almidón Maíz/ Yuca	% Orégano
1	-1.00	-1.00	70:30	0.90
2	-1.00	1.00	80:20	0.90
3	1.00	-1.00	70:30	5.10
4	1.00	1.00	80:20	5.10
5	-1.41	0.00	75:25	0.00
6	1.41	0.00	75:25	6.00
7	0.00	-1.41	67.9:22.1	3.00
8	0.00	1.41	82.1:17.9	3.00
9 ©	0.00	0.00	75:25	3.00
10 ©	0.00	0.00	75:25	3.00
11 ©	0.00	0.00	75:25	3.00
12 ©	0.00	0.00	75:25	3.00

© Puntos centrales

Caracterización de bioplástico.

Después de la etapa de acondicionamiento, a los filmes se les realizaron análisis físicos para determinar las propiedades mecánicas (perforación y elongación), de barrera (permeabilidad y solubilidad en agua) y análisis ópticos (color y opacidad).

Grosor. El grosor de las biopelículas fue evaluado utilizando un micrómetro manual Mitutoyo con una precisión de 0.001 mm. Para determinar la espesura se tomaron medidas en 10 puntos aleatorios de las muestras (Mali *et al.* 2008).

Análisis ópticos.

Opacidad. La opacidad de las películas se midió con un espectrofotómetro con una longitud de onda de 500 nm. Se utilizó el aire como control y la absorbancia obtenida fue sustituida en la ecuación 6 para obtener la opacidad (Muñoz 2014).

$$\text{Opacidad} = A_{500} / T \quad [6]$$

Donde:

A₅₀₀= Absorbancia a 500 nm

T= Espesor de la película en milímetros

Color. Los filmes fueron cortados en diámetro de 30 mm y se utilizó el Colorflex Hunterlab® para evaluar este parámetro. La caracterización se realizó en la escala L*, a*, b* donde:

L*= Luminosidad (0: negro y 100: blanco)

a*= -80 a 0: verde y 0 a 100: rojo

b*= -100 a 0: azul y 0 a 70: amarillo

ΔE = diferencia total de color

$$\Delta E_{lab} = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad [7]$$

Donde $\Delta L = L - L_0$, $\Delta a = a - a_0$, $\Delta b = b - b_0$

L*, a* y b* representan los valores del color de las muestras y L₀, a₀ y b₀ representan los valores del tratamiento sin orégano utilizado como control (L₀=32.52 a₀=-0.36 b₀=-1.05). Los análisis ópticos fueron realizados por triplicado.

Propiedades mecánicas.

Este análisis incluyó las evaluaciones de perforación y elongación (módulo de Young). Para este análisis se utilizó el texturómetro BROOKFIELD CT3. En ambos casos se realizaron 6 pruebas a cada una de las muestras.

Perforación. Consiste en determinar la fuerza y la distancia que requiere un material para romperse. Las películas se cortaron en 40 mm de longitud y 15 mm de ancho (Muñoz 2014), estas fueron colocadas en el soporte diseñado para este propósito basado en especificaciones del fabricante del texturómetro. Al texturómetro se le acopló una sonda de 2 mm de diámetro y la velocidad fue de 0.1 m/s. La ecuación 8 se utilizó para calcular la resistencia a la perforación (h) de la película.

$$\text{Resistencia a la perforación (h)} = F_p / L \quad [8]$$

Donde:

F_p= pico de fuerza antes de la ruptura

L= espesor de la película

Elongación. Mediante este análisis se puede determinar tres propiedades: tensión, deformación y módulo de elasticidad (Vicentini 2003) y está basado en la norma ASTM 828-95 (ASTM 1995). Se cortaron muestras de 40 mm de longitud y 15 mm de ancho y el texturómetro se calibró con velocidad de 0.1cm/s. La distancia entre las mordazas fue de 30 mm. El módulo de elasticidad se calculó con la siguiente ecuación (Farias *et al.* 2012):

$$\text{Módulo de elasticidad} = T_s / h \quad [9]$$

Donde:

T_s = Fuerza de tensión

h = deformación

Propiedades de barrera.

Solubilidad en agua. Se siguió la metodología propuesta por Gontard (1992) modificada. Se cortaron dos círculos con diámetro de 25mm y se pesaron. Uno de ellos fue secado por 24 horas a 105 ± 2 °C y se pesó después de ese tiempo. El otro círculo se puso en un tubo de ensayo con 50 ml de agua destilada durante 24 h a temperatura ambiente (25 °C) y fue agitado suavemente cada tres horas. Para obtener la solubilidad, se secó este círculo de bioplástico durante 24 horas a 105 °C y se pesó. Los pesos se sustituyeron en la ecuación 10 para obtener el porcentaje de solubilidad. El análisis se realizó por duplicado.

$$\% \text{ Solubilidad} = ((P_i - P_f) / P_i) \times 100 \quad [10]$$

Donde:

P_i = Peso inicial

P_f = Peso final

Permeabilidad a vapor de agua (PVA). Este análisis se realizó gravimétricamente basado en el método E96-92 de la ASTM modificado, el cual establece que se deben utilizar desecadores de sulfato de calcio anhidrido a una temperatura de 25 ± 3 °C. Las muestras se cortaron en círculos de diámetro de 30 mm para tapar vasos volumétricos con 30 ± 2.5 g de agua destilada (25 °C). Los vasos se pesaron cada 24 horas durante 9 días (Muñoz 2014). La PVA fue calculada con la ecuación 11.

$$\text{PVA} = \left(\frac{g}{t \times a} \right) \times \frac{x}{\Delta P} \quad [11]$$

Donde:

g= pérdida de peso del vaso volumétrico

t= tiempo en horas

a= área de permeabilidad

x= espesor de la película

ΔP = diferencia de presiones entre el gel de silicato (0 kPa a 25 °C) y el vapor de agua pura (3.167 kPa a 25 °C)

Ensayo de zona de inhibición. Para la evaluación antifúngica *in vitro* se utilizó la metodología de difusión en agar propuesta por Ponce *et al.* (2008) con adaptaciones. Se realizó una siembra por inclusión del cultivo del hongo patógeno. Para ello se preparó una solución de esporas de aproximadamente 7×10^5 ufc/ml en agua con Tween 85 (0.1%), usando colonias de 7 días de crecimiento en agar papa dextrosa acidificado (PDA). Se añadieron 4 ml de la suspensión de esporas por cada medio litro de PDA en matraz a 45 °C, previamente esterilizado. Los matraces inoculados con las esporas del hongo se mantuvieron en agitación orbital durante 10 min a 170 rpm. Una vez repartido en placas, se dejó solidificar y posteriormente se depositaron los discos de 1 cm de diámetro. En cada plato se colocaron tres discos de los cuales dos fueron de los tratamientos evaluados y el otro representó al tratamiento control. Los platos fueron colocados a 25 °C en una incubadora. Las lecturas de resultados de los platos se realizaron midiendo el halo de

inhibición desde el centro del disco del film hasta el extremo de la superficie de inhibición a las 48 horas. Se tomaron dos medidas del diámetro de la superficie inhibida y se calculó la media para todos los tratamientos y el control (Wang *et al.* 2011).

Análisis estadístico.

Se utilizó el programa Statistica 7 para realizar el análisis de los datos obtenidos y luego obtener los coeficientes de regresión seguida de los valores necesarios para posteriormente elaborar los gráficos de superficie respuesta. Al mismo tiempo, se determinaron los puntos óptimos de las variables independientes y así se optimizaron todas las variables dependientes. El valor del R^2 se utilizó para determinar el tipo de modelo obtenido. Un R^2 mayor a 0.6 se consideró como modelo predictivo y un R^2 menor a 0.6 se consideró como tendencioso. Para los valores del F calculado mayores o iguales al F tabular, a un nivel de significancia ($P < 0.10$), se consideró que el modelo de regresión es significativo (Rocha 2009).

Para el ensayo de zona de inhibición se utilizó un diseño completamente al azar con nueve tratamientos. Se realizaron pruebas de separación de medias Duncan y análisis de varianzas ANDEVA con un nivel de significancia de $P < 0.05$ usando el programa estadístico “Statistical Analysis System” (SAS 9.4).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Grosor.

El grosor de las biopelículas puede afectar las propiedades ópticas, mecánicas y de barrera. Oliveira *et al.* (1996) definió el grosor como la distancia perpendicular entre dos superficies. Los resultados encontrados para esta variable dependiente obtuvieron un rango entre 0.30 y 0.38 mm y se presentan en el cuadro 4. El tratamiento que presentó mayor grosor fue el que contenía una relación 75:25 de almidón de maíz y yuca sin orégano. Mientras que el tratamiento con 0.90% de orégano y 80:20 AM:AY presentó el menor grosor con 0.30 mm. Muñoz Garrido (2014), quien elaboró bioplásticos a base de almidones bajo los mismos parámetros con la excepción del orégano, encontró valores similares (0.25-0.42 mm). El grosor de las películas varió en función a la cantidad y manera en la cual se dispersó la solución filmogénica en las placas. No se encontraron variables significativas, consecuentemente no se pudo generar modelo matemático para la variable espesor.

Cuadro 4. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en el grosor en mm de los bioplásticos.

Tratamiento	% Relación AM:AY [€]	% Orégano	Grosor [¥]
T1	70:30	0.90	0.35
T2	80:20	0.90	0.30
T3	70:30	5.10	0.37
T4	80:20	5.10	0.37
T5	75:25	0.00	0.38
T6	75:25	6.00	0.34
T7	67.9:22.1	3.00	0.36
T8	82.1:17.9	3.00	0.37
T9	75:25	3.00	0.34
T10	75:25	3.00	0.36
T11	75:25	3.00	0.36
T12	75:25	3.00	0.35
% Coeficiente de Variación			14.26

[€] Hace referencia a la proporción de almidón de maíz, el restante es almidón de yuca.

[¥] Media

Cuadro 5. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para grosor de bioplástico.

Variable	Coeficiente	P
Intercepto	1.253481	0.238224 ^{ns}
X ₁	-0.087493	0.185550 ^{ns}
X ₁ ²	-0.000024	0.979199 ^{ns}
X ₂	-0.019715	0.447983 ^{ns}
X ₂ ²	0.000102	0.547957 ^{ns}
X ₁ X ₂	0.001190	0.479605 ^{ns}
Falta de ajuste		0.03 [£]
R ²		0.19

X₁: % Relación AM:AY

X₂: % Orégano

^{ns}No significativo

[£]significativo a P < 0.10

Opacidad.

En el cuadro 6 se presentan los valores de opacidad encontrados durante el experimento. El rango fue de 5.36 a 7.77 siendo el tratamiento sin orégano y con una relación de almidón de maíz y yuca 75:25 con el menor valor. El tratamiento con mayor opacidad contenía el mayor porcentaje de orégano (6%) y la combinación 75 y 25 % de almidón de maíz y yuca, respectivamente.

Cuadro 6. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la opacidad a 500 nm de los bioplásticos.

Tratamiento	% Relación AM:AY [€]	% Orégano	Opacidad [¥]
T1	70:30	0.90	6.06
T2	80:20	0.90	6.87
T3	70:30	5.10	7.02
T4	80:20	5.10	6.71
T5	75:25	0.00	5.36
T6	75:25	6.00	7.71
T7	67.9:22.1	3.00	6.92
T8	82.1:17.9	3.00	6.38
T9	75:25	3.00	6.60
T10	75:25	3.00	6.76
T11	75:25	3.00	6.63
T12	75:25	3.00	6.98
% Coeficiente de Variación			5.65

[€] Hace referencia a la proporción de almidón de maíz, el restante es almidón de yuca.

[¥] Media

Según los resultados obtenidos en el estudio, se puede concluir que a mayor cantidad de orégano los bioplásticos son más opacos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Bagán *et al.* (2009), quienes encontraron que a medida aumentaba la concentración de antimicrobiano, las películas resultaron más opacas. Los coeficientes de regresión obtenidos fueron utilizados para generar la ecuación 12, la cual muestra un efecto positivo de la variable orégano en su nivel lineal y un efecto negativo de la combinación de almidón y orégano (Cuadro 7). El F calculado fue mayor que el F tabular y el ajuste del modelo fue de 70%, con una falta de ajuste significativa ($P < 0.10$). Consecuentemente, el modelo se consideró tendencioso (Rocha 2009) y se pudo apreciar un comportamiento equivalente en la Figura 1. La opacidad de las películas aumentó al incorporar una sustancia antimicrobiana o antifúngica en la matriz (Torres y Rojas 2014). Miramont (2012) evaluó carvacrol y sorbatos como compósitos, y encontró que, a mayor porcentaje de antioxidante, las películas presentaron mayor opacidad y menos brillo.

$$\text{Opacidad} = -0.02659X_1X_2 + 2.35664X_2 \quad [12]$$

Cuadro 7. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para opacidad de bioplástico.

Variable	Coefficiente	P
Intercepto	-6.01021	0.723710 ^{ns}
X ₁	0.24266	0.596145 ^{ns}
X ₁ ²	-0.00113	0.706898 ^{ns}
X ₂	2.35664	0.033005 [£]
X ₂ ²	-0.01944	0.294439 ^{ns}
X ₁ X ₂	-0.02659	0.048722 [£]
Falta de ajuste		0.039 [£]
R ²		0.70
F. Tabular		3.11
F. Calculado		27.12

X₁: % Relación AM:AY

X₂: % Orégano

[£]significativo a $P < 0.10$

^{ns}No significativo

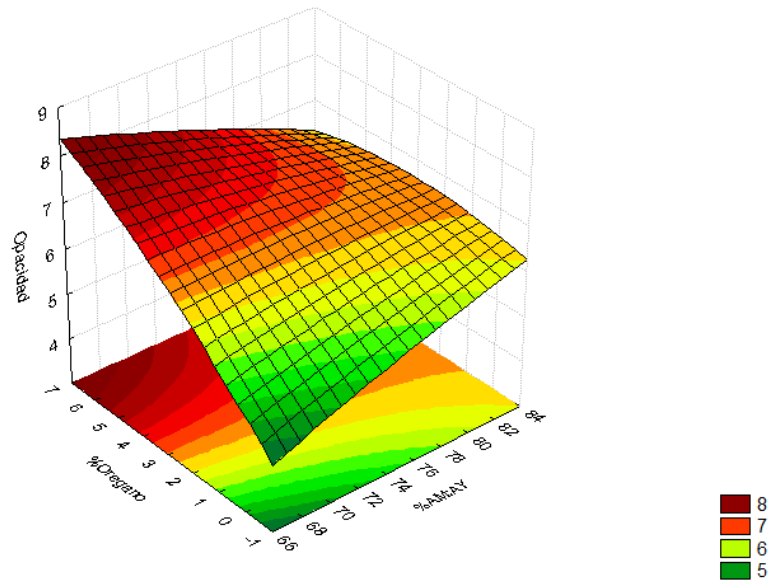


Figura 1. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la opacidad de los bioplásticos.

Diferencia de color.

Los resultados de análisis de diferencia de color ΔE de los bioplásticos se describen en el cuadro 8. Se observaron diferencias de color en un rango de 0 hasta 7.85. El tratamiento 5 (25% almidón de maíz, 75% almidón de yuca y 0% orégano) fue utilizado como referencia para establecer la diferencia de color. El tratamiento con mayor cambio de color corresponde al tratamiento con mayor porcentaje de orégano.

Cuadro 8. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la diferencia de color de los bioplásticos.

Tratamiento	% Relación AM:AY [€]	% Orégano	ΔE [¥]
T1	70:30	0.90	1.87
T2	80:20	0.90	2.24
T3	70:30	5.10	7.83
T4	80:20	5.10	7.40
T5(b)	75:25	0.00	0.00
T6	75:25	6.00	7.85
T7	67.9:22.1	3.00	7.06
T8	82.1:17.9	3.00	4.27
T9	75:25	3.00	6.84
T10	75:25	3.00	6.12
T11	75:25	3.00	7.10
T12	75:25	3.00	7.19
% Coeficiente de Variación			2.63

[€] Hace referencia a la proporción de almidón de maíz, el restante es almidón de yuca.

[¥] Media

(b): Tratamiento utilizado como punto de referencia para establecer la comparación

ΔE: Diferencia de color de los bioplásticos

Los coeficientes de regresión para la variable color se describen en el cuadro 9. En su nivel cuadrático, las variables orégano y almidón tienen un efecto positivo en su nivel lineal y negativo en su nivel cuadrático en la diferencia de color entre tratamientos. El modelo presentó un ajuste de 90%, con una falta de ajuste no significativa y el F calculado mayor que el F tabular, el modelo se considera de carácter predictivo (Rocha 2009). De la ecuación 13 se generó la Figura 2, en donde se puede observar el comportamiento de las variables.

$$\Delta E = -123.626 + 3.339 X_1 + 4.65X_2 - 0.023X_1^2 - 0.32X_2^2 \quad [13]$$

La diferencia entre tratamientos para la variable color se atribuye a la cantidad de compuesto incorporado a lo bioplásticos. Chariguaman Chanatasig (2015), evaluó el albedo de maracuyá en bioplástico, y encontró que a mayor proporción de harina de albedo se obtiene mayor diferencia de color. La incorporación de una sustancia antimicrobiana como aceites esenciales, sorbatos y otros tienen un efecto positivo en el aumento para esta variable dependiente (Miramont 2012). Estos resultados también coinciden con los obtenidos por Echeverría (2012), quien encontró un aumento de ΔE causado por la adición de nanoarcilla en la matriz polimérica. Este efecto se explica debido a que disminuyó la luminosidad (L), el parámetro a* tendió hacia valores más negativos (más verde) y el b* hacia valores más positivos (más amarillo).

Cuadro 9. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para diferencia de color de bioplástico.

Variable	Coefficiente	P
Intercepto	-123.626	0.065857 [£]
X ₁	3.339	0.063140 [£]
X ₁ ²	-0.023	0.060926 [£]
X ₂	4.650	0.078278 [£]
X ₂ ²	-0.320	0.005088 [£]
X ₁ X ₂	-0.019	0.477364 ^{ns}
Falta de ajuste		0.219 ^{ns}
R ²		0.94
F. Tabular		3.01
F. Calculado		41.98

X₁: % Relación AM:AY

X₂: % Orégano

[£]significativo a P < 0.10

^{ns}No significativo

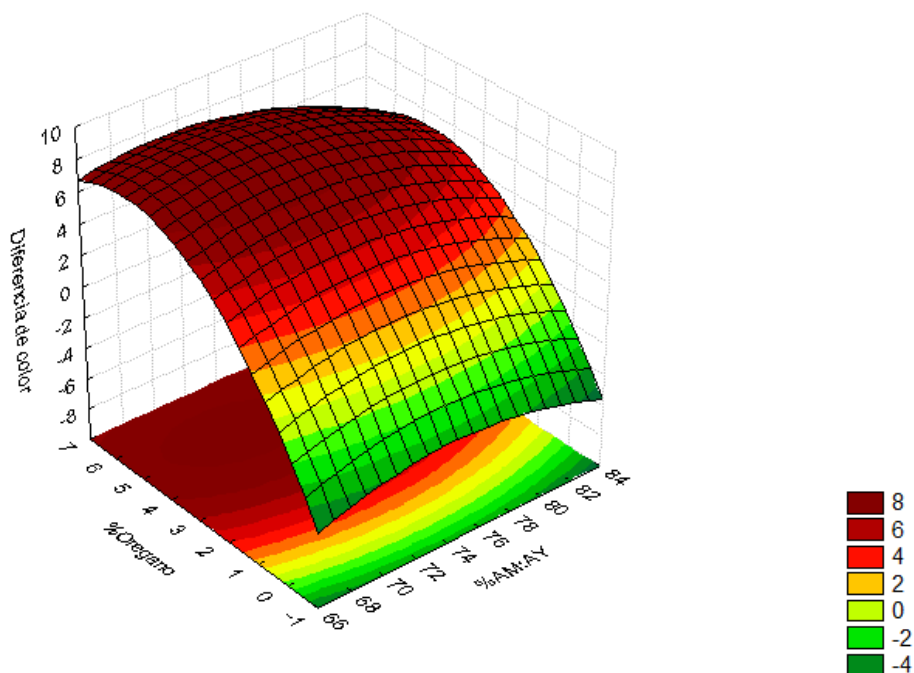


Figura 2. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la diferencia de color de los bioplásticos.

Resistencia a la perforación.

La fuerza de perforación se define como el pico de fuerza aplicada al material que se deforma antes de la ruptura del mismo (Vicentini 2003). La longitud y el espesor de la película son dos factores que influyen en la prueba para determinar la resistencia a la

perforación (Sobral *et al.* 1998). En los tratamientos evaluados se encontraron valores en un rango de 5.18 y 9.06 N (Cuadro 10). El tratamiento con 0.90% de orégano y una relación 80:20 de almidón de maíz y yuca presentaron la media más alta. Henríquez Velasco (2016) obtuvo valores muy similares (4.18 y 9.04 N) para bioplásticos elaborados a base de almidón de yuca y proteína de soya.

Cuadro 10. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la resistencia en Newton/mm (N/mm) de los bioplásticos.

Tratamiento	% Relación AM:AY [€]	% Orégano	Resistencia a la perforación [¥]
T1	70:30	0.90	7.34
T2	80:20	0.90	9.06
T3	70:30	5.10	5.18
T4	80:20	5.10	6.74
T5	75:25	0.00	5.73
T6	75:25	6.00	6.93
T7	67.9:22.1	3.00	5.20
T8	82.1:17.9	3.00	7.15
T9	75:25	3.00	8.13
T10	75:25	3.00	8.01
T11	75:25	3.00	7.43
T12	75:25	3.00	7.31
% Coeficiente de Variación			13.47

[€] Hace referencia a la proporción de almidón de maíz, el restante es almidón de yuca.

[¥] Media

Los niveles lineal y cuadrático de las variables independientes fueron altamente significativos ($P < 0.10$). La variable almidón muestra un efecto positivo mientras que la variable orégano presenta un efecto negativo a nivel cuadrático. Con los coeficientes de regresión mostrados en el cuadro 11, y que fueron significativos, se generó la ecuación 14. El F calculado fue mayor que el F tabular, por lo que, el modelo se consideró de carácter predictivo y el comportamiento de todas las variables se ilustra en la Figura 4. Resultados similares fueron observados por Burgos (2013) en bioplásticos de nanocompuestos a base de ácido poliláctico y reforzado con montmorillonita. En este estudio, este efecto fue causado por la fuerte interacción interfacial entre la matriz y el orégano, debido a la gran superficie expuesta (Echeverría 2012).

$$\text{Resistencia a la perforación} = -132.44 + 3.562 X_1 - 0.023 X_1^2 - 0.110 X_2^2 \quad [14]$$

Cuadro 11. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para la resistencia a la perforación de bioplástico.

Variable	Coefficiente	P
Intercepto	-132.442	0.035832 [£]
X ₁	3.562	0.034702 [£]
X ₁ ²	-0.023	0.038848 [£]
X ₂	0.789	0.630590 ^{ns}
X ₂ ²	-0.110	0.055424 [£]
X ₁ X ₂	-0.004	0.854548 ^{ns}
Falta de ajuste		0.03 [£]
R ²		0.56
F. Tabular		3.98
F. Calculado		17.18

X₁: % Relación AM:AY

X₂: % Orégano

[£]significativo a P < 0.10

^{ns}No significativo

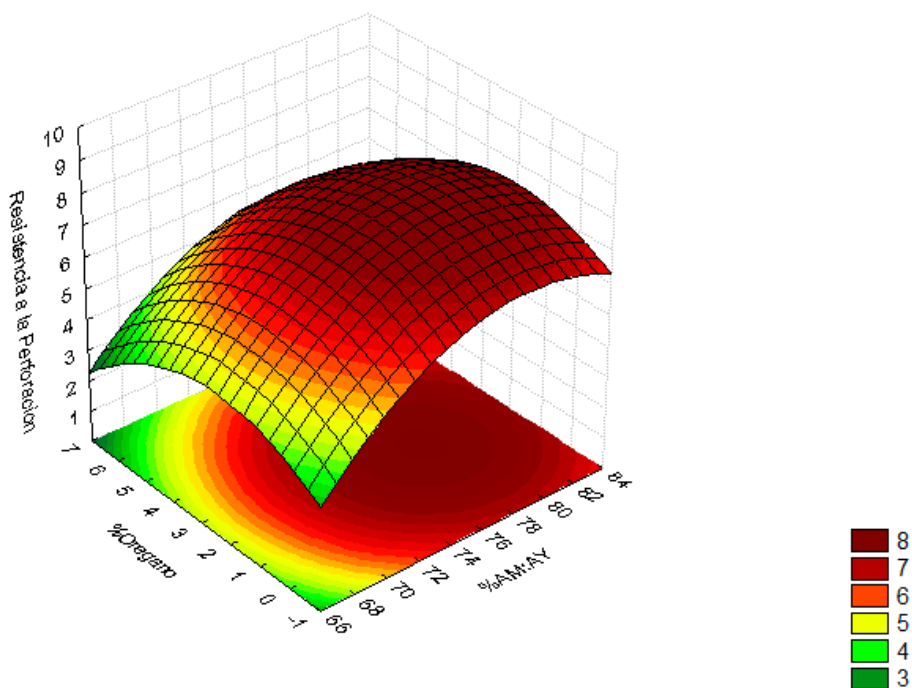


Figura 3. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la resistencia a la perforación de los bioplásticos.

Fuerza de tensión.

Es considerado como un parámetro alternativo para caracterizar la resistencia (Sarantopoulos 2002). La fuerza de tensión representa la máxima resistencia de una película sometida a una prueba de elongación. En el cuadro 12 se detallan los valores encontrados en este estudio. Las medias de los análisis varían de 2.82 hasta 5.56 Newtons. El tratamiento con menor fuerza de tensión corresponde a un 3% de orégano y una relación 80:20 de almidón de maíz y yuca. El tratamiento con 0.90% de sustancia antifúngica y una mezcla de almidones de 70:30 presenta mayor fuerza de tensión y corresponde a un punto axial. El modelo fue considerado de carácter tendencioso ya que su falta de ajuste fue significativa. Los coeficientes de regresión significativos del cuadro 13 fueron utilizados para generar el modelo matemático expresado en la ecuación 15.

$$\text{Fuerza de tensión} = -80.4102 + 2.474 X_1 - 0.0178 X_1^2 - 2.3489 X_2 - 0.0708 X_2^2 + 0.0323 X_1 X_2 \quad [15]$$

Cuadro 12. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la fuerza de tensión en Newton de los bioplásticos.

Tratamiento	% Relación AM:AY [€]	% Orégano	Tensión [¥]
T1	70:30	0.90	5.56
T2	80:20	0.90	4.11
T3	70:30	5.10	2.91
T4	80:20	5.10	3.93
T5	75:25	0.00	4.98
T6	75:25	6.00	3.59
T7	67.9:22.1	3.00	4.83
T8	82.1:17.9	3.00	3.24
T9	75:25	3.00	4.70
T10	75:25	3.00	4.85
T11	75:25	3.00	4.80
T12	75:25	3.00	4.73
% Coeficiente de Variación			18.90

[€] Hace referencia a la proporción de almidón de maíz, el restante es almidón de yuca.

[¥] Media

Cuadro 13. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para fuerza de tensión de bioplástico.

Variable	Coefficiente	P
Intercepto	-80.4102	0.000956 [£]
X ₁	2.4740	0.000616 [£]
X ₁ ²	-0.0178	0.000490 [£]
X ₂	-2.3489	0.002508 [£]
X ₂ ²	-0.0708	0.001352 [£]
X ₁ X ₂	0.0323	0.002209 [£]
Falta de ajuste		0.003 [£]
R ²		0.91
F. Tabular		5.25
F. Calculado		298.10

X₁: % Relación AM:AY

X₂: % Orégano

[£]significativo a P < 0.10

^{ns}No significativo

El comportamiento del modelo se observa en la Figura 5. Se pudo observar que a medida aumenta el porcentaje de orégano disminuye la tensión de ruptura debido al efecto plastificante que tiene el antimicrobiano. Flores *et al.* (2007) observaron que la tensión a la ruptura de las películas hechas a base de almidón de mandioca y que contenían sorbato de potasio bajaba, al incrementar las proporciones del preservador. La pérdida de resistencia mecánica puede atribuirse a la ruptura de la microestructura de la red de película causada por los aceites añadidos. La microestructura se vuelve discontinua debido a sustancias incompatibles, la distribución de la fuerza externa en cada enlace de matriz se vuelve desigual, lo que lleva a una disminución en la resistencia mecánica del sistema (Wang *et al.* 2011).

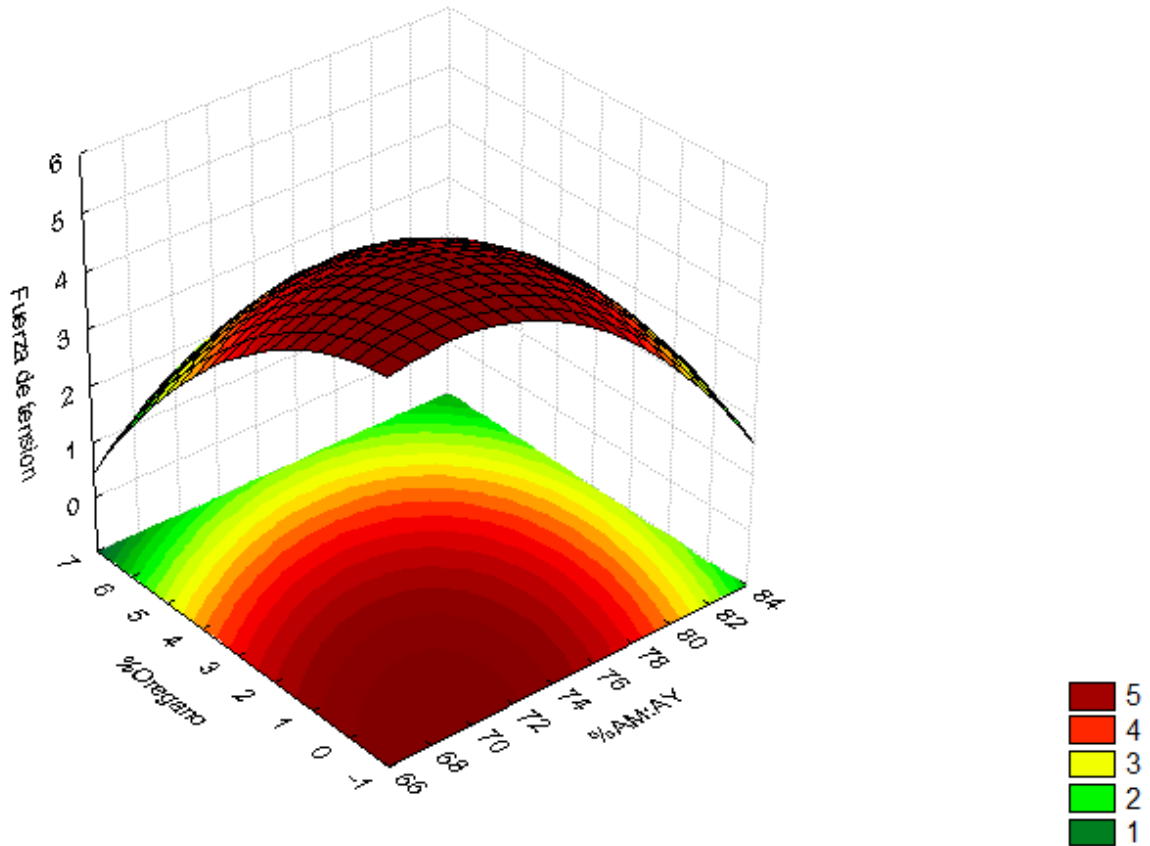


Figura 4. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la fuerza de tensión de los bioplásticos.

Módulo de elasticidad.

Mano y Mendes (1999) definieron el módulo de elasticidad como la razón entre la tensión y la deformación dentro del límite elástico, en el cual la deformación es proporcional a la tensión. Consecuentemente, esta variable permite expresar la rigidez de los bioplásticos. En el cuadro 14 se presentan los resultados del análisis de módulo de elasticidad, obteniendo valores desde 0.07 hasta 0.15 MPa. El tratamiento que mostró mayor módulo de elasticidad fue el tratamiento 1 con 0.90% de orégano y combinación de 70:30 de almidones, el cual fue un punto factorial. Mientras que el tratamiento 5 presentó menor módulo de elasticidad y corresponde a un punto axial. Los coeficientes de regresión no fueron significativos, consecuentemente no se pudo elaborar un modelo matemático para la variable módulo de elasticidad (Cuadro 15).

Cuadro 14. Módulo de elasticidad de bioplásticos con variables de combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca.

Tratamiento	% Relación AM:AY [€]	% Orégano	Módulo de elasticidad (MPa)
T1	70:30	0.90	0.15
T2	80:20	0.90	0.12
T3	70:30	5.10	0.09
T4	80:20	5.10	0.09
T5	75:25	0.00	0.07
T6	75:25	6.00	0.12
T7	67.9:22.1	3.00	0.12
T8	82.1:17.9	3.00	0.13
T9	75:25	3.00	0.12
T10	75:25	3.00	0.10
T11	75:25	3.00	0.11
T12	75:25	3.00	0.12

[€] Hace referencia a la proporción de almidón de maíz, el restante es almidón de yuca.

Cuadro 15. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para módulo de elasticidad de bioplástico.

Variable	Coefficiente	P
Intercepto	1.862538	0.082232
X ₁	-0.044361	0.104035 ^{ns}
X ₁ ²	0.000279	0.117232 ^{ns}
X ₂	-0.044694	0.220006 ^{ns}
X ₂ ²	-0.001492	0.126610 ^{ns}
X ₁ X ₂	0.000698	0.164417 ^{ns}
Falta de ajuste		0.003 [€]
R ²		0.20

X₁: % Relación AM:AY

X₂: % Orégano

[€] significativo a P < 0.10

^{ns}No significativo

Solubilidad.

Se define como la capacidad que tiene una sustancia de disolverse en otra (Ferreira 1986). Esta característica es importante ya que define la aplicabilidad de los bioplásticos. En el cuadro 16 se presentan los valores obtenidos del porcentaje de material soluble en agua para cada tratamiento. El menor porcentaje de solubilidad encontrado corresponde al tratamiento que no contiene orégano. Según los resultados, la incorporación de la fibra aumentó la solubilidad de los bioplásticos.

Cuadro 16. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en la solubilidad en agua (%) de los bioplásticos.

Tratamiento	% Relación AM:AY [€]	% Orégano	Solubilidad (%) [¥]
T1	70:30	0.90	46.95
T2	80:20	0.90	52.02
T3	70:30	5.10	49.20
T4	80:20	5.10	55.93
T5	75:25	0.00	37.20
T6	75:25	6.00	50.53
T7	67.9:22.1	3.00	54.00
T8	82.1:17.9	3.00	48.48
T9	75:25	3.00	53.71
T10	75:25	3.00	51.87
T11	75:25	3.00	51.88
T12	75:25	3.00	50.23
% Coeficiente de Variación			4.02

[€] Hace referencia a la proporción de almidón de maíz, el restante es almidón de yuca.

[¥] Media

La variable orégano muestra un efecto negativo a nivel cuadrático. El modelo tuvo un ajuste de 0.61 y una falta de ajuste significativo, por lo cual se considera tendencioso. A partir de los coeficientes de regresión presentados en el cuadro 17, se generó el modelo matemático para la variable solubilidad (ecuación 14). La figura 3 presenta el comportamiento de las variables independientes donde se observó un aumento de solubilidad con la incorporación del material antifúngico. En un estudio realizado por Miramont (2012) encontró efecto de las sustancias antimicrobianas en la solubilidad de los bioplásticos. Este efecto negativo se debe a una menor organización de la estructura de la matriz. Los valores encontrados en este estudio coinciden con Chariguaman Chanatasig (2015), quien obtuvo menor porcentaje de solubilidad al no incluir harina de maracuyá en uno de sus tratamientos a diferencia del resto de tratamientos. Sin embargo, González *et al.* (2016), encontraron que al adicionar montmorillonita en las películas el porcentaje de solubilidad fue menor. La nanoarcilla interactúa con la matriz polimérica y disminuye los grupos hidroxilos disponibles. Por lo tanto, hay un mayor grado de dificultad de flujo de moléculas de agua.

$$\text{Solubilidad} = -0.7110 X_2^2 \quad [16]$$

Cuadro 17. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para solubilidad de bioplástico.

Variable	Coefficiente	P
Intercepto	153.7502	0.311466 ^{ns}
X ₁	-2.98410	0.439763 ^{ns}
X ₁ ²	0.0198	0.441586 ^{ns}
X ₂	2.7873	0.624901 ^{ns}
X ₂ ²	-0.7110	0.0108873 [£]
X ₁ X ₂	0.0395	0.600065 ^{ns}
Falta de ajuste		0.025 [£]
R ²		0.61
F. Tabular		3.11
F. Calculado		27.40

X₁: % Relación AM:AY

X₂: % Orégano

£significativo a P < 0.10

^{ns}No significativo

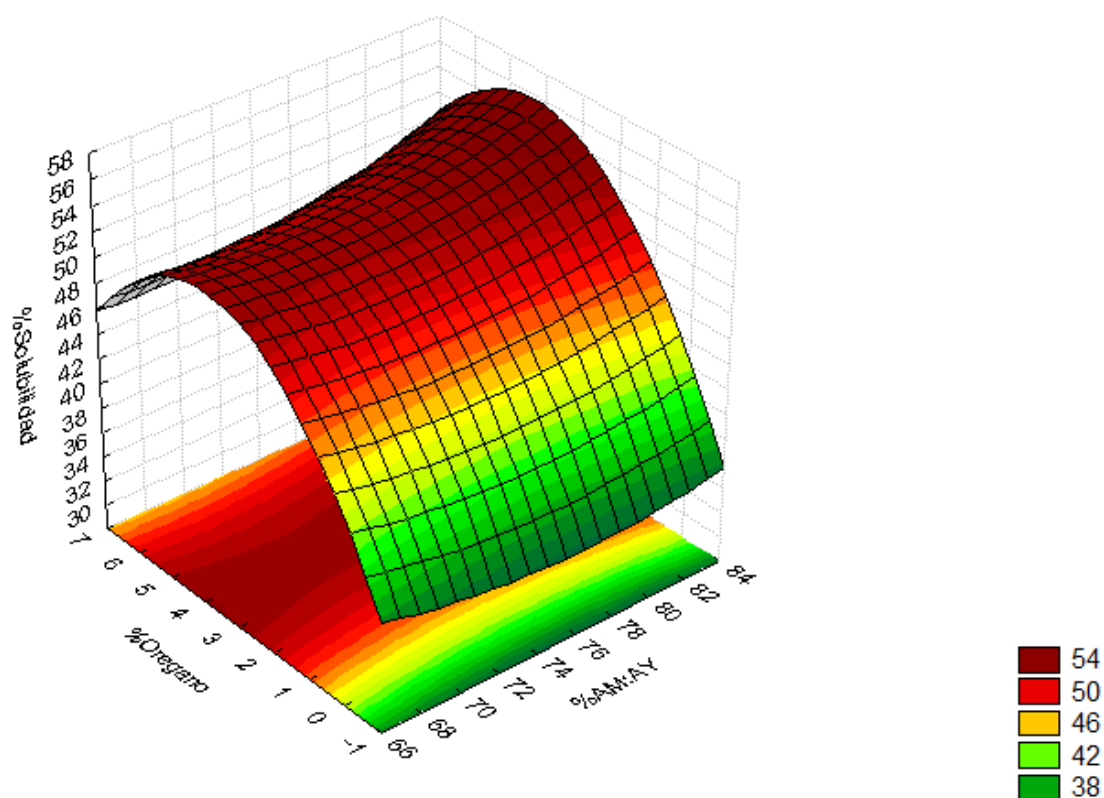


Figura 5. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la solubilidad de los bioplásticos.

Permeabilidad a vapor de agua (PVA).

Se define como la tasa de transmisión de vapor de agua que pasa por unidad de superficie de un material de espesura conocida, que es inducida por una diferencia de presiones entre dos superficies específicas, con condiciones de temperatura y humedad relativa específica ASTM E96-80 (ASTM 1989). Este proceso consta de tres etapas: la sorción y la solubilidad del líquido en la superficie del material. La segunda, al integrarse a ésta, genera un gradiente de concentración en la matriz, donde se toma en cuenta el grosor y el área de la película. Finalmente, la desorción y la evaporación del líquido en el otro lado del material (Trejo *et al.* 2001). La permeabilidad a vapor de agua se calcula como el cociente de la pendiente de pérdida de agua versus el tiempo y el área de la película expuesta (Murillo 2011). Los valores obtenidos para el análisis de permeabilidad a vapor de agua se presentan en el cuadro 18. El tratamiento con menor valor de permeabilidad correspondió al tratamiento sin orégano incluido en la matriz.

Cuadro 18. Permeabilidad a vapor de agua en $\text{g}\times\text{mm}/\text{h}\times\text{m}^2\times\text{kPa}$ de los bioplásticos con los variables de combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca.

Tratamiento	% Relación AM:AY [€]	% Orégano	PVA [¥]
T1	70:30	0.90	6.40
T2	80:20	0.90	3.61
T3	70:30	5.10	6.13
T4	80:20	5.10	8.65
T5	75:25	0.00	3.97
T6	75:25	6.00	8.72
T7	67.9:22.1	3.00	7.09
T8	82.1:17.9	3.00	7.26
T9	75:25	3.00	8.43
T10	75:25	3.00	8.25
T11	75:25	3.00	8.77
T12	75:25	3.00	8.97
% Coeficiente de Variación			13.54

[€] Hace referencia a la proporción de almidón de maíz, el restante es almidón de yuca.

[¥] Media

El ajuste del modelo fue de 93% con una falta de ajuste no significativa. Con los coeficientes de regresión obtenidos del Cuadro 19 se generó la ecuación 17 que es de carácter predictivo. El comportamiento del modelo se muestra en la Figura 6. Las variables independientes tuvieron efectos significativos en todos los niveles (lineal, cuadrática y combinación). La incorporación del compósito en los bioplásticos causó un aumento en el valor de permeabilidad a vapor de agua. La combinación de orégano y mezcla de almidón tuvo un efecto significativo en el aumento de la permeabilidad. Esto se atribuye a una mayor distancia entre las cadenas del polímero por la adición del compósito (Kamperepappum *et al.* 2007). Mientras que la adición de compuestos antimicrobianos como árbol de té en películas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) presentó menores valores de PVA en

comparación al tratamiento control (Bagán *et al.* 2009). La disminución del porcentaje de almidón en la formulación también aumenta la permeabilidad a vapor de agua (Villada *et al.* 2007). En comparación a los polímeros sintéticos como el polietileno de baja densidad, las biopelículas presentan muy baja resistencia al vapor de agua (Miramont 2012).

$$\text{PVA} = -160.584 + 4.766 X_1 - 0.034 X_1^2 - 7.011 X_2 - 0.283 X_2^2 + 0.125 X_1 X_2 \quad [17]$$

Cuadro 19. Coeficiente de regresión y probabilidad (P) de un modelo de regresión polinomial aplicado para permeabilidad a vapor de agua de bioplástico.

Variable	Coefficiente	P
Intercepto	-160.584	0.011840 [£]
X ₁	4.766	0.008651 [£]
X ₁ ²	-0.034	0.006930 [£]
X ₂	-7.011	0.009247 [£]
X ₂ ²	-0.283	0.002210 [£]
X ₁ X ₂	0.125	0.003877 [£]
Falta de ajuste		0.153 ^{ns}
R ²		0.93
F. Tabular		2.96
F. Calculado		44.79

X₁: % Relación AM:AY

X₂: % Orégano

[£]significativo a P < 0.10

^{ns}No significativo

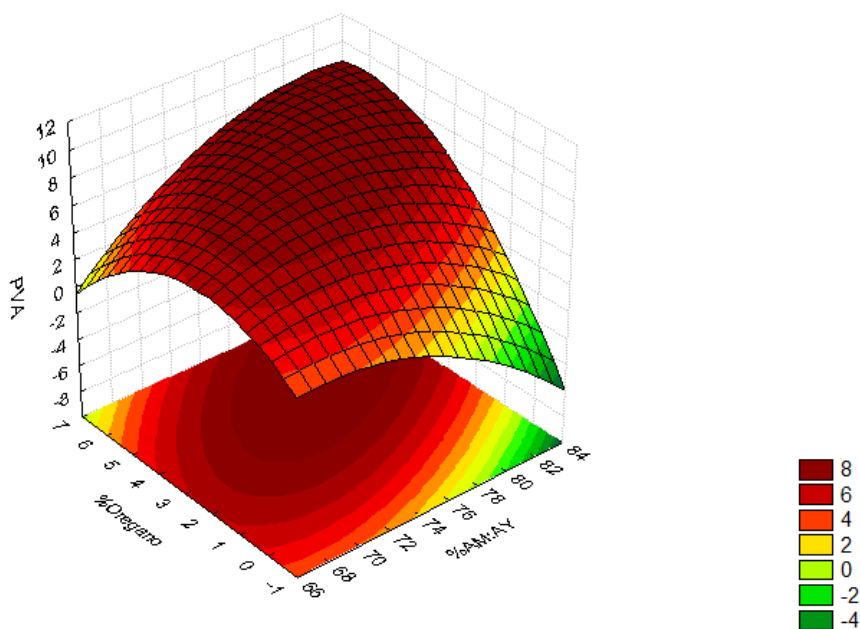


Figura 6. Efecto de la combinación del % de orégano y relación AM:AY en la permeabilidad a vapor de agua de los bioplásticos.

Función de utilidad.

Se consideraron las variables dependientes ΔE , opacidad, resistencia a la perforación, fuerza de tensión y permeabilidad a vapor de agua. La optimización se observa en la figura 7. Los valores encontrados fueron de 77.60% de combinación almidón de maíz, 22.40% almidón de yuca y 1.7% de orégano.

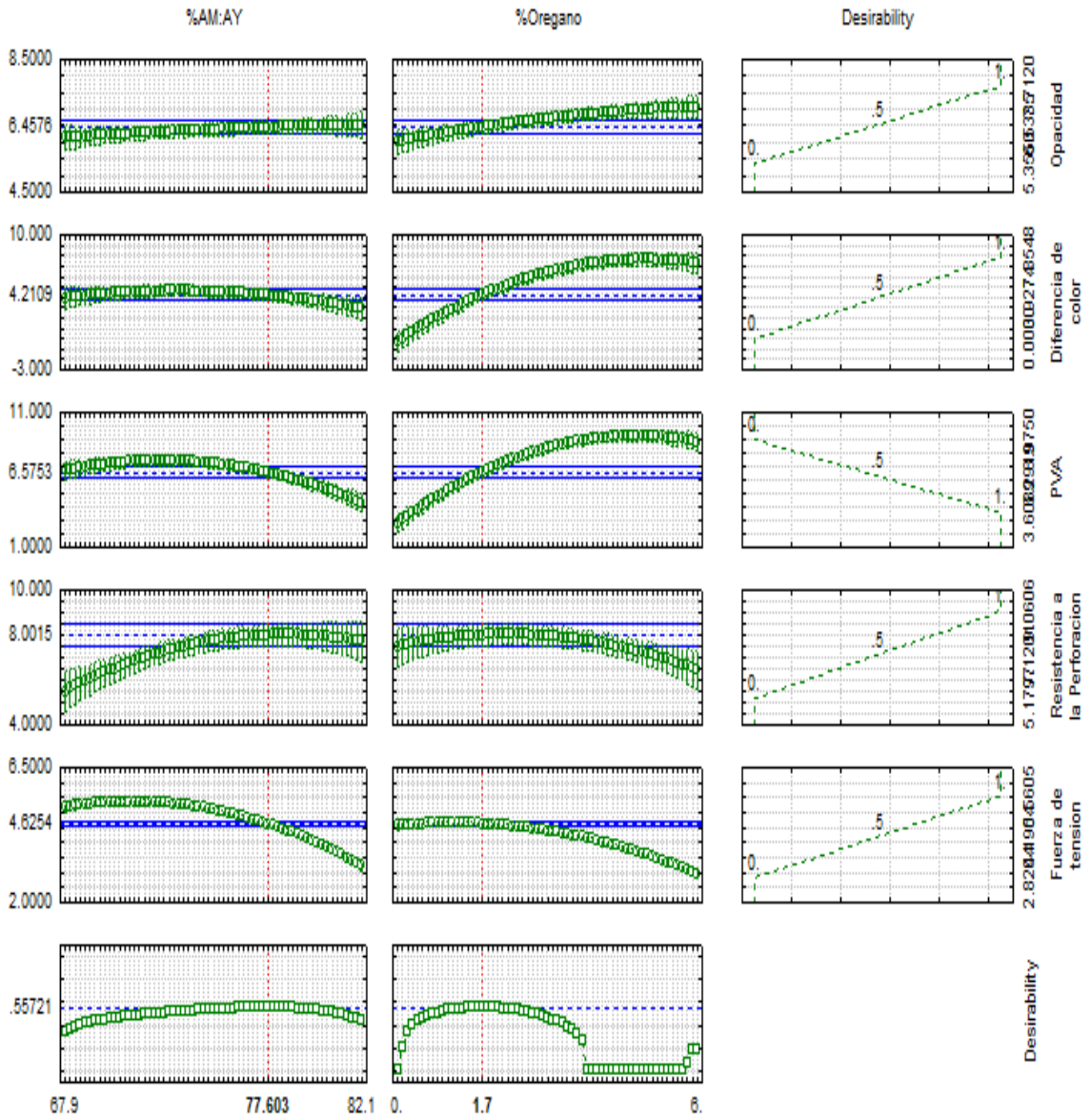


Figura 7. Valores óptimos de las variables independientes sobre las propiedades ópticas, mecánicas y de barrera de un bioplástico con orégano y combinación de almidón de maíz y yuca.

Actividad antifúngica in vitro de los bioplásticos.

La cuantificación de la actividad inhibitoria se realizó a través de la medición de diámetro de inhibición. Al momento de colocar los discos sobre la superficie del agar inoculado con esporas, se evaluó la capacidad de los bioplásticos de interactuar con el medio. La migración de las sustancias antifúngicas se determinó con la observación de halos claros en la superficie de los platos. En el cuadro 20 se presentan los valores de diámetro de inhibición que se encontraron durante el experimento. El rango fue de 0.5 a 1.112 cm de diámetro. Siendo el tratamiento sin orégano y con una relación de almidón de maíz y yuca 75:25 con el menor valor. El tratamiento con mayor diámetro de inhibición contenía el mayor porcentaje de orégano (6%) y la combinación 75 y 25% de almidón de maíz y yuca, respectivamente.

Se observaron diferencias estadísticas entre los distintos tratamientos evaluados. Los tratamientos: 3, 4 y 6 presentaron mayores diámetros de inhibición en comparación a los otros tratamientos. El incremento en el porcentaje de orégano implica un incremento de la zona de inhibición. Consecuentemente, se confirmó que el compuesto posee propiedades antifúngicas. Estos resultados son consistentes con los de Suarez *et al.* (2015), quienes encontraron que la aplicación de aceite esencial de orégano en papaya contrarrestó la antracnosis en un 37%. El carvacrol, uno de los principales componentes del orégano, podría interactuar con las membranas celulares al cambiar la permeabilidad de los cationes pequeños. Como los compuestos químicos en aceites esenciales y extractos de orégano son complejos, podrían inhibir microorganismos a través de diferentes objetivos celulares (Liu *et al.* 2017).

Cuadro 20. Efecto de la combinación de porcentaje de orégano, almidón de maíz y yuca en el diámetro de inhibición en centímetros contra *Alternaria alternata*.

Tratamiento	% Relación AM:AY [€]	% Orégano	Diámetro de inhibición + D.E [¥]
T1	70:30	0.90	0.700 + 0.04 ^C
T2	80:20	0.90	0.592 + 0.03 ^D
T3	70:30	5.10	1.087 + 0.05 ^A
T4	80:20	5.10	1.080 + 0.05 ^A
T5	75:25	0.00	0.500 + 0.00 ^E
T6	75:25	6.00	1.112 + 0.05 ^A
T7	67.9:22.1	3.00	0.900 + 0.03 ^B
T8	82.1:17.9	3.00	0.907 + 0.01 ^B
T9	75:25	3.00	0.905 + 0.04 ^B
% Coeficiente de Variación			5.28

^{A-E} Medias seguidas con letras mayúsculas diferentes en la columna son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$).

[€] Hace referencia a la proporción de almidón de maíz, el restante es almidón de yuca.

[¥] Media + desviación estándar.

4. CONCLUSIONES

- Se determinó que la combinación de 77.60% almidón de maíz, 22.40% almidón de yuca y 1.7% de orégano resultan en una mejora de las propiedades físicas y de barrera de los bioplásticos.
- Se elaboraron dos modelos de carácter predictivo y cuatro de carácter tendencioso que explican el comportamiento de las propiedades de los bioplásticos en función de las variables orégano y almidón.
- La incorporación de orégano en polvo en la matriz polimérica fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo de manera significativa ($P < 0.05$).

5. RECOMENDACIONES

- Realizar el revestimiento en frutas susceptibles al hongo patógeno para evaluar la eficacia del bioplástico.
- Reformular las biopelículas utilizando un menor tamaño de partícula de orégano.
- Caracterizar el perfil reológico de la solución filmogénica y las propiedades térmicas de las películas.

6. LITERATURA CITADA

Alvarez RM. 2012. Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas. [Tesis]. Universidad de Antioquia, Medellín Colombia. 207 p.

ASTM(American Society for Testing Material) 1995. Annual Book of ASTM Standars. D828-95a ed. Philadelphia.

Bagán MM, González LS, Cháferl M, Martinez CG, Boix AC. 2009. Recubrimientos antimicrobianos a base de hidroxipropilmetilcelulosa y aceite esencial de árbol de té [Tesis]. Departamento de Tecnología de Alimentos, Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, España. 20 p.

Box EP, Hunter JS, Hunter WG. 1978. Statistics for experimenters: An introduction to design, data and model building, New York: John Wiley y Sons. 664 p.

Burgos BN. 2013. Desarrollo de bionanocompuestos en base a poli (ácido láctico) y plastificantes de alta compatibilidad para el envasado de alimentos. España. [consultado 2018 agosto 17]. https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/31986/1/tesis_nuriaburgosbolufer.pdf

Chariguaman Chanatasig JA. 2015. Caracterización de bioplástico de almidón elaborado por el método de casting reforzado con albedo de maracuyá (*Passiflora edulis* spp.) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 68p.

Durango AM, Soares NF, Arteaga MR. 2011. Filmes y revestimientos comestibles como empaques activos en la conservación de alimentos. Biotecnología sector agropecuaria y agroindustria. 9 (1): 112-118.

Echeverría I. 2012. Materiales biodegradables en base a proteínas de soja y montmorillonitas [Tesis]. Universidad Nacional de La Plata, Argentina. [consultado 2018 sep 05]. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/18534>.

FAO (Food and Agriculture Organization) 2017. Perspectivas mundiales de las principales frutas tropicales. [consultado 2018 mayo 10]. http://www.fao.org/fileadmin/templates/est/COMM_MARKETS_MONITORING/Tropical_Fruits/Documents/Tropical_Fruits_Spanish2017.pdf

Farias MG, Fakhouri FM, Carvalho WP, Ascheri LR. 2012. Caracterizacáo físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola (*Malphigia emarginata* D.C.). *Quim. Nova* 35:546-552. [consultado 2018 mayo 23]. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422012000300020&lng=en&nrm=iso&tlng=pt

Ferreira A. 1986. *Novo Dicionário De Língua Portuguesa*, 2ª Ed. 35ª Impressao, Editora Nova Fronteira. 2151 p.

Flores S, Famá L, Rojas A, Goyanes S, Gerschenson L. 2007. Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International* 40(2): 257–265.

García-Camarillo EA, Quezada-Viay MY, Moreno-Lara J, Sánchez-Hernández E, Pérez-Reyes MC. 2006. Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pescara. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24(1):8-12.

Gontard N, Guilbert S, Cuq J-L. 1992. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on the Film Properties using Response Surface Methodology. *J. Food Sci.* 57:190-195.

González RA, Sotelo BM, Gutiérrez MF. 2016. Películas de almidón de papa obtenidas por casting y extrusión reforzadas con montmorillonita de sodio modificada. México. [consultado 2018 Agosto 27]. <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/8/110.pdf>

Henríquez Velasco JG. 2016. Optimización de revestimientos comestibles a base de proteína de soya, almidón de yuca y plastificantes en manzanas (*Malus domestica*) [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 39p.

Humberto GP, Roman VS, 2008. *Análisis y diseño de experimentos*. Segunda edición. México. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 736 p. ISBN-10: 970-10-6526-3.

Kamperapappum P, Pentrakoon D, Srikulkit K. 2007. Preparation of cassava starch/montmorillonite nanocomposite film. *J Sci Res Chula.* 29(2):183-197.

Liu Q, Meng X, Li Y, Zhao CN, Tang GY, Li HB. 2017. Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. *Int J Mol. Sci* 18:2-7.

López LI, Martínez PG, Baños SB, Jiménez LF, Zavaleta HA. 2013. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango 'Tommy Atkins' durante el almacenamiento. *Chapingo* 19(3):315-331.

Mali S, Grossman M, García M, Martino MN, Zaritzky NE. 2008. Antiplasticizing effect of glycerol and sorbitol on the properties of cassava starch films. *Braz. J. Food Technol.* 11:194–200.

Mano E, Mendes L. 1999. Avaliação das propriedades dos polímeros. In: introdução A polímeros. Editoria Edgard Blucher Ltda. São Paulo, Brasil. p. 58-64.

Miramont S. 2012. Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos [Tesis]. Buenos Aires, Argentina. [consultado 2018 sep 12]. <http://posgrado.frba.utn.edu.ar/investigacion/tesis/MTA-2012-Sofia%20Miramont.pdf>

Muñoz Garrido JM. 2014. Evaluación, caracterización y optimización de un bioplástico a partir de la combinación de almidón de maíz, yuca y glicerol en sus propiedades físicas y de barrera [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano-Honduras. 30p.

Murillo MM, 2011. Evaluación de propiedades mecánicas, ópticas, antioxidantes y de barrera de películas comestibles elaboradas con emulsiones dobles w1/o/w2 adicionadas con extracto de té verde (*Camellia sinensis*) [Tesis]. División De Ciencias Biológicas Y De La Salud: Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F., México. [consultado 2018 agosto 30]. <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI15374.pdf>

Oliveira LM, Vercelino Alves RM, Sarantópulis CIGL, Padula M, Correa Garcia EE, Coltro L. 1996. Ensaios para avaliação de embalagens plásticas flexíveis. Centro de Tecnologia de Embalagem, Campinas-Brasil. 219 p.

Ponce A, Roura SC, Moreira M. 2008. Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: *In vitro* and *in vivo* studies. *Postharvest Biology and Technology* 49:294-300.

Rafael Álvarez. 2012. Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas. [Tesis]. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia. <http://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/1618/1/TESIS%20DOCTORAL%20RAFAEL%20ALVAREZ.pdf>.

Rocha GO. 2009. Obtenção e caracterização de filmes biodegradáveis a partir de misturas de amido de mandioca e extrato protéico de soja [Tesis]. Universidad Federal Rural, Rio de Janeiro-Brasil. 45 p.

Sarantópoulos CL, Oliveira M, Padula L, Coltro R, Alves García E. 2002. Embalagens plásticas flexíveis. Principais polímeros e avaliação de propriedades [Tesis]. CETEA, Campinas Brasil. 267 p.

Sobral PJ, Ocuno D, Savastano Junior H. 1998. Preparo de proteínas miofibrilares de carne e elaboração de biofilmes com dois tipos de ácidos; propriedades mecánicas. *Braz. J. Food Technol.* 1(1-2):44-52.

Suárez AG, Márquez MA, Vargas AA. 2015. Desarrollo de un recubrimiento con efecto antifúngico y antibacterial a base de aceite esencial de orégano para la conservación de papaya 'Maradol'. Rev. Iber. Tecnología Postcosecha 16(1):58-63.

Sullon HP. 2012. Etiología del manchado y pudrición peduncular del mango [Tesis]. Universidad Nacional de Piura, Perú. 113p.

Torres CA, Rojas AJ. 2014. Efecto de recubrimientos comestibles a base goma Gellan, gelatina y caseína sobre la cinética de deterioro de la mora de castilla *Rubus glaucus* Benth. Tolima. 154 p. [consultado 2018 ago 30]. <https://www.scribd.com/document/254426691/RIUT-FBA-spa-2014-Efecto-de-Recubrimientos-Comestibles-a-Base-Goma-Gellan-Gelatina-y-Caseina-Sobre-La-Cinetica-de-Deterioro-de-La-Mora-de-Castilla-Ru>.

Trejo V, Aragón N, Miranda P. 2001. Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. Journal of the Mexican Chemical Society. 45(1):1-5.

Vázquez-Briones MC. 2013. Recubrimientos de frutas con biopelículas. [Tesis]. Puebla, México: Universidad de las Américas Puebla. <http://web.udlap.mx/tsia/files/2014/12/TSIA-72-Vazquez-Briones-et-al-2013.pdf>

Velásquez-Santos CO, Acevedo-Álvarez CA. 2014. Procedimiento para deshidratación de orégano utilizando gas propano como combustible. Tecno Lógicas. 17(33): 13-20.

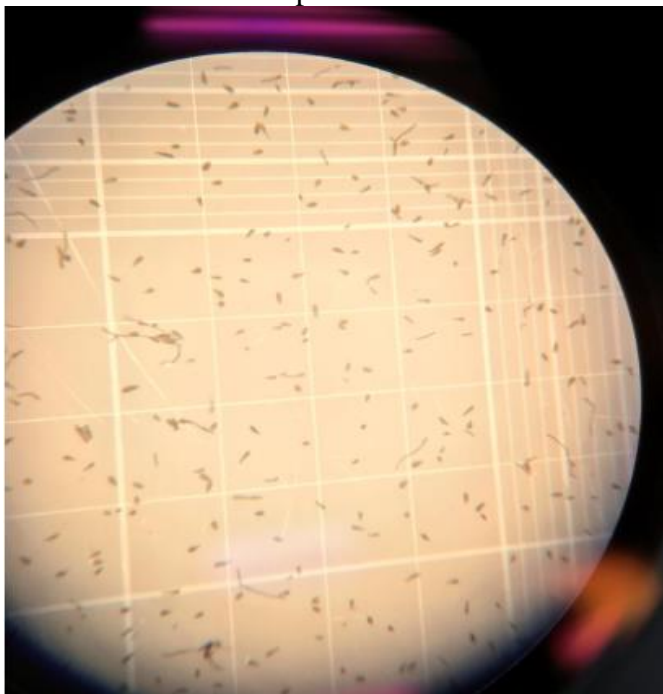
Vicentini NM. 2003. Elaboração E Caracterização De Filmes Comestíveis À Base De Fécula De Mandioca Para Uso Em Pós-Colheita [Tese de Doutorado]. Faculdade de Ciências Agronomicas- Unesp, Botucatu-Brasil. 198 p.

Villada H, Acosta HA, Velasco RJ. 2007. Biodegradables biopolymers natural used in biodegradable. Polymer (Guildf). 12:5–13.

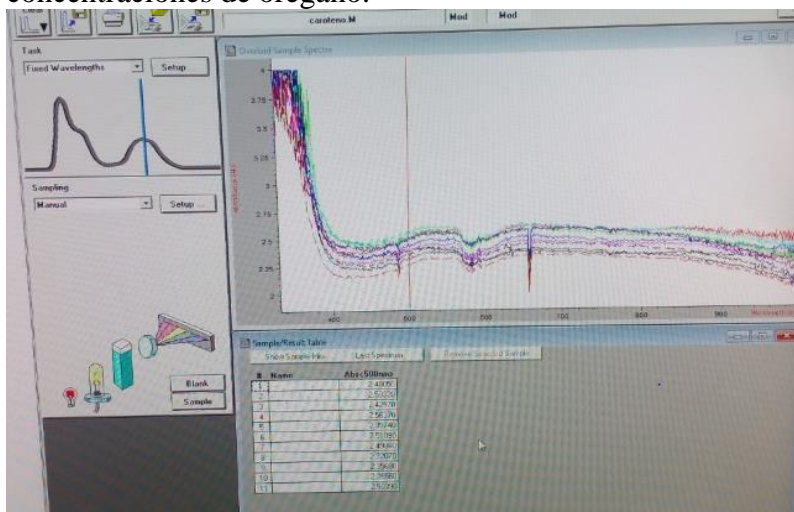
Wang L, Liu F, Jiang Y, Chai Z, Li P, Cheng Y, Jing H, Leng X. 2011. Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films. J. Agri. Food Chem. 59(23):12411-12419.

7. ANEXOS

Anexo 1. Conteo de esporas en cámara Neubauer.



Anexo 2. Espectrofotometría de las películas de almidón de yuca y maíz con diferentes concentraciones de orégano.



Anexo 3. Zona de inhibición de bioplásticos con diferentes concentraciones de orégano.

