

Efectividad antimicrobiana de películas de quitosano, poli adipato (co-tereftalato de butileno) y almidón de yuca en carne fresca

Karla Pierina Valladares Alcívar

**Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras**

Noviembre, 2017

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

Efectividad antimicrobiana de películas de quitosano, poli (adipato co-tereftalato de butileno) y almidón de yuca en carne fresca

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

Presentado por

Karla Pierina Valladares Alcívar

Zamorano, Honduras

Noviembre, 2017

Efectividad antimicrobiana de películas de quitosano, poli adipato (co-tereftalato de butileno) y almidón de yuca en carne fresca

Karla Pierina Valladares Alcívar

Resumen. Los polímeros usados en empaques convencionales son derivados de fuentes fósiles no renovables y no biodegradables, a diferencia de los biopolímeros que se usan por su disponibilidad, bajo costo y biodegradabilidad. Incorporar agentes antimicrobianos naturales es una alternativa para la conservación y prolongación de la vida de anaquel de los alimentos. El objetivo del estudio fue caracterizar las propiedades mecánicas, de barrera y estructurales de películas de almidón, poli adipato (co-tereftalato de butileno) (PBAT) y quitosano, en concentraciones del 2.5 y 5% y determinar su efectividad antimicrobiana en carne. Se desarrollaron tres tipos de películas (control, quitosano al 2.5% y quitosano al 5%) y se analizó la capacidad antimicrobiana a través de conteo de bacterias mesófilas los días 0, 3, 5 y 7. Se usó un diseño de Bloques Completos al Azar con tres repeticiones, cuatro medidas repetidas en el tiempo y separación de medias LSMeans y Duncan. Las películas con 5% de quitosano disminuyeron el porcentaje de elongación y aumentaron el módulo de Young. La permeabilidad al vapor de agua aumentó con la adición de quitosano al 2.5 y 5% y la estructura de películas control en microscopía de barrido MEB presentaron la mejor compactación. La efectividad antimicrobiana de las películas fue nula durante los 7 días de almacenamiento y el color de la carne en la escala CIE a^* con películas al 2.5% de quitosano fue estable a través del tiempo.

Palabras clave: Biopolímeros, caracterización mecánica y de barrera, empaques activos.

Abstract. The polymers used in conventional packaging derive from fossil sources that are neither renewable nor degradable unlike biopolymers which are used for their availability, low cost, and biodegradability. Incorporating natural antimicrobial agents is an alternative for the conservation and prolongation of food shelf life. The objective of this study was to characterize the mechanical and barrier properties of starch, poli adipate (co-terephthalate of butylene) and chitosan films in concentrations of 2.5 and 5% and determine their antimicrobial effectiveness in meat. Three types of films were developed (control, chitosan 2.5% and chitosan 5%) and the antimicrobial capacity was analyzed through mesophilic bacterial count at days 0, 3, 5, and 7. A Randomized Complete Block design was use with three replicates, four measurements in time and Duncan and LSMeans separation. The films with 5% chitosan diminished elongation percentage and increased the Young module. Water vapor permeability increased with the addition of chitosan at 2.5 and 5 % and the structure of control films in scanning electron microscopy MEB exhibited the best compaction. The antimicrobial effectiveness of the films was null during the 7 days storage and the color of the meat in the CIE a^* scale with films with 2.5% chitosan was stable through time.

Key words: Active packaging, biopolymers, mechanical and barrier characterization.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas	ii
Resumen	iii
Contenido	iv
Índice de Cuadros y Figuras	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	6
4. CONCLUSIONES	19
5. RECOMENDACIONES	20
6. LITERATURA CITADA.....	21

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadros	Página
1. Formulaciones para producción de las películas	4
2. Propiedades mecánicas de películas de almidón, PBAT y quitosano	7
3. Promedios y desviación estándar de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas	7
4. Parámetros de Guggenheim-Anderson de Boerd para isotermas de absorción de películas	8
5. Promedios y desviación estándar del conteo de bacterias mesófilas aerobias en carne	13
6. Valores promedio y desviación estándar de CIE L^* de la carne	14
7. Valores promedio y desviación estándar de CIE a^* de la carne	15
8. Valores promedios y desviación estándar en CIE b^* de la carne.....	16
9. Valores promedios y desviación estándar del pH de la carne	17
10. Valores promedios y desviación estándar de actividad de agua de la carne.	18
Figuras	Página
1. Isoterma de adsorción en película control ajustado al modelo de Guggenheim-Anderson de Boerd	8
2. Isoterma de adsorción de película con adición de 2.5% de quitosano, ajustado al modelo de Guggenheim-Anderson de Boerd	9
3. Isoterma de adsorción de película con adición de 5% de quitosano, ajustada al modelo de Guggenheim-Anderson de Boerd	9
4. Micrografías de fractura y superficie de la película control (sin adición de quitosano) a 800x y 1600x de resolución	10
5. Micrografías de fractura y superficie de la película QTS2.5% a 800x y 1600x de resolución.....	11
6. Micrografías de fractura y superficie de la película QTS5% a 800x y 1600x de resolución.....	12

1. INTRODUCCIÓN

La demanda de alimentos funcionales; nutritivos, de fácil transporte y almacenamiento se ha vuelto una tendencia, obligando a innovar y extender el enfoque de la preservación alimenticia, más allá de la protección y prolongación de la vida de anaquel (Camacho Elizondo *et al.* 2011). Las películas y recubrimientos comestibles constituidos por polisacáridos, proteínas y lípidos presentan una tecnología respetuosa con el ambiente que responde a la demanda de consumidores de alimentos saludables, naturales y mínimamente procesados. Estos son aplicados en frutas y vegetales incluso en productos cárnicos que demandan procesos térmicos y químicos para asegurar un período de vida útil prolongado. Aquí surge la necesidad de alternativas menos agresivas con los alimentos, que conserven sus propiedades nutricionales y a la vez extiendan su vida de anaquel (Rodríguez *et al.* 2014).

Los polímeros usados para empaques alimenticios convencionales son derivados de fuentes fósiles no renovables y no biodegradables. Las ventajas de los biopolímeros como material de empaque son: disponibilidad, bajo costo, compatibilidad y biodegradabilidad. Biopolímeros como el almidón y el quitosano son altamente estudiados por ser alternativas renovables y funcionales, que abren paso al desarrollo de nuevos productos, al mejoramiento de perfiles nutricionales con películas comestibles, a la incorporación de compuestos activos y la disminución del impacto ambiental (Marvizadeh *et al.* 2017). El almidón termoplástico es obtenido por termoprensado, en presencia de plastificantes como el glicerol, ampliamente aplicado en la elaboración de materiales biodegradables. Para mejorar las características mecánicas de materiales de empaque a base de almidón, el almidón termoplástico se usa en mezcla con otros polímeros. El poli adipato (co-tereftalato de butileno) (PBAT) es un polímero derivado del petróleo y se produce por policondensación. Es biodegradable, con buenas propiedades mecánicas, térmicas, de degradación y resistencia. El PBAT presenta características interesantes en mezclas con almidón termoplástico, promoviendo el estudio con otros polímeros como fase continua (Bonametti 2010).

Los empaques activos son aquellos que interactúan con el alimento y prolongan su vida de anaquel por la incorporación de compuestos antioxidantes, quelantes, capturadores de oxígeno y gases, absorbentes de humedad y antimicrobianos (Brody *et al.* 2002). Las películas antimicrobianas son películas activas que poseen un agente antimicrobiano incorporado en la matriz plástica. Los antimicrobianos incorporados se clasifican en: no volátiles como las bacteriocinas, enzimas, ácidos orgánicos y bacteriófagos y volátiles como los aceites esenciales (EO's), alil isotiocianato (AITC) y dióxido de cloro (ClO₂) (Otoni *et al.* 2016).

Naturalmente, existen agentes antimicrobianos de origen animal que incluyen proteínas, enzimas, hidrolasas y polisacáridos, como el quitosano y, de origen vegetal, como compuestos fenólicos, ácidos orgánicos y fitoalexinas (Rodríguez 2011). El quitosano es un polisacárido producido por la N-desacetilación de la quitina, encontrada en el exoesqueleto de crustáceos. El quitosano presenta propiedades fisicoquímicas únicas; biocompatibilidad, biodegradabilidad, atoxicidad, actividad antimicrobiana, y baja permeabilidad (Blanquicet Macea *et al.* 2015). Su capacidad antimicrobiana fue comprobada en películas de polietileno de baja densidad (Low Density Polyethylene - LDPE), en las que presentó inhibición de *E. coli*, mostrando empleo promisorio en mezclas con otros polímeros (Reesha *et al.* 2015).

El sector cárnico es uno de los pioneros en la aplicación de empaques activos, para el control de los múltiples factores que afectan la vida de anaquel de la carne. Debido a que la carne es un vehículo de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA's) y susceptible al deterioro, su calidad microbiológica indica el nivel de higiene durante el procesamiento y determina su vida de anaquel. El recuento de microorganismos indicadores como las Bacterias Mesófilas Aerobias (BMA) advierten la presencia de bacterias patógenas como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp, *Clostridium perfringens* y *Yersinia enterocolitica*, causantes de ETA's (Rodríguez y Regalado 2007).

Este estudio se fundamentó en la caracterización y evaluación de la efectividad antimicrobiana de películas de quitosano/PBAT y almidón de yuca aplicada en carne fresca; por lo cual los objetivos del presente estudio:

- Determinar las propiedades mecánicas, de barrera y estructurales de películas de almidón/PBAT sin y con quitosano.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana del quitosano en películas de almidón y PBAT en carne fresca durante siete días de almacenamiento a 7 °C.
- Evaluar el efecto de las películas en las propiedades físico-químicas de la carne.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación.

El proyecto de investigación se realizó en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad Estadual de Londrina, Brasil y en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos Zamorano, Honduras. Se produjeron las películas en el Laboratorio de Tecnología de Materiales Biodegradables y la capacidad de inhibición microbiana de las películas se estudió en el laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano.

Materiales.

El PBAT fue adquirido de BASF (Alemania) con nombre comercial Ecoflex ® BLEND C1200 y el almidón de yuca de la compañía Indemil Ind. Com. Ltda., ubicada en (Paranavaí, Brasil). El glicerol (Dinamica, Sao Paulo, Brasil) y el ácido cítrico (Dinamica, Sao Paulo, Brasil) fueron utilizados como plastificantes al mezclar los polímeros. Como agente antimicrobiano se usó quitosano (Polymar Ind. Com. Ltda., Fortaleza, Brasil), con grado de desacetilación de 87.4% y viscosidad de 176 cPs a 20 °C, previamente tamizado con zaranda marca Abert 250, 60 mesh (0.250 mm) (Bertel Ind. Met. Ltda, Sao Paulo, Brasil). Se utilizó el músculo *Semitendinosus* de la parte posterior de la canal bovina para medir la eficiencia antimicrobiana de las películas.

Producción de las películas.

Se desarrollaron tres tipos de películas (Control, quitosano al 2.5% (QTS2.5%) y quitosano al 5% (QTS5%) siguiendo las formulaciones mostradas en el Cuadro 1. Para las distintas formulaciones se mezclaron los componentes en el siguiente orden: quitosano con glicerol y ácido cítrico, PBAT y almidón. Se homogenizó manualmente cada formulación y se deshicieron los grumos. El proceso de producción de la película se hizo en dos etapas: peletización y formación. Primeramente, las mezclas fueron alimentadas en la extrusora piloto marca BGM (modelo EL-25, Taboão da Serra, Brasil), con rosca de 25 mm de diámetro y 700 mm de longitud. Se utilizaron temperaturas de 90, 110, 110, 100 °C y boquilla con 6 orificios de 2 mm de diámetro cada uno. Los perfiles circulares obtenidos fueron transformados en pellets.

Los pellets fueron procesados en la misma extrusora para la formación de la película por extrusión-soplo. La velocidad de la rosca fue de 35 RPM y perfil de temperatura de 90, 110, 110, 115, 115 °C.

Cuadro 1. Formulaciones para producción de las películas.

Formulación	Polímeros		Plastificante	Antimicrobiano
	Almidón (g)	PBAT (g)	Glicerol (g)	Quitosano (g)
Control	511	300	189	0
QTS2.5%	486	300	189	25
QTS5%	461	300	189	50

En todas las formulaciones se usó ácido cítrico (0.02%) en relación al peso total.

Control: Película sin quitosano.

QTS2.5%: Película con concentración de 2.5% de quitosano.

QTS5%: Película con concentración de 5.0% de quitosano.

Caracterización de las películas.

Espesor.

Se midió el espesor de la película con un micrómetro digital marca (Digimies IP54, Sao Paulo, Brasil), con resolución de 0.001 mm, se tomaron tres mediciones por muestra con área de 2×5 cm; dos en los extremos de la película y una en el centro.

Propiedades mecánicas.

La tracción de las películas fue determinada utilizando Texturometer Stable Micro System (modelo TA. TX2i, Inglaterra) con acople de garra. Se prepararon 15 muestras de 5×2 cm para cada tratamiento, 48 h antes del análisis se condicionó en desecador con solución saturada de $Mg(NO_3)_2$ a humedad relativa de 52.9%. Se determinó módulo de Young (MPa), resistencia a la tracción (MPa) y elongación a la ruptura (%).

Permeabilidad al vapor de agua.

La permeabilidad al vapor de agua fue determinada de acuerdo al método ASTM E-96 (C16 Committee 2005). Se condicionó previamente cada muestra por triplicado con solución saturada de $Mg(NO_3)_2$ a una humedad relativa de 52.9%. En el interior de celdas de permeación de aluminio, de 60 mm de diámetro, se colocó una solución saturada de $MgCl_2$ (humedad relativa de 33%). Se aplicó grasa de silicona en los bordes de las celdas y se adhirieron las muestras. El sistema celda/muestra se introdujo en un desecador condicionado a humedad relativa de 65% con solución saturada de $Na(NO_2)_3$. Se pesaron las muestras, sucesivamente, en intervalos de 24 h durante 8 días. La ganancia de masa (m) fue graficada en función del tiempo (t) y la permeabilidad al vapor de agua (PVA) se determinó por el coeficiente angular (m/t) y la unidad de área del material a una determinada espesura, estimulado por el diferencial de presión de vapor (Grossmann 2017).

Isotermas de adsorción.

Se condicionó previamente las muestras a 0% de humedad relativa, con CaCl_2 durante 7 días, después se colocó una masa conocida dentro del equipo generador de isotermas Aquasorb (Decagon devices, EUA). Se modelaron los datos a la ecuación de GAB y se evaluó la calidad de ajuste con el coeficiente de determinación R^2 .

Microscopia electrónica de barrido (MEB).

Se realizaron análisis de morfología superficial y de fractura de las películas en microscopio electrónico de barrido (Philips, modelo FEI Quanta 200, Japón). Se acondicionaron las muestras a 0% de humedad relativa con CaCl_2 , 48 h antes del análisis, se aplicó nitrógeno líquido para la realización de la fractura de las muestras. Las películas se revistieron con oro en Sputter Coater (Bal-Tec, modelo SCD-050, Balzers, Liechtenstein) y las muestras se introdujeron en la cámara de vacío del microscopio para su visualización.

Aplicación de películas como láminas activas en carne fresca.

Preparación de la carne y aplicación de las películas.

Se colocaron dos pedazos de carne *Semitendinosus* de aproximadamente 0.7 cm de espesura en bandejas de poli-estireno expandido. Las películas se aplicaron entre los cortes de carne, en la parte inferior y en la superior, a manera de lasagna (película, carne, película, carne, película).

Propiedades físico-químicas de la carne.

Se midió el color de la carne entera con (Hunter lab, Color flex). Se determinó pH con potenciómetro marca (Termo Scientific Orion Star, USA) y Actividad Agua (A_w) con (Aqualab® serie 3 TE).

Recuento total viable de bacterias mesófilas en la carne.

Se tomaron 10 g de carne por tratamiento: sin película (SP), Control, QTS2.5%, QTS5%, los días 0, 3, 5 y 7. Las muestras de los diferentes tratamientos se colocaron en bolsas plásticas, se añadió 90 ml de agua peptonada y se mezclaron en un stomacher por 1 min. Se hicieron diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} para los días 0 y 3. Para los días 5 y 7 se hicieron diluciones hasta 10^{-5} . Se inocularon alícuotas de 1 ml en platos Petri™ con agar ACE mediante vaciado en placa y se incubaron a 36 °C por 48 h.

Diseño estadístico.

Se usó un diseño de Bloques Completos al Azar (BCA) con tres repeticiones y cuatro medidas repetidas en el tiempo (0, 3, 5, 7 días) con separación de medias LSmeans, para el análisis de la efectividad antimicrobiana de la película. Para el análisis estadístico de los resultados de las propiedades mecánicas de las películas se usó un diseño Completamente al Azar y una separación de medias Duncan, utilizando el programa Statistical Analysis System (SAS).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Propiedades mecánicas de películas.

Las propiedades mecánicas de materiales biodegradables (tensión (MPa), elongación (%) y módulo de Young) son importantes para la determinación de su resistencia y flexibilidad al definir su capacidad de protección y adaptación a la deformación (Mali *et al.* 2008). No hubo diferencias ($P > 0.05$) en la tensión (MPa) o resistencia a la tracción entre tratamientos. No obstante, se observaron diferencias ($P < 0.05$) en la propiedad mecánica de elongación, siendo la película con adición de 5% de quitosano la de menor elongación (Cuadro 2). Resultados similares los observó Sanchez *et al.* (2012) en películas de almidón de yuca y quitosano, donde la presencia de quitosano mostró aumento de rigidez, pero disminución del porcentaje de elongación. La elongación del control y de la película QTS2.5% no fueron diferentes ($P > 0.05$), debido probablemente a que la cantidad de quitosano no fue la suficiente para desarrollar una interacción fuerte entre los grupos OH libres del almidón y el quitosano (Salgado 2013).

El módulo de Young de las películas fue mayor ($P < 0.05$) para películas con 5% de quitosano (Cuadro 2). Esto se atribuye a que el almidón al ser gelatinizado pierde el arreglo lineal de su región cristalina y los grupos OH quedan libres para formar enlaces, interactuando con el grupo amino (NH_2) del quitosano (Salgado 2013). Esta interacción aumenta a mayor concentración de quitosano, causando mayor rigidez de la película. Estudios realizados por Salgado (2013) muestran que películas de almidón de trigo con adición de quitosano mejoraron las propiedades mecánicas de las películas de almidón en cuanto a rigidez y resistencia.

Para la aplicación pretendida de las películas, no es necesario una alta resistencia a la tracción, elongación y rigidez. Pero estas propiedades sí son importantes durante la producción y su posterior manejo. Al ser el almidón un polisacárido altamente hidrofílico presenta propiedades mecánicas moderadas y de barrera limitadas (Mali *et al.* 2008).

Cuadro 2. Propiedades mecánicas de películas de almidón, PBAT y quitosano.

Tratamiento	Tensión (MPa)	Elongación (%)	Módulo de Young (MPa)
^j Control	1.23 ± 0.17 ^A	23.61 ± 4.46 ^A	11.16 ± 2.02 ^A
^q QTS2.5%	1.12 ± 0.15 ^A	23.17 ± 4.38 ^A	11.43 ± 1.33 ^A
³ QTS5%	1.15 ± 0.12 ^A	15.79 ± 2.64 ^B	13.47 ± 1.90 ^B

^{AB}Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P < 0.05).

^jPelícula sin adición de quitosano.

^qPelícula con concentración de 2.5% de quitosano.

³Película con concentración de 5% de quitosano.

Permeabilidad al vapor de agua.

La permeabilidad al vapor de agua es una propiedad de barrera que muestra la tasa de transmisión de agua en la película, por unidad de área, a una determinada espesura, inducidas por la diferencia de presión entre los dos lados de la misma (Grossmann 2017). En películas de almidón y quitosano la permeabilidad al vapor de agua está influenciada por la cantidad de plastificante y condiciones ambientales como temperatura y humedad relativa. La importancia de esta propiedad radica en la aplicación de las películas, la cual es limitada por la característica hidrofílica de los polímeros usados, afectando la eficiente propiedad de barrera. No obstante, serían adecuados para vegetales frescos, y no permeables para alimentos deshidratados (Elsabee y Abdou 2013).

La permeabilidad de las películas fue diferente (P < 0.05), siendo el control el menos permeable (Cuadro 3). Estudios realizados en la estimación de permeabilidad de agua en películas a base de quitosano (Trejo *et al.* 2001) mostraron que la alta propiedad hidrofílica del quitosano aumenta la afinidad con el agua. Los resultados obtenidos se atribuyen a que la relación del quitosano y almidón (los dos son hidrofílicos) aumenta la afinidad por el agua de las películas, provocando que la permeabilidad aumente (Elsabee y Abdou 2013). Los poros y grietas presentes en las películas con quitosano también pudieron haber sido responsables por la mayor permeabilidad. Los tratamientos con quitosano exhibieron permeabilidad al vapor de agua similares (P > 0.05).

Cuadro 3. Promedios y desviación estándar de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas.

Tratamientos	PVA (g/m. Pa.día)
^j Control	6.05 x 10 ⁻⁶ ± 1.23 x 10 ⁻⁶ ^A
^q QTS2.5%	1.21 x 10 ⁻⁵ ± 2.02 x 10 ⁻⁶ ^B
³ QTS5%	1.08 x 10 ⁻⁷ ± 3.28 x 10 ⁻⁷ ^B

^{AB}Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas (P<0.05).

^jPelícula sin adición de quitosano.

^qPelícula con concentración de 2.5% de quitosano.

³Película con concentración de 5% de quitosano.

Isotermas de absorción.

Las isotermas de adsorción muestran la relación de equilibrio entre la humedad y la actividad de agua, y su importancia radica en el pronóstico de alteraciones que la película sufrirá en diferentes humedades relativas (Bonametti 2010). Los resultados mostraron un buen ajuste al modelo de Guggenheim-Anderson de Boerd (GAB) en todas las isotermas (C, K, Mo) para todos los tratamientos (Cuadro 4, Fig. 1, 2 y 3) con $R^2 > 0.98$. Los parámetros C, K y Mo brindan información de la monocapa y el calor de adsorción de la monocapa y multicapa, donde C es la constante relacionada al calor de absorción de la monocapa, K es la constante relacionada al calor de las multicapas y Mo es el contenido de humedad de la monocapa. Estos tres parámetros son importantes para la interacción del agua con sitios polares determinados (Bonametti 2010). La película QTS5% mostró mayor contenido de humedad en la monocapa Mo 7.15 debido a las características hidrofílicas de las partículas del quitosano.

Cuadro 4. Parámetros de Guggenheim-Anderson de Boerd para isotermas de absorción de películas.

Tratamientos	C	K	Mo	R ²
¹ Control	2.61	0.977	5.77	0.99
² QTS 2.5%	1.67	0.978	5.39	0.99
³ QTS5%	0.97	0.886	7.15	0.98

¹Película sin adición de quitosano.

²Película con concentración de 2.5% de quitosano.

³Película con concentración de 5% de quitosano.

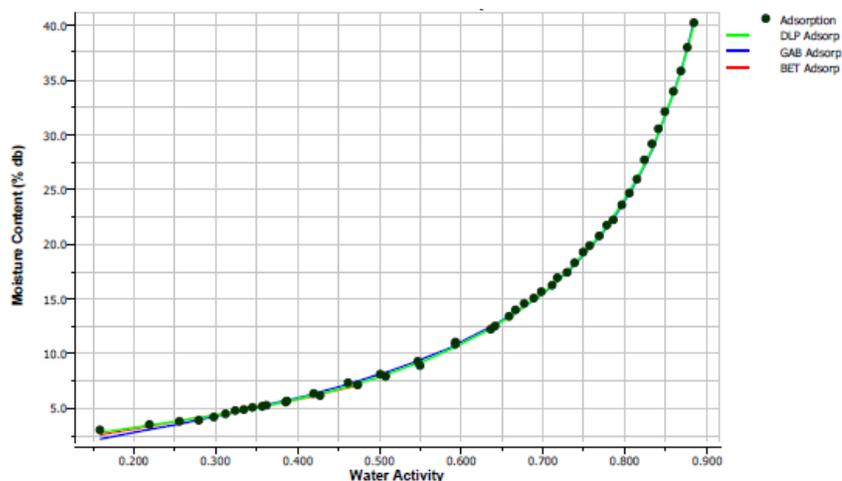


Figura 1. Isoterma de adsorción en película control ajustado al modelo de Guggenheim-Anderson de Boerd.

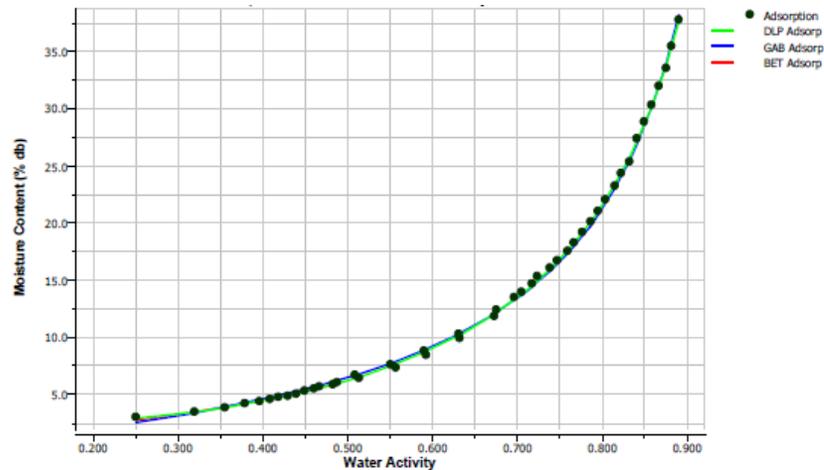


Figura 2. Isotherma de adsorción de película con adición de 2.5% de quitosano, ajustado al modelo de Guggenheim-Anderson de Boerd.

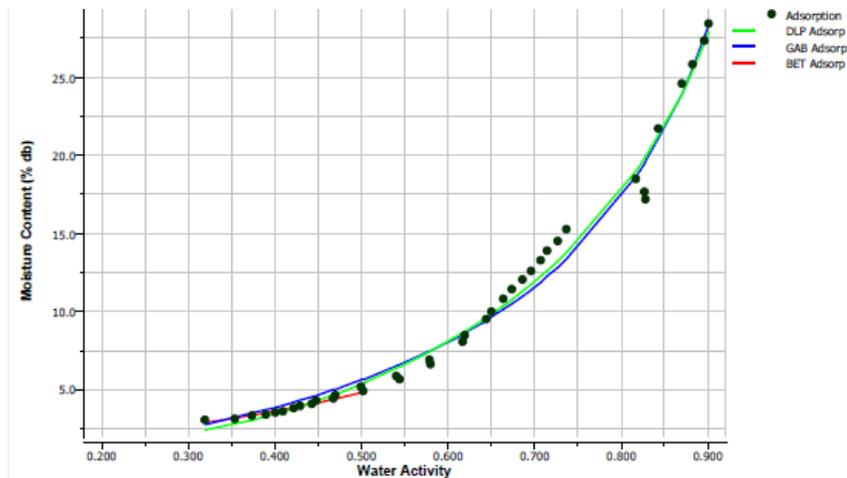


Figura 3. Isotherma de adsorción de película con adición de 5% de quitosano, ajustada al modelo de Guggenheim-Anderson de Boerd.

Microscopía electrónica de barrido. La importancia de estudiar la morfología estructural de mezclas poliméricas, radica en la comprensión del comportamiento de los polímeros y la asociación de su efecto en las propiedades mecánicas de las películas (Ning *et al.* 2007). Dichas observaciones se realizan en micrografías de fractura transversal y de superficie, para identificar el arreglo de los componentes y su compatibilidad.

La película control mediante MEB a resolución de 1600x, evidenció una estructura compacta y con presencia de gránulos de almidón en forma de donas (Figura 4). Estudios realizados por Xie *et al.* (2006) en extrusión de mezclas de almidón y PBAT mostraron que la presencia de ácido cítrico resultan en películas con estructuras compactas, pero también con presencia de gránulos con formas similares a donas. Estos efectos fueron atribuidos a la concentración del ácido cítrico usado (menor al 2% de la masa total de la mezcla). La presencia de almidones en forma de donas es una característica indeseable en películas ya

que interfiere negativamente en la interacción del almidón y PBAT (Bonametti 2010) (Figura 4). Superficialmente se observaron los gránulos de almidón distribuidos y atrapados en la matriz del PBAT. Esta gelatinización incompleta del almidón, podría ser evitada con modificación en el proceso de producción de las películas, con ajuste de la temperatura y velocidad del tornillo sin fin.

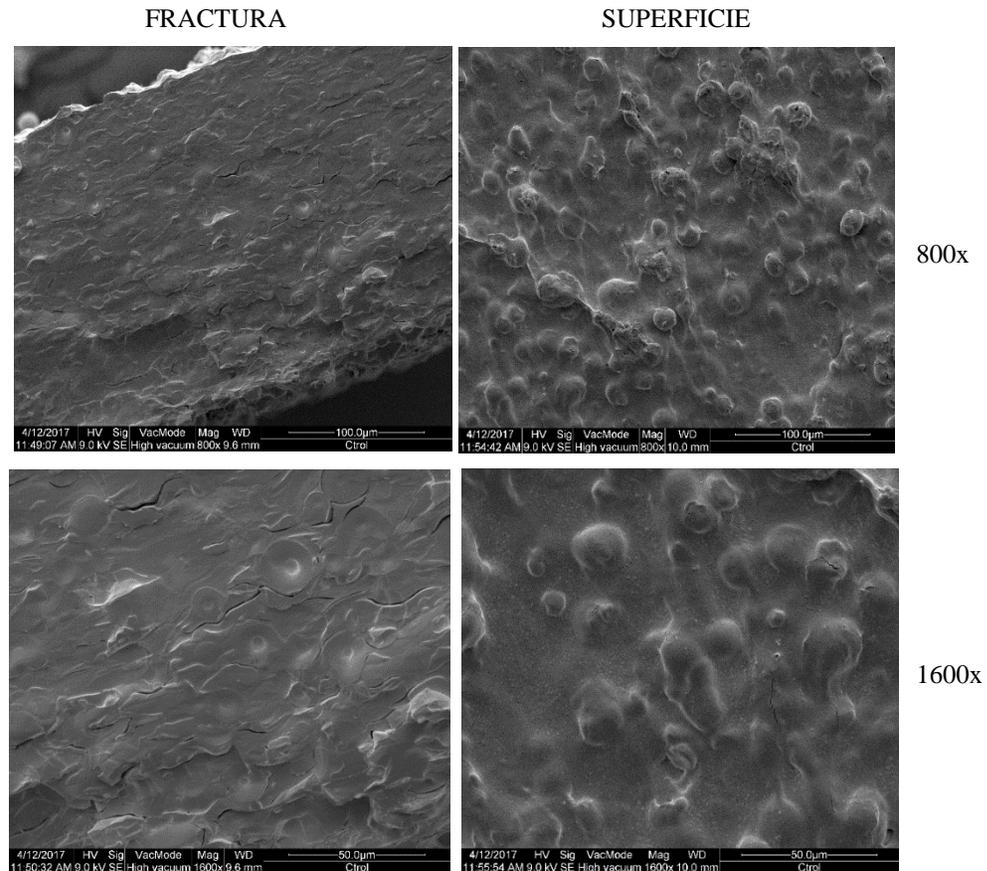


Figura 4. Micrografías de fractura y superficie de la película control (sin adición de quitosano) a 800x y 1600x de resolución.

Las imágenes de microscopía de fractura de películas de QTS2.5% mostraron compactación y grietas (Figura 5). Estas se atribuyen a la presencia de quitosano en la matriz polimérica afectando evidentemente las propiedades de barrera de la película (Cuadro 3). La cantidad de plastificante (glicerol, ácido cítrico) se mantuvo en porcentajes menores al 2% por lo tanto también hubo formación de gránulos de almidón en forma de donas, aunque en menor cantidad a los observados en la película control. Resultados similares fueron encontrados por Bonilla *et al.* (2013) en mezclas de quitosano con ácido poliláctico (PLA), donde la superficie de fractura mostró irregularidades por el tamaño de la partícula del quitosano. Superficialmente las películas de QTS2.5% mostraron rugosidades y regiones con aglomerados que formaron poros y grietas. También, los gránulos de almidón fueron visibles en la matriz, atribuido al proceso de gelatinización incompleto como se mencionó anteriormente (Figura 5).

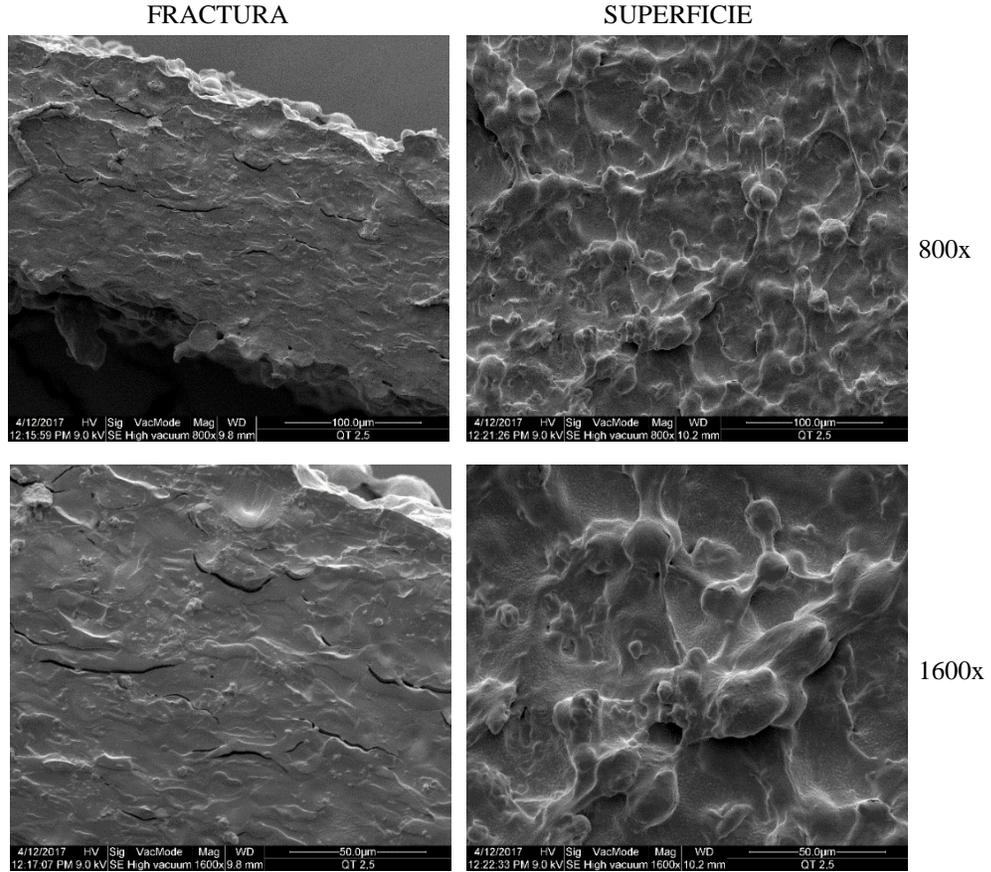


Figura 5 Micrografías de fractura y superficie de la película QTS2.5% a 800x y 1600x de resolución.

La microscopía de fractura de películas con QTS5% (Figura 6) mostró grietas al igual que las películas con 2.5%, pero la superficie de fractura fue menos rugosa, esto se puede atribuir a que con la mayor presencia de quitosano el almidón tiene mejor interacción. Adicionalmente, las superficies de las películas con QTS5% mostraron poros distribuidos en toda el área, en mayor proporción que las películas con 2.5% de quitosano. Esto se atribuye a que la concentración de quitosano en la matriz provoca discontinuidad e irregularidad en la superficie de la película. Al igual que en los tratamientos anteriores se observó la formación de gránulos de almidón atribuidos a un proceso incompleto de gelatinización el cual puede mejorar con ajustes de temperatura y presión en el proceso de extrusión de la película.

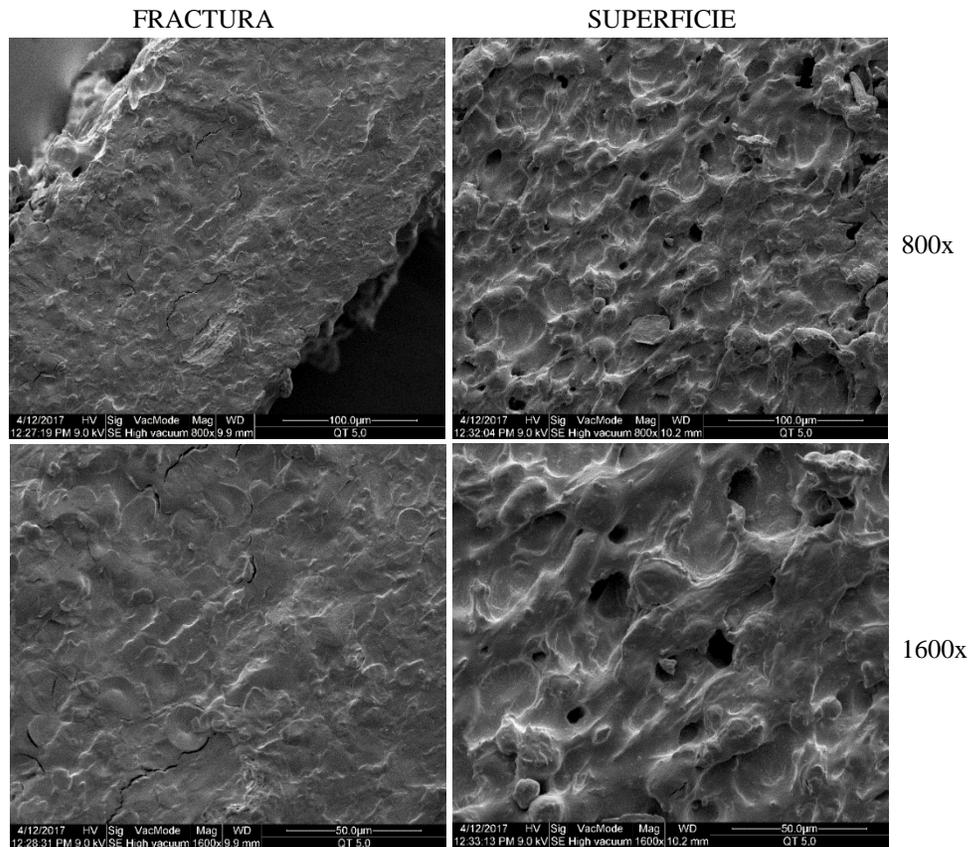


Figura 6. Micrografías de fractura y superficie de la película QTS5% a 800x y 1600x de resolución.

Aplicación de las películas en empaques para carne fresca.

Análisis microbiológico.

La carne debido a su composición química y su actividad de agua es considerada un alimento susceptible a la contaminación microbiológica (Restrepo *et al.* 2001). La carga inicial promedio de mesófilos aerobios estuvo por debajo de los parámetros exigidos para carne fresca, el cual es 10^{-7} UFC/g (Cuadro 5).

El conteo microbiológico no fue diferente ($P > 0.05$) entre tratamientos. Sin embargo, existieron diferencias ($P < 0.05$) en UFC/g entre los días de almacenamiento. Estos mostraron crecimiento microbiano desde el día 0 hasta el día 7 de almacenamiento ($P < 0.05$). Este comportamiento se atribuye al consumo microbiano de nutrientes de la carne, tales como azúcares y aminoácidos libres, que permiten el crecimiento microbiológico (Ercolini *et al.* 2009). La interacción fuerte entre los polímeros que forman las películas, sobre todo la compatibilidad entre el almidón y el quitosano, explica la incapacidad antimicrobiana de las películas que tenían quitosano, ya que los tratamientos no mostraron diferencias ($P > 0.05$) (Cuadro 5).

Los resultados de este estudio se respaldan con lo encontrado por Park *et al.* (2010) en películas de LDPE con quitosano aplicadas a cortes de carne, donde las películas no inhibieron el crecimiento bacteriano. Estos resultados se debieron a que el quitosano no se disolvió en un medio ácido. Por lo cual, los grupos amino que se protonizan en soluciones ácidas de ácido acético y láctico a pH <6.3 no se formaron; evitando la interacción con las cargas negativas de fosfolípidos, lipo-polisacáridos, proteínas, iones de Mg y Ca, que se encuentran dentro de la membrana celular de las bacterias y subsecuentemente evitando la lisis celular (Hypolito 2014).

La migración del quitosano como compuesto antimicrobiano depende de las interacciones electrostáticas con los polímeros que forman la película y de factores ambientales como: temperatura, humedad y tiempo de almacenaje. El quitosano al formar parte de la estructura de la película, interactuó fuertemente con el almidón, el PBAT y el plastificante, siendo con el almidón más afín por ser ambos componentes hidrofílicos, reduciendo su interacción con los microorganismos. La temperatura de 7 °C de almacenamiento fue un factor ambiental que influyó en la difusión efectiva del quitosano, como lo menciono Bohórquez *et al.* (2016).

El efecto de la temperatura se puede respaldar en lo mencionado por Bie *et al.* (2013) en estudios sobre la capacidad antimicrobiana de películas de quitosano y PLA, donde sus resultados fueron positivos a temperaturas de 37 °C mediante el método de difusión por agar. A diferencia de nuestro estudio que no mostro efectividad antimicrobiana a temperaturas de 7 °C. No obstante, la metodología usada por Bie *et al.* (2013) en este estudio fue diferente.

Cuadro 5. Promedios y desviación estándar del conteo de bacterias mesófilas aerobias en carne.

Tiempo	Tratamientos ^o			
	SP	CONTROL	QTS2.5%	QTS5%
DÍA 0	3.93 ± 1.01 ^A	3.90 ± 1.36 ^A	3.85 ± 1.07 ^A	3.66 ± 0.76 ^A
DÍA 3	4.64 ± 0.46 ^{AB}	4.84 ± 0.24 ^{AB}	4.66 ± 0.33 ^{AB}	4.76 ± 0.30 ^{AB}
DÍA 5	5.96 ± 0.99 ^{BC}	5.58 ± 0.51 ^{BC}	5.46 ± 0.44 ^B	5.66 ± 0.91 ^B
DÍA 7	6.49 ± 1.59 ^C	5.52 ± 1.33 ^C	5.65 ± 1.34 ^B	6.23 ± 1.48 ^B
CV%	19.64	19.90	17.15	15.66

^oNo hubo diferencia entre tratamientos (P > 0.05).

^{AB}Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tiempos (P < 0.05).

CV: Coeficiente de variación.

SP: Carne sin película, Control: Película sin quitosano, QTS2.5%: Película con 2.5% de quitosano, QTS5%: Película con 5% de quitosano.

Análisis de color. El color de la carne es uno de los parámetros más importantes para el consumidor. Durante el proceso de refrigeración ocurren cambios relacionados con la

mioglobina y son discriminados por el consumidor, causando pérdidas anuales en EEUU de \$1 billón para las industrias cárnicas (Steele *et al.* 2016).

El parámetro CIE L^* o luminosidad está asociado con el estado físico de la carne debido al pH y alineación de las fibras musculares (Braña *et al.* 2011). Las muestras analizadas presentaron un rango de valores de CIE L^* entre 37.98 y 39.41 en almacenamiento y no se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre tratamientos. Sin embargo, a través del tiempo, los valores L^* de los tratamientos SP y QTS5% tuvieron diferencias similares ($P < 0.05$).

La luminosidad de la carne aumentó en los tratamientos Control, SP y QTS5% a partir del día 3, mientras que en la carne tratada con QTS2.5% no cambió éste parámetro durante los 7 días de almacenamiento (Cuadro 6). El color de la carne se manifiesta como la interacción de varios factores, donde el pH y la actividad de agua de la carne influyen, ya que la capacidad de retención de agua de las miofibrillas, disminuye a pH ácidos provocando exudación de los cortes de carne. Esto causa que el valor CIE L^* se incremente, ya que el agua tiene una onda de luz que refleja y aumenta los valores de luminosidad (González *et al.* 2014).

Cuadro 6. Valores promedio y desviación estándar de CIE L^* de la carne.

Tiempo	Tratamientos [¶]			
	SP	CONTROL	QTS2.5%	QTS5%
DÍA 0	39.41 ± 2.32 ^B	37.98 ± 2.81 ^B	39.22 ± 2.47 ^A	38.72 ± 2.25 ^B
DÍA 3	42.30 ± 2.52 ^A	41.18 ± 3.27 ^A	41.33 ± 3.53 ^A	39.34 ± 2.62 ^A
DÍA 5	40.80 ± 2.66 ^{AB}	43.31 ± 3.87 ^A	40.20 ± 3.25 ^A	41.58 ± 3.49 ^{AB}
DÍA 7	40.26 ± 4.48 ^{AB}	41.64 ± 3.09 ^A	39.04 ± 3.77 ^A	40.91 ± 2.16 ^{AB}
CV%	7.89	8.09	7.25	6.65

[¶]No hubo diferencia entre tratamientos ($P > 0.05$).

^{AB}Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tiempo ($P < 0.05$).

CV%: Coeficiente de variación.

SP: Carne sin película, Control: Película sin quitosano, QTS2.5%: Película con 2.5% de quitosano, QTS5%: Película con 5% de quitosano.

La mioglobina es la proteína responsable del color rojo de la carne, cuando el oxígeno actúa sobre esta proteína da lugar a dos compuestos: oximioglobina y metamioglobina. La formación de la oximioglobina se da por la oxidación de sustratos disponibles, donde el Fe^{+2} presente en la carne se mantiene en valencia +2, provocando color rojo brillante. La metamioglobina se produce cuando los sustratos disponibles se agotan y el O_2 empieza a actuar sobre el Fe^{+2} , causando un color café (Restrepo *et al.* 2001).

El Cuadro 7 muestra los valores CIE a^* promedios iniciales (Día 0) de todos los tratamientos siendo estos no diferentes ($P > 0.05$). El valor mínimo inicial encontrado fue de 16.82 y el máximo de 18.46. A través del tiempo, se observaron diferencias ($P < 0.05$).

en valores CIE a* para los tratamientos SP, Control y QTS5% detectables después del día 5 (Cuadro 7). Esto acontece por el efecto de factores intrínsecos de la carne como oxidación de proteínas sarcoplasmáticas y factores externos como la temperatura.

La carne en contacto con películas con 2.5% de quitosano no mostró cambios durante los 7 días de almacenamiento. Lo cual se atribuye a que el quitosano se comporta como agente quelante de algunos metales por sus grupos aminos e hidroxilos que actúan como donadores de electrones. El hierro es un componente de la metmioglobina y promueve la oxidación, pero puede ser absorbido por el quitosano, esta interacción puede estabilizar el color superficial de la carne (Park *et al.* 2010). Resultados similares menciona Park *et al.* (2010) en estudios sobre el efecto de películas de LDPE y quitosano en el color de la carne, donde se obtuvo retención de CIE a*, asociado a la propiedad quelante y antioxidante del quitosano.

Cuadro 7. Valores promedio y desviación estándar de CIE a* de la carne.

Tiempo	Tratamientos ^φ			
	SP	CONTROL	QTS2.5%	QTS5%
DÍA 0	17.43 ± 2.29 ^A	18.26 ± 3.43 ^A	16.82 ± 2.72 ^A	18.46 ± 2.35 ^A
DÍA 3	19.40 ± 3.89 ^A	17.31 ± 2.39 ^A	16.56 ± 2.92 ^A	17.84 ± 2.61 ^A
DÍA 5	19.74 ± 3.06 ^A	18.61 ± 2.15 ^A	16.91 ± 2.34 ^A	17.69 ± 2.59 ^A
DÍA 7	14.71 ± 3.30 ^B	13.33 ± 1.81 ^B	14.62 ± 2.48 ^A	13.36 ± 1.43 ^B
CV%	17.08	15.22	15.32	16.07

^φNo hubo diferencia entre tratamientos (P > 0.05).

^{AB}Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tiempo (P < 0.05).

CV%: Coeficiente de variación.

SP: Carne sin película, Control: Película sin quitosano, QTS2.5%: Película con 2.5% de quitosano, QTS5%: Película con 5% de quitosano.

El cuadro 8 muestra los valores promedio de CIE b* al día 0, los cuales estuvieron en un rango de 16.85 a 17.75. Se observaron diferencias en CIE b* entre tratamientos y también a través del tiempo (P < 0.05). Al día 3 de almacenamiento, la carne en contacto con películas Control y QTS2.5% presentaron valores menores en CIE b* respecto al tratamiento sin película. Al día 5 el tratamiento QTS2.5% presentó valores menores en CIE b* con respecto a los demás tratamientos (Cuadro 8). Esto se atribuye a la capacidad quelante del quitosano y a las características estructurales de las películas, en una se fija el Fe²⁺ y disminuye la formación de metamioglobina en la carne (Cardoso *et al.* 2016) y en la otra influye la porosidad de las películas como se observó en MEB (Figura 4 y 5).

No obstante, a través del tiempo se observó que la carne en contacto con tratamientos SP, QTS2.5% y QTS5% aumentaron los valores en CIE b* después del día 3 y disminuyeron al día 7, mientras en la carne en contacto con películas Control, los valores CIE b* aumentaron a partir del día 5 y disminuyeron al día 7. Esto indicó que las películas Control,

tienen un efecto retardante durante el proceso de oxidación de la oximioglobina. Esto se atribuye a la porosidad de la película, ya que cubre la superficie de la carne, disminuyendo la tasa de oxidación.

Es considerable mencionar que no se analizó la permeabilidad de las películas al oxígeno, pero los resultados observados en MEB permitieron inferir que la porosidad de las películas, es uno de los factores para la mutabilidad del color en la carne, ya que la metamioglobina se formada por la oxidación específica del Fe^{2+} después de la oxidación de los sustratos presentes, provocando un color indeseable (Battisti *et al.* 2017).

Cuadro 8. Valores promedios y desviación estándar en CIE b^* de la carne.

Tiempo	Tratamientos φ			
	SP	CONTROL	QTS2.5%	QTS5%
DÍA 0	17.75 ± 1.34 ^{B a}	17.52 ± 3.19 ^{BC a}	16.85 ± 1.97 ^{B a}	17.60 ± 2.68 ^{B a}
DÍA 3	20.76 ± 1.70 ^{A a}	18.77 ± 3.22 ^{B b}	18.72 ± 1.49 ^{A b}	19.46 ± 1.67 ^{A ab}
DÍA 5	22.19 ± 2.35 ^{A a}	21.46 ± 2.61 ^{A a}	19.76 ± 2.59 ^{A b}	21.06 ± 1.43 ^{A a}
DÍA 7	16.86 ± 2.24 ^{B a}	16.56 ± 2.12 ^{C a}	16.89 ± 1.02 ^{B a}	16.81 ± 1.56 ^{B a}
CV%	12.02	8.81	9.34	10.04

^{AB} Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tiempo ($P < 0.05$).

^{ab} Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

CV%: Coeficiente de variación.

SP: Carne sin película, Control: Película sin quitosano, QTS2.5%: Película con 2.5% de quitosano, QTS5%: Película con 5% de quitosano.

Análisis químicos de pH en carne.

El pH es un factor importante en la calidad de la carne, influye en la capacidad de retención de agua, crecimiento microbiano, textura y color. El pH final de la carne depende de la cantidad de glucógeno acumulado y las condiciones de manejo antes de sacrificio (Restrepo *et al.* 2001). Los niveles óptimos de pH se estiman en 5.5, los resultados promedios de pH del día 0 en este estudio fueron 5.31 a 5.55 clasificando la carne como RFN (Reddish- pink, firm and no exudative) o carne normal. A pH menores que 6 las proteínas miofibrilares de la carne (actina y miosina) son inestables y pierden la capacidad de retención de agua, pero a pH mayores a 6 el crecimiento microbiano aumenta reduciendo su vida de anaquel.

La concentración de hidrógeno no fue diferente entre tratamientos ($P > 0.05$) (Cuadro 9). Sin embargo, a través del tiempo se observaron diferencias ($P < 0.05$); el pH de los tratamientos Control y QTS2.5% fueron estables a través del tiempo. No obstante, el tratamiento SP mostró un comportamiento variable; aumentando al día 7 en comparación al día inicial, mientras que el tratamiento QTS5% aumento de pH el día 5 y se mantuvo hasta el día 7. Los resultados se relacionan con lo reportado por Trujillo (2016) en estudios del efecto antimicrobiano de extracto etanólico de *Cúrcuma longa L.* y bolsas de poliamida.

Aquí se mencionó que la actividad proteolítica de las bacterias sobre la carne provoca un aumento en el pH, las bacterias se alimentan de carbohidratos, proteínas y grasas, siendo los carbohidratos la fuente más sencilla de obtener energía. El proceso de degradación de la proteína (proteólisis) libera iones de calcio del músculo, cediendo espacios de los cationes divalentes a los cationes monovalentes lo que provoca una reducción de los hidrogeniones libres aumentando el pH (Trujillo 2016).

Cuadro 9. Valores promedios y desviación estándar del pH de la carne.

Tiempo	Tratamientos ^φ			
	SP	CONTROL	QTS2.5%	QTS5%
DÍA 0	5.48 ± 0.02 ^B	5.48 ± 0.16 ^A	5.55 ± 0.17 ^A	5.31 ± 0.77 ^B
DÍA 3	5.66 ± 0.07 ^{AB}	5.65 ± 0.13 ^A	5.63 ± 0.14 ^A	5.72 ± 0.14 ^{AB}
DÍA 5	5.83 ± 0.24 ^{AB}	5.82 ± 0.26 ^A	5.87 ± 0.19 ^A	5.87 ± 0.13 ^{AC}
DÍA 7	6.18 ± 0.81 ^A	5.66 ± 0.07 ^A	5.83 ± 0.08 ^A	5.64 ± 0.26 ^{AB}
CV%	7.56	2.71	2.93	7.15

^φNo hubo diferencia entre tratamientos ($P > 0.05$).

^{AB}Letras mayúsculas diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tiempo ($P < 0.05$).

CV%: Coeficiente de variación.

SP: Carne sin película, Control: Película sin quitosano, QTS2.5%: Película con 2.5% de quitosano, QTS5%: Película con 5% de quitosano.

Análisis químicos de Aw en carne.

La Aw mide el agua libre para reacciones bioquímicas e influye en la proliferación de bacterias y en la vida de anaquel (Restrepo *et al.* 2001). El Cuadro 10 muestra valores promedios iniciales de Aw en la carne entre 0.96 a 0.98. No se observaron diferencias entre tratamientos ($P > 0.05$), pero sí a través del tiempo ($P < 0.05$). La Aw no varió a través del tiempo en la carne sin película (SP) y con película al 5% de quitosano (QTS5%). La Aw disminuyó en el tratamiento Control y QTS2.5% a partir del día 3 y no varió hasta el día 7 (Cuadro 10). Estos resultados se relacionan con la capacidad de retención de agua del almidón y el quitosano, ya que al interactuar con el agua reducen la disponibilidad de esta en el medio (Ospina 2011). Siendo esto positivo debido a que los productos cárnicos están entre los más perecederos por su alto contenido de agua y proteína como lo mencionó Trujillo (2016), lo cual es una ventaja para el control de factores intrínsecos de alimentos mediante métodos barrera.

Cuadro 10. Valores promedios y desviación estándar de actividad de agua de la carne.

Tiempo	Tratamientos ^o			
	SP	CONTROL	QTS2.5%	QTS5%
DÍA 0	0.97 ± 0.01 ^A	0.98 ± 0.03 ^A	0.97 ± 0.01 ^A	0.96 ± 0.03 ^A
DÍA 3	0.95 ± 0.05 ^A	0.93 ± 0.07 ^B	0.93 ± 0.07 ^B	0.93 ± 0.04 ^A
DÍA 5	0.96 ± 0.05 ^A	0.94 ± 0.05 ^B	0.96 ± 0.01 ^{AB}	0.95 ± 0.02 ^A
DÍA 7	0.98 ± 0.02 ^A	0.95 ± 0.03 ^{AB}	0.96 ± 0.02 ^{AB}	0.95 ± 0.02 ^A
CV%	4.07	5.94	3.79	3.34

^oNo hubo diferencia entre tratamientos ($P > 0.05$).

^{AB}Letras diferentes en la misma columna indican diferencias significativas entre tiempos ($P < 0.05$).

CV%: Coeficiente de variación.

SP: Carne sin película, Control: Película sin quitosano, QTS2.5%: Película con 2.5% de quitosano, QTS5%: Película con 5% de quitosano.

4. CONCLUSIONES

- La adición de quitosano a la matriz filmogénica de almidón y PBAT aumentó las propiedades mecánicas de rigidez y la permeabilidad al vapor de agua de las películas.
- Las películas de almidón/PBAT y quitosano aplicadas en carne no mostraron efectividad antimicrobiana durante siete días de almacenamiento.
- La carne en contacto con películas de quitosano al 2.5% presentaron estabilidad en CIE a* a través del tiempo, debido probablemente a la propiedad quelante quitosano.
- Las películas con 2.5% de quitosano presentaron menor oxidación de la mioglobina respecto a los demás tratamientos, la película control retardó el tiempo de oxidación de la mioglobina al ejercer menor presión de oxígeno sobre la superficie de la carne.

5. RECOMENDACIONES

- Estudiar la permeabilidad al oxígeno de películas con concentración de 2.5 y 5% de quitosano.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de las películas usando quitosano solubilizado en ácido acético.
- Usar nanopartículas de quitosano para no afectar la estructura de las películas.

6. LITERATURA CITADA

Battisti R, Fronza N, Vargas JA, Silveira M, Damas MS, Quadri M. 2017. Gelatin-coated paper with antimicrobial and antioxidant effect for beef packaging. *Food Packaging and Shelf Life* (11): 115–124. DOI: 10.1016/j.fpsl.2017.01.009.

Bie P, Liu Peng, Yu L, Li X, Chen L, Xie F. 2013. The properties of antimicrobial films derived from poly (lactic acid)/starch/chitosan blended matrix. *Carbohydrate polymers* 98 (1): 959–966. DOI: 10.1016/j.carbpol.2013.07.004.

Blanquicet Macea R, Flóres de Hoyos C, Gonzáles Montes Y, Meza Fuentes E, Rodríguez Ruiz J. 2015. Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero. *Carbohydrates polymers* 25 (1): 58–69. DOI: 10.1590/0104-1428.1558.

Bohórquez N, Valderrama E, Algecira, Hernandez, Albaracín. 2016. Efecto del almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de tomillo y romero. *Matéria Río J.* 21 (1): 141–156. DOI: 10.1590/S1517-707620160001.0013.

Bonametti Olivato J. 2010. Compatibilizantes en la extrusión reactiva de mezclas de almidón/poli (butileno adipato co-tereftalato) para la producción de películas biodegradables. [Tesis]. Universidad Estadual de Londrina, Brasil. Disponible en línea en <http://livros01.livrosgratis.com.br/cp149524.pdf>.

Bonilla J, Fortunati E, Vargas M, Chiralt A, Kenny JM. 2013. Effects of chitosan on the physicochemical and antimicrobial properties of PLA films. *Journal of food engineering.* 119 (2): 236–243. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2013.05.026.

Braña D, Ramirez E, Rubio M, Sanchez A, Torrescano G, Arenas M. 2011. Manual de análisis de calidad en muestras de carne. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México: [accessed 2017 may 15]. <http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/documents/manuales%20inifap/3.%20Manual%20de%20An%C3%A1lisis%20de%20Calidad%20en%20Muestras%20de%20Carne.pdf>.

Brody A, Eugene R, Lauri R. 2002. *Active packaging for food applications*. Florida: CRC Press. ISBN 1587160455

C16 Committe. 2005. *Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials*. West Conshohocken (EE.UU). ASTM; [accessed 2017 may 16]. <https://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/E96E96M-05.htm>

Camacho Elizondo M, Vega Baudrit J, Campos Gallo A. 2011. Uso de nanomateriales en polímeros para la obtención de bioempaques en aplicaciones alimentarias. *Carbohydrate polymers*. [accessed 2017 jun 26]; 77(4). Disponible en línea en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2011000400007&script=sci_arttext, última comprobación el 13/02/2017.

Cardoso G, Dutra M, Fontes P, Ramos L, Gomide L, Ramos E. 2016. Selection of a chitosan gelatin-based edible coating for color preservation of beef in retail display. *Meat science* (114): 85–94. DOI: 10.1016/j.meatsci.2015.12.012.

Elsabee Z y Abdou S. 2013. Chitosan based edible films and coatings: a review. En: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. 33 (4): 1819–1841. DOI: 10.1016/j.msec.2013.01.010.

Ercolini D, Russo F, Nasi A, Ferranti P, Villani F. 2009. Mesophilic and psychrotrophic bacteria from meat and their spoilage potential *in vitro* and in beef (7). *United States of America: American society for Microbiology*; [accessed 2017 jun 10]. Disponible en línea en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2663181/pdf/2762-08.pdf>.

González M, Mesa C, Quintero O. 2014. Estimación de la vida útil de almacenamiento de carne de res y de cerdo con diferente contenido graso. *Vitae*. [accessed 2017 may 26]; 21 (3): 201–2010. Disponible en línea en <http://www.redalyc.org/pdf/1698/169833713005.pdf>.

Grossmann M. 2017. Caracterização dos materiais biodegradáveis [Tesis]. Universidad Estadual de Londrina, Londrina, BR.

Hypolito MP. 2014. Efeitos da quitosana na inativação fotodinâmica de *Escherichia coli* [Tesis]. Universidad Federal de Uberlandia, Uberlândia, BR.

Mali S, Grossmann M, Yamashita F. 2008. Filmes de amido produção, propriedades e potencial de utilização [Tesis]. Universidad Estadual de Lodrina, Londrina, BR.

Marvizadeh Mohammad M, Oladzadabbasabadi N, Mohammadi Nafchi A, Jokar M. 2017. Preparation and characterization of bionanocomposite film based on tapioca starch/bovine gelatin/nanorod zinc oxide. *Food Biopolymer Research Group*. 99. 1–7. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.067.

Ning W, Jiugao Y, Xiaofei M, Ying W. 2007. The influence of citric acid on the properties of thermoplastic starch/linear low-density polyethylene blends. *Carbohydrate polymers* 67 (3): 446–453. DOI: 10.1016/j.carbpol.2006.06.014.

Ospina S, Alonso R, López J. 2011. Caracterización microbiana y bromatológica de hamburguesas bajas en grasa con adición de fibra de banano verde integro. Grupo de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos (GICTA). [accessed 2017 may 28]; 1

(64): 5993-6005. Disponible en línea en <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v64n1/a22v64n01.pdf>.

Otoni Caio G, Espitia Paula JP, Avena-Bustillos R, McHugh Tara H. 2016. Trends in antimicrobial food packaging systems. Emitting sachets and absorbent pads. En: Food Research International 83: 60–73. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.02.018.

Park S, Marsh Kenneth S, Dawson P. 2010. Application of chitosan-incorporated LDPE film to sliced fresh red meats for shelf life extension. Meat science. 85 (3): 493–499. DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.02.022.

Reesha KV, Panda S, Bindu J, Varghese TO. 2015. Development and characterization of LDPE/chitosan composite antimicrobial film for chilled fish storage. En: International journal of biological macromolecules (79): 934–942. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.06.016.

Restrepo D, Arango Mejía C, Restrepo Digiammarco, Amézquita Campuzano A. 2001. Industria de carnes. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.

Rodríguez Olvera MG, Regalado Gonzales C. 2007. Efecto combinado de atmósferas modificadas y empaques biodegradables y comestibles antimicrobianos en la inocuidad de jamón inoculado con *S. aureus* y *Micrococcus luteus* [Tesis]. Disponible en línea en http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2007/47_6UAQRodriguezOlvera.pdf.

Rodríguez Saucedo E. 2011. Uso de agentes antimicrobianos en la conservación de frutas y hortalizas. Ra Ximhai. [accessed 2017 may 30]; 7 (1): 153–170. Disponible en línea en <http://www.redalyc.org/pdf/461/46116742014.pdf>.

Rodríguez Saucedo R, Rojo Martínez G, Cong Hermida M. 2014. Envases inteligentes para la conservación de alimentos. Ra Ximhai. [accessed 2017 jun 15]; 10 (6): 151–173. Disponible en línea en <http://www.redalyc.org/pdf/461/46132135012.pdf>.

Salgado González I. 2013. Efecto de la adición de quitosano en las propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y oxígeno, brillo y microestructura en films comestibles a base de almidón de trigo [Tesis]. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia. Disponible en línea en <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/28002/peliculas%20ws-ch.pdf?sequence=1>.

Sánchez T, Gracia O, Pinzón M. 2012. Elaboración y caracterización de almidón de yuca. Vitae. [accessed 2017 jun 22]; 19 (1): 426–429. Disponible en línea en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169823914134>.

Steele KS, Weber MJ, Boyle E, Hunt M, Lobaton-Sulabo AS, Cundit.h C. 2016. Shelf life of fresh meat products under LED or fluorescent lighting. Meat science. 32 (117): 75–84. DOI: 10.1016/j.meatsci.2016.02.032 .

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*. [accessed 2017 jun 28]; 45 (1): 1–5. Disponible en línea en <file:///D:/Downloads/Estimaci%C3%B3n%20de%20la%20permeabilidad%20al%20vapor%20de%20agua%20en%20pel%C3%ADculas%20a%20base%20de%20quitos%C3%A1n.pdf>.

Trujillo Insuasti M. 2016. Evaluación del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de *Curcuma longa L.* y dos tipos de empaque, sobre carne molida [Tesis]. Escuela Agrícola Panamericana Zamorano. Disponible en línea en <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/5785/1/AGI-2016-T043.pdf>.

Xie X, Liu Q, Cui SW. 2006. Studies on the granular structure of resistant starches (type 4) from normal, high amylose and waxy corn starch citrates. *Food Research International* 39 (3): 332–341. DOI: 10.1016/j.foodres.2005.08.004.