

***Formulación de una lámina comestible a base de almidón de
farináceos con adición de bacteriófagos.***

Por:
Nydia Esther Muñoz Rodríguez

Tesis sometida en cumplimiento parcial como requisito para el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS
EN
CIENCIA Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO - RECINTO DE MAYAGÜEZ
2012

Aprobado por:

Carlos Ríos-Velázquez, PhD
Miembro, Comité graduado

Fecha

María Aponte-Huertas, PhD
Miembro, Comité graduado

Fecha

Fernando Pérez-Muñoz, PhD
Presidente, Comité graduado

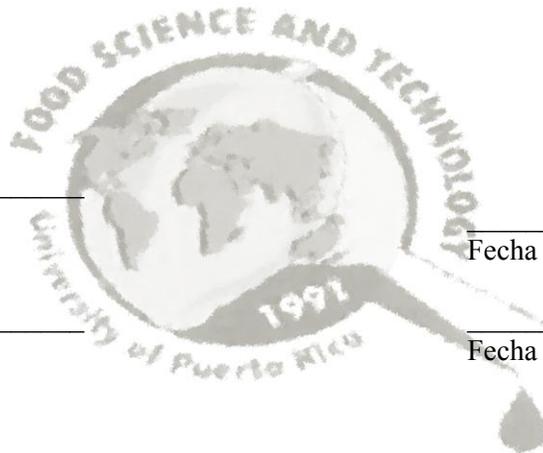
Fecha

Jay Omar Soto-Vélez, MS, MIS
Representante, Estudios graduados

Fecha

Edna Negrón de Bravo, PhD
Coordinadora
Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha



**Derechos de Autor Reservados ©
Nydia E. Muñoz Rodríguez
2012**

RESUMEN

El cultivo de tubérculos en Puerto Rico no satisface la demanda local y frecuentemente no puede competir con los productos importados en precio. Una manera de darle valor agregado a los tubérculos es procesarlos para la producción de almidón, el cual tiene muchas aplicaciones en la industria alimentaria. El propósito de esta investigación es estudiar la producción de almidón para la elaboración de láminas comestibles antimicrobianas. La extracción de almidón se realizó a partir de ñame, yautía, yuca y batata a través de molienda húmeda aplicando un tratamiento químico de inactivación enzimática. La caracterización se basó en el tamaño y forma del gránulo, color, temperatura de gelatinización y análisis proximal. Se utilizaron soluciones de ácido cítrico y bisulfito de potasio para la inactivación enzimática en las siguientes proporciones (1%:0%, 1%:0.25%, 1%:0.50%, 1%:1%), respectivamente. En las formulaciones utilizadas para la elaboración de las láminas comestibles se mantuvo fija la cantidad de agua y se varió el contenido de almidón y plastificante. Las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua de las láminas fueron evaluadas. Se encontró que la combinación de 1%:1% de ácido cítrico y bisulfito de sodio fue la más efectiva para inactivar las enzimas en los tubérculos. Los almidones presentaron formas: esféricas, esférica-truncadas, elípticas y piramidales. El hilio se desarrolló de forma concéntrica en el almidón de yautía, yuca y batata, y de forma excéntrica en el almidón de ñame. El tamaño promedio de los gránulos se encuentra entre $9\mu\text{m}$ y $24\mu\text{m}$, presentando el mayor tamaño en el almidón de ñame. Los estudios de calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostraron un pico endotérmico correspondiente a la gelatinización con un rango de T_{max} de 65-80°C. El almidón de yuca presentó una blancura total mayor con un valor de $IB = 96.01$ y un valor de $IA = 1.97$. En términos de composición química, el contenido de proteína, cenizas, grasas y fibra fue bajo, indicando un grado de pureza alto en los almidones obtenidos. El contenido de amilosa fue similar en ñame y yuca, de igual manera para batata y yautía teniendo estos últimos los valores más altos. Se observó que a medida que aumenta el plastificante disminuye la fuerza tensil y el porcentaje de elongación aumenta. La permeancia disminuye cuando aumenta la cantidad de almidón. Después de comparar las laminas obtenidas de las diferentes formulaciones en termino de las propiedades evaluadas se seleccionó la que estaba compuesta

por 4g de almidón de yuca y 20% de glicerol (w/w) de materia seca para adicionarles bacteriófagos. Los bacteriófagos usados en esta investigación tenían especificidad para la bacteria *Staphylococcus aureus* con un ciclo lítico de infección. Se adicionó el bacteriófago en las siguientes cantidades; 0, 10^3 y 10^7 UFP/mL. La propiedad antimicrobiana de las láminas fue evaluada por el método de difusión en agar, encontrándose que hubo un efecto inhibitor con ausencia de la formación de un halo de inhibición alrededor de las láminas comestibles. Estos resultados sugieren que el fago no tiene movilidad en la lámina ni en el agar.

ABSTRACT

Root crops in Puerto Rico do not satisfy the local demand and often cannot compete with imported product in terms of price. A novel way to add value to these tubers roots is their processing for starch production, which has many applications in the food industry such as stabilizer, in coating and edible film. The purpose of this research is to study the production of starch for the elaboration of antimicrobial edible films. Starch extraction from yams, taro, cassava and sweet potato was achieved through wet milling using a chemical treatment for the enzyme deactivation in the tubers. Citric acid and potassium bisulfite solutions were used for enzyme deactivation in the following proportions (1%:0%, 1%:0.25%, 1%:0.50%, 1%:1%), respectively. The starch characterization was based on the color, size and shape of the granule, gelatinization temperature and proximal analysis. It was observed that the 1%:1% citric acid and sodium bisulfite combination was most effective to inactivate enzymes in tubers. Cassava starch presented a higher total whiteness with a value of WI = 96.01 and a value of YI = 1.97. Average granule size was between 9-24 μ m. Granules showed different shapes; spherical, spherical- truncated, elliptic and pyramidal depending on their source. Differential scanning calorimetry (DSC) studies showed an endothermic peak corresponding to gelatinization with a range of T_{max} of 65-80 ° C. In terms of chemical composition of protein, ash, fat and fiber content were low, indicating high purity of the starch. Amylose content was similar in yam and cassava, likewise for sweet potato and taro; the latter having the highest values. It was observed that with increasing concentration of plasticizer tensile strength decrease and the elongation percentage increases. It was also observed that the permeance decreases when increasing the amount of starch. After comparing the edible films obtained from the different formulations in terms of the evaluated properties was selected that was composed of cassava starch 4g and 20% glycerol (w / w) dry matter to add bacteriophages. Bacteriophages used in this study were specific for the bacteria *S. aureus* with lytic cycle of infection. Bacteriophages were added in the following amounts: 0, 10^3 and 10^7 PFU / mL. The antimicrobial property of the films was evaluated by the agar diffusion method; it was observed an inhibitory effect without an inhibition zone formation around the edible films. These results suggest that the phage has no mobility in the film or in the agar.

DEDICATORIA

A Dios

Porque siempre caminas junto a mí y me acompañas en cada etapa de mi existencia cuidándome, amándome y aceptándome; por alimentar y sanar mi corazón trayendo paz a mi vida.

A mi mamá Nydia

Por traerme al mundo, cuidarme y amarme, y no desampararme cuando las cosas estuvieron difíciles. Por tu ayuda incondicional en mi desarrollo como madre a temprana edad. Te debo la persona que hoy día soy y el espíritu de lucha incansable que hay dentro de mí y no morirá jamás.

A mi esposo Antonio

Por su amor y motivación constante además de su paciencia y dedicación, por ser mi soporte y compañía durante todo este tiempo, al fin hemos terminado este paso.

A mis hijos Tanaydí y Nyathan

Porque son la inocencia en mi vida y la energía que impulsa mi deseo de superación, pero sobre todo por sus besos, sonrisas y amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis pudo ser desarrollado y finalizado por la colaboración y apoyo de muchas personas a las cuales quiero agradecer:

A Dios por bendecirme desde antes de nacer regalándome una madre sin igual y cinco hermanos para disfrutar y vivir la vida. En adición pone a Antonio en mi camino para que me ame y me haga compañía, y me regala dos hijos hermosos y saludables.

A mi familia y a mis suegros por su apoyo emocional y económico que hicieron posible mantenerme a flote durante el periodo de estudio. En especial a mis hermanas Yomary y Loany, y a titi Martita. Sin ustedes no lo hubiese conseguido.

Al Dr. Fernando Pérez-Muñoz por aceptarme como su estudiante graduada y dirigir mi proyecto de tesis. Le estoy muy agradecida por su respeto y confianza, por su aporte intelectual, por su ayuda incondicional para realizar este trabajo, por sus sabios consejos y su amistad. Su persona ha impactado positivamente mi formación como profesional dentro y fuera de las aulas de clase, y me ha enseñado con sus acciones a ser humilde.

A mis profesores por contribuir en mi formación como profesional en esta etapa universitaria. Al Dr. Carlos Ríos-Velázquez y la Dra. María Aponte-Huertas por su colaboración, asesoría y tiempo dedicado a la corrección de este documento.

Al Sr. Luis Ayala por siempre tener un lugar para mí en la sala de preparación de materiales, fue mi primer trabajo como estudiante graduada y ha sido el mejor. Gracias infinitas por la prestación de sales y otros materiales para este trabajo. De igual manera quiero agradecer a la Dra. Negrón por permitirme trabajar como ayudante de catedra en el programa graduado de CITA y por la prestación de sus potes especiales que sin ellos no hubiese podido avanzar a la etapa final de este proyecto. Doctora gracias por toda su ayuda y consideración.

A los agrónomos Agenol González y Manuel Díaz por su apoyo y colaboración supliendo la materia prima para esta investigación.

A Luis Ramírez por hacerme compañía en las noches durante mi segunda etapa de investigación en el laboratorio. A Lurdes Siberio y Yaritza Ramos por las experiencias compartidas. A mis compañeros de clases en especial a Luis Enrique Ruiz-Meneses por su amistad, por nuestras diferencias que nos permitían no aburrirnos desde el momento en que nos conocimos.

A mis amigas Aimeé Montero, Minerva Rivera, Norleyn Navas y Cecil Torres, saben que las considero como aquellas hermanas que Dios me permitió elegir. Les agradezco por su cariño, porque me alegran la vida, por sus consejos y ayuda en los momentos difíciles, y por la tranquilidad que siento de saber que estoy rodeada de buenas personas en las que puedo confiar y buscar apoyo. Las quiero de todo corazón. Gracias por quererme y preocuparse por mí.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	III
ABSTRACT	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTOS	VII
TABLA DE CONTENIDO	IX
LISTA DE CUADROS	XI
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ECUACIONES	XII
LISTA DE GRÁFICAS	XIII
LISTA DE APÉNDICES	XIII
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 LÁMINAS COMESTIBLES	3
2.2 DESCRIPCIÓN DE LA MOLÉCULA DE ALMIDÓN	6
2.3 PROCESO DE GELATINIZACIÓN DEL ALMIDÓN	8
2.4 FARINÁCEOS CULTIVADOS LOCALMENTE EN PUERTO RICO	11
2.5 AGENTES ANTIMICROBIANOS NATURALES	15
2.6 BACTERIÓFAGOS.....	18
III. MATERIALES Y MÉTODO	22
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL	22
3.2 MATERIA PRIMA	26
3.3 EXTRACCIÓN DEL ALMIDÓN.....	29
3.4 CARACTERIZACIÓN DEL ALMIDÓN	31
3.5 ELABORACIÓN DE LA LÁMINA COMESTIBLE	33
3.6 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES DE LA LÁMINA COMESTIBLE	33
3.7 ADICIÓN DE BACTERIÓFAGO	37

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1 DESACTIVACIÓN ENZIMÁTICA.....	43
4.2 CARACTERIZACIÓN DE ALMIDÓN	45
4.3 EVALUACIÓN DE LAS PROPIEDADES MECÁNICAS (FUERZA TENSIL Y ELONGACIÓN) Y DE PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA.	55
4.4 EVALUACIÓN DE LA PROPIEDAD ANTIMICROBIANA.....	63
V. CONCLUSIONES	72
VI. RECOMENDACIONES	723
VII. REFERENCIAS	75

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1- Funciones potenciales de láminas comestibles y recubrimientos	4
Cuadro 2- Tratamientos posibles de la combinación de los diferentes factores	25

LISTA DE TABLAS

Tabla 1- Usos del almidón en la elaboración de productos no alimenticios	7
Tabla 2- Farináceos cosechados para la venta en los años 2007 y 2002.....	14
Tabla 3- Informe económico de la empresa según la división de estadísticas del Departamento de Agricultura.	14
Tabla 4-Agrupación de compuestos antimicrobiales naturales en base a su origen de procedencia.	17
Tabla 5- Resultados para la prueba de peroxidasa realizada en pulpa de farináceos.....	43
Tabla 6- Resumen de los datos obtenidos de las propiedades físicas de almidones.	51
Tabla 7- Resumen de la composición química de almidones.	54
Tabla 8- Composición química de almidón de tubérculos reportados en la literatura.	55
Tabla 9- Prueba de Tukey para permeanza; interacción fuente de almidón-cantidad de almidón.....	57
Tabla 10- Prueba de Tukey para fuerza tensil; interacción cantidad almidón-concentración glicerol	59
Tabla 11- Prueba de Tukey para efecto de cantidad de almidón y concentración de glicerol	61
Tabla 12- Prueba de Tukey para el efecto de concentración de glicerol en la permeanza.....	62
Tabla 13- Absorbancia y número de microorganismos presentes en un tiempo dado.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diferentes morfologías de bacteriófagos. Adaptado de Abedon S.T. (2000).....	19
Figura 2- Bacteriófago K estafilococal; a) antes de inyectar el material genético (cápsido isométrico et ala contráctil) y b) después de inyectar el material genético (cápsido vacío et ala contraída). Adaptado de O’Flaherty S et al. (2005)	20

Figura 3- Flujograma de proceso	23
Figura 4- Ñame variedad guinea blanco	26
Figura 5- Yautía variedad estela	27
Figura 6- Yuca variedad serrallés	27
Figura 7- Batata selección 98-040	28
Figura 8: Representación esquemática para; a) arreglo para el método vía desecante y b) arreglo para el método vía húmeda.	35
Figura 9- Equipo usado para la prueba de permeabilidad al vapor de agua.....	36
Figura 10- Micrografías de almidón de yautía: (a) microscopía a contraste interferencial diferencial “Normasky” y (b) microscopía en luz polarizada.	46
Figura 11- Micrografías de almidón de ñame: (a) microscopía a contraste interferencial diferencial “Normasky” y (b) microscopía en luz polarizada.	48
Figura 12- Micrografías de almidón de yuca: (a) microscopía a contraste interferencial diferencial “Normasky” y (b) microscopía en luz polarizada.	49
Figura 13- Micrografías de almidón de batata: (a) microscopía a contraste interferencial diferencial “Normasky” y (b) microscopía en luz polarizada.	50
Figura 14- Espacio de color	52
Figura 15- Crecimiento de <i>S. aureus</i> en “Mannitol Salt Agar” (a); Observación microscópica de <i>S. aureus</i> después de realizar una tinción de Gram (b).	65
Figura 16- Evaluación de la propiedad antimicrobial: (a) platos preparados con las muestras antes de incubar y (b) platos preparados con las muestras después de incubar.	69
Figura 17- Ensayo antimicrobial usando una concentración alta de 10^7 UFP/mL.....	71

LISTA DE ECUACIONES

Ecuación (1) % amilosa = (absorbancia-b)/m	32
Ecuación (2) $P = GL / A\Delta P$	36

Ecuación (3) $TS \text{ (MPa)} = \text{Peak load (N)} / \text{área inicial cros-seccional (m}^2\text{)}$	37
Ecuación (4) $E\% = (\text{Aumento en longitud al punto de quiebre (mm)} / \text{longitud original}) * 100$	37
Ecuación (5) $UFP = \# \text{ placas} \times \text{inverso factor de dilución}$	39
Ecuación (6) $mL_{\text{ cultivo iniciador}} = (OD_{\text{ deseado}} / OD_{\text{ real}}) \times mL_{\text{ medio sin inocular}}$	39
Ecuación (7) $MOI = N^{\circ} \text{ fagos} / N^{\circ} \text{ células}$	40
Ecuación (8) $IP = 100 - L^*$	52
Ecuación (9) $IB = 100 - ((100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$	52
Ecuación (10) $IA = 142.86 * (b^*/L^*)$	52

LISTA DE GRÁFICAS

Gráfica 1- Curva de crecimiento de S. aureus en “Tryptic soy broth”	66
---	----

LISTA DE APÉNDICES

APÉNDICE 1- ANÁLISIS ESTADÍSTICO	85
APÉNDICE 2- MÉTODO DE KIRBY-BAUER	91
APÉNDICE 3- MEDIO DE CULTIVO “MANNITOL SALT AGAR” Y PLACAS DE LISIS DEL BACTERIÓFAGO 52	92

I. INTRODUCCIÓN

Prácticamente todos los productos alimentarios deben ser encerrados en un empaque que los proteja del ambiente exterior. El empaque es la entidad física definida en un recipiente o envoltura que contiene productos temporalmente y sirve primordialmente para agrupar unidades de un producto, pensando en su manipulación, transporte y almacenaje. Otras funciones del empaque son proteger el contenido de un entorno hostil en cuanto al vapor de agua, aire, oxígeno, microorganismos, insectos, suciedad y robo. También, sirve como medio de comunicación entre el consumidor y el fabricante; debido a que informa sobre las condiciones de manejo del alimento, requisitos legales, composición e ingredientes, el precio y las instrucciones de uso. Además el empaque ayuda a vender el producto, promocionándolo por medio de grafismos.

A pesar de la importancia y utilidad del empaque, un aspecto del mismo que aún causa estragos, es la basura que genera. Los empaques duran más allá del cese de su utilidad afectando el mundo que nos rodea. Aproximadamente el 60% de los empaques se usan en alimentos y bebidas. Estos pasan a formar parte de los residuos sólidos generados en cualquier país. A nivel mundial el disponer de la masa creciente de los residuos que se generan es un problema cada vez más importante y grave. En Puerto Rico la situación del manejo de desperdicios sólidos, se ha complicado al nivel de ser el segundo problema ambiental más urgente después de la contaminación de las aguas. El país genera alrededor de 3.6 millones de toneladas de residuos sólidos anuales ó 9,860 toneladas diarias. La producción por persona es cerca de 5.18 libras (ó 3.91 libras por persona, si se excluyen los materiales de construcción y otros desechos de gran volumen como la chatarra), una de las cifras más altas del mundo (Bibiloni-Padin, 2009).

Sepultar los residuos sólidos ha sido, y actualmente es la práctica más utilizada por las sociedades del mundo para su manejo (Giraldo, 2001). Los vertederos y rellenos sanitarios son cada vez más escasos y plantean una serie de desventajas y problemas. También hay que considerar que uno de los materiales de empaque más ampliamente utilizado en la industria del embalaje es el plástico (Arvanitoyannis & Gorris, 1999). Éste proviene del petróleo, una fuente no renovable cada vez más escasa y costosa.

Por lo anterior, es necesario buscar alternativas para conservar los alimentos con materiales de empaque que no pierdan sus características de funcionalidad pero que sean fácilmente degradables. El uso de biopolímeros provenientes de cultivos agrícolas para el desarrollo de láminas comestibles o biodegradables puede ser una alternativa; debido a su naturaleza amigable con el ambiente, proceden de fuentes renovables y se pueden aplicar a la industria alimentaria. Las láminas comestibles tradicionalmente se usaban para mejorar la apariencia de los alimentos y su conservación (Khwaldia et al., 2004). Los ejemplos más comunes son los recubrimientos de ceras en la superficie de frutas y vegetales, fundas de colágeno en la elaboración de embutidos y recubrimientos de polisacáridos en dulces tales como los chocolates M&M (Druchta & De Mulder, 1997).

Las láminas comestibles tienen el potencial de reducir los desperdicios generados por el empaque al reducir la fuente de procedencia. En la medida que la lámina pueda actuar como barrera eficiente a la humedad, oxígeno y aromas, la cantidad de empaque puede ser reducido y el reciclaje del empaque puede ser mejorado (Khwaldia et al., 2004). Los materiales empleados en la elaboración de láminas comestibles pueden ser divididos en 4 categorías: biopolímeros hidrocóloides (polisacáridos y proteínas), lípidos, resinas y mezclas (Hernández & Krochta, 2008).

Dentro de los polisacáridos, el almidón es el más ampliamente usado en la elaboración de láminas comestibles por su bajo costo y abundancia en la naturaleza (Tapia et al., 2007). En Puerto Rico hay actualmente cultivos de alimentos que sirven como fuente de almidón dentro de los cuales se puede mencionar los cultivos de plátano, guineo, ñame, yuca, malanga, batata, yautía y apio. La presente investigación propone evaluar el uso de fuentes no convencionales de almidón en la formulación de láminas comestibles con la subsecuente incorporación de bacteriófagos como agentes antimicrobianos. Las investigaciones realizadas en láminas comestibles antimicrobianas con agentes naturales, que controlen y prevengan el crecimiento microbiano, hasta la fecha, no incluyen trabajos realizados con bacteriófagos.

El objetivo general de la presente investigación es formular una lámina comestible antimicrobial a base de almidón de farináceos. Los objetivos secundarios incluyen:

1. Caracterizar el almidón en base a su proporción de amilosa/amilopectina, tamaño y forma de gránulo.
2. Establecer las mejores condiciones de temperatura de procesamiento, fuente de almidón y agente plastificante en el desarrollo de la lámina.
3. Evaluar las propiedades de barrera al vapor de agua y mecánicas de la lámina.
4. Determinar la posibilidad de utilizar bacteriófagos en calidad de biocidas naturales contra *S. aureus* mediante su incorporación en la matriz de una lámina comestible.

Esta investigación aporta a la comunidad científica las posibilidades de explorar la utilización de bacteriófagos en calidad de biocidas naturales y el empleo de fuentes no convencionales de almidón en el desarrollo de láminas comestibles. La aplicación de este concepto representa para Puerto Rico el fomento de la agricultura del país, un aprovechamiento en los residuos no mercadeables de farináceos, además de la posibilidad de reducir la generación de residuos sólidos en el sistema de embalaje así como también la introducción de los cultivos de farináceos en el mercado del almidón.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Láminas comestibles

En los últimos años la evaluación de materias primas obtenidas a partir de recursos naturales y renovables para ser empleadas en el desarrollo, la caracterización y las posibles aplicaciones de una lámina comestible como material de empaque ha sido y es el objeto de estudio de muchos investigadores e industrias. Según Krochta y Hernández (2008), una lámina comestible puede ser definida como una capa delgada de material comestible, la cual puede ser formada en un alimento como un recubrimiento o pre-formada como una lámina que puede ser colocada entre los componentes de un alimento, usada como una envoltura de alimentos o formada en una bolsa para contener un alimento. El objetivo de aplicar una

lámina comestible formada en cualquiera de las opciones antes mencionadas es mejorar la calidad del alimento, extender su largo de vida útil y mejorar la estabilidad durante el almacenamiento, mientras reduce el desperdicio del empaque. Esto se logra, en la medida que la lámina sea capaz de actuar como barrera inhibiendo la migración de sustancias (agua, gases, lípidos y aromas) y pueda transportar ingredientes (antioxidantes, antimicrobianos y sabores) además de proveer protección mecánica mejorando las características de manejo del alimento (Krochta et al., 1997; Khawaldia et al., 2004; Peressini et al., 2004). Las propiedades funcionales de las láminas comestibles dependen de ciertos parámetros tales como la formulación, la tecnología utilizada para formar la lámina, las características del solvente y los aditivos. En el Cuadro 1 se resumen las funciones potenciales para las cuales una lámina comestible o recubrimiento pueden emplearse en un alimento. Cabe señalar que al momento de seleccionar una lámina comestible para la aplicación de mejorar la calidad o resolver un problema específico en un alimento, hay que evaluar las propiedades físicas y funcionales de la lámina, así como la composición del alimento.

Cuadro 1- Funciones potenciales de láminas comestibles y recubrimientos en alimentos. Tomado de Conca, K.R. (2002). Protein-based film and coating for military packaging application.

Retardar:	Migración de humedad Transporte de gases (oxígeno y bióxido de carbono) Transporte de aceites y grasa Transporte de solutos
Mejorar:	Propiedades mecánicas de manejo en los alimentos Apariencia (imparten brillo en la superficie del alimento)
Adicionar:	Integridad estructural
Retener:	Los compuestos de color y sabor volátiles
Incorporar:	Aditivos e ingredientes
Formar:	Láminas cohesivas y continuas

Los materiales empleados como base en la formulación de una lámina comestible pueden ser agrupados en cuatro categorías (Hernández & Krochta, 2008): biopolímeros hidrocóloides (polisacáridos y proteínas), lípidos, resinas y mezclas de biopolímeros. Estos componentes principales son reconocidos como sustancias seguras (GRAS). Las láminas comestibles a base de polisacáridos incluyen celulosa, almidón y sus derivados (Arvanitoyannis & Gorris, 1999), chitosan (Mayachiew & Devahastin, 2008), gomas (Aydinly et al., 2004), pectina (Maftoonazad et al., 2007) y agar (Ku et al., 2008). Las láminas comestibles elaboradas a partir de proteínas incluyen colágeno y gluten (Arvanitoyannis & Gorris, 1999), gelatina (Zhang et al., 2007), soya (Solimán et al., 2007), proteínas de la leche (Pérez & Krochta, 2002; Khwaldia et al., 2004; Oh et al., 2004) y proteínas de pescado (Iwata et al., 2000; Tanaka et al., 2001). Dentro de las sustancias hidrofóbicas (lípidos y resinas) con potencial uso en la elaboración de láminas comestibles se pueden mencionar aceites y grasas de origen vegetal y animal como el aceite de palma y la manteca de cerdo además de la resina natural guaraná (Morillon et al., 2002).

Recientemente se ha intentado desarrollar láminas comestibles a partir de mezclas de polímeros naturales combinando las propiedades de varios biopolímeros, para mejorar la efectividad de las láminas para una aplicación en particular. El almidón ha sido mezclado con lípidos y alginato (Wu et al., 2001; Wu et al., 2003; García et al., 2000), chitosan (Xu et al., 2005), celulosa (Kim et al., 2002; Peressini et al., 2004) y proteínas, para desarrollar láminas comestibles con mejores propiedades de barrera al vapor de agua. Los purés y concentrados de frutas y vegetales han sido recientemente estudiados como materiales comestibles formadores de láminas (Azeredo et al., 2009; Mchugh & Senesi, 2000; Du et al., 2008). Tal aplicación se debe a la presencia de polisacáridos en su composición tales como la pectina, almidón y derivados de celulosa. Los purés entonces pueden combinar las propiedades de barrera y mecánicas de los componentes formando la lámina, con el color y el sabor provisto por los pigmentos y compuestos volátiles de la fruta (Azeredo et al., 2009). Más aún la producción de láminas es una manera interesante y prometedora de usar los co-productos del procesamiento de frutas. También el empleo de harinas para la elaboración de láminas ha sido estudiado (Tapia et al., 2007), las cuales son una mezcla compleja de almidón, proteínas y lípidos, que exhiben propiedades mecánicas y de barrera interesantes; debido a las

interacciones naturales que ocurren entre los componentes de la harina durante el proceso de secado de la solución filogenética.

2.2 Descripción de la molécula de almidón

El desarrollo y producción de láminas comestibles a partir de biopolímeros, en la industria alimentaria, en las últimas décadas ha sido con énfasis en la reducción del empaque plástico. Dentro de los biopolímeros empleados en la formulación de láminas comestibles antes mencionados, el almidón es el más ampliamente usado por su bajo costo, abundancia en la naturaleza y fácil manejo. Dentro de los carbohidratos comestibles el almidón ocupa una posición única. Representa cerca del 70-80% de la ingesta calórica mundial, se utiliza como alimento animal en la fabricación de piensos y es una importante materia prima para la industria (Hernández et al., 2008; Bernal & Martínez, 2006). Alrededor de 60 millones de toneladas son extraídas anualmente en el mundo a partir de cereales, tubérculos y raíces, de las cuales el 60% son destinadas a la industria alimentaria y el 40% es usado para fines farmacéuticos y productos no comestibles como papel, material de empaque, bioplásticos, textiles y adhesivos (Copeland et al., 2009). En la Tabla 1 se presenta un resumen de los usos del almidón en la elaboración de productos no alimenticios. La importancia del almidón en la industria de alimentos consiste en que constituye una excelente materia prima para modificar la textura y consistencia de los alimentos. Además el almidón en su forma nativa o modificado, es empleado en la manufactura de recubrimientos y láminas comestibles (Vicentini et al., 2005). Otras aplicaciones del almidón en los alimentos incluyen su uso como agente estabilizante, gelificante y espumante así como para ayudar en la retención de humedad e impartir brillo en los alimentos (Fennema, 2008).

Tabla 1- Usos del almidón en la elaboración de productos no alimenticios

Industria	Artículo
Adhesivos	Gomas de cola de fusión, estampillas, sobres y etiquetas
Explosivos	Adhesivos para cabeza de los fósforos
Papel	Recubrimientos de papel y pañales desechables
Construcción	Aglutinante para tabiques de concreto y adhesivo para madera laminada
Metal	Adhesivo de metal poroso y aglutinantes para núcleos de fundición
Cosméticos	Maquillajes y cremas faciales
Farmacéutica	Revestimiento de cápsulas y agentes dispersantes

Las plantas sintetizan el almidón como material de reserva de energía, el cual es acumulado en los órganos de almacenamiento dentro de los cuales se pueden mencionar los tubérculos, las raíces y los embriones. La biosíntesis del almidón es un proceso complejo. La sacarosa, un derivado del proceso de fotosíntesis, es el punto de partida para la deposición de alfa-glucanos en la formación de la estructura del almidón (Tester et al., 2004). El almidón es depositado en las plantas en forma de gránulos que son relativamente densos, insolubles en agua fría y el tamaño del gránulo oscila entre 1 a 100µm dependiendo de la especie de la planta. La forma puede ser esférica, poligonal o lenticular, y varía grandemente con el contenido, estructura y organización de las moléculas de amilosa y amilopectina (Copeland et al., 2009). Su estructura granular se debe a que las cadenas de glucosa están espesamente empaquetadas, interaccionando entre sí a través de puentes de hidrógenos que le permiten mantener dicha estructura.

Químicamente el almidón es un carbohidrato polimérico constituido por unidades de amilosa y amilopectina. Generalmente el almidón contiene 20% de amilosa y 80% de amilopectina. Ambas fracciones parecen corresponder a dos polisacáridos diferentes, de peso molecular elevado y fórmula molecular $(C_6H_{10}O_5)_n$. La amilosa es un polisacárido lineal constituido por residuos de D-glucopiranosas unidos a través de enlaces glucosídicos α -D-(1,4), siendo la maltosa la unidad repetitiva de esta estructura química. La amilopectina es también un polisacárido constituido por residuos de D-glucopiranosas, que se

diferencia de la amilosa por la presencia de ramificaciones y la forma molecular similar a un árbol en las que las ramas están unidas al tronco central por enlaces α -D- (1,6).

El almidón puede ser clasificado en tres categorías en base a su proporción de amilosa y amilopectina, la cual varía dependiendo del origen botánico del almidón (Tester et al., 2004): 1) almidón “waxy” contiene menos de 15% de amilosa, 2) almidón normal contiene entre 20 a 35% de amilosa y 3) almidón de alta amilosa contiene tanto o más de un 40% de amilosa. Es de conocimiento que los almidones clasificados bajo la tercera categoría cuando se emplean en la preparación de láminas comestibles, resultan en láminas más flexibles y fuertes (Liu & Han, 2005).

2.3 Proceso de gelatinización del almidón

Un fenómeno importante que presenta el almidón es la gelatinización. Al mezclar granos de almidón con agua, se produce una dispersión ya que no es soluble, aunque los granos son capaces de absorber agua. Este fenómeno aumenta con la temperatura y es un proceso irreversible. La gelatinización del almidón es considerablemente influenciada por la temperatura y el contenido de agua, pero no son los únicos parámetros que ejercen un efecto sobre ésta. Además, la gelatinización del almidón puede realizarse en frío utilizando, por ejemplo, hidróxido de potasio (Abdel et al., 2008).

A una determinada temperatura la gelatinización ocurre porque se aplica suficiente energía para romper los enlaces de hidrógeno intermoleculares que se encuentran en el área cristalina del gránulo, compuesta principalmente por amilopectina. Durante este proceso los gránulos de almidón absorben agua, alcanzado su capacidad máxima de hinchamiento y entonces se rompen perdiendo su integridad e identidad, exudando su fase de gel (amilosa).

Cada almidón tiene un punto de gelatinización diferente el cual se reporta como un intervalo de temperatura, debido a que no todos los gránulos se hinchan y gelatinizan al mismo tiempo y temperatura. El cambio más aparente que ocurre durante la gelatinización del almidón es el aumento en viscosidad de las suspensiones de este polímero. El primer cambio en la viscosidad ocurre cuando los gránulos de almidón se hinchan al absorber una gran cantidad de agua dando lugar a la formación de una pasta. A

medida que continúa este proceso explicado previamente, el gránulo se rompe y aparecen moléculas de amilosa y amilopectina hidratadas libremente en la suspensión ocasionando una reducción en la viscosidad de la pasta hasta alcanzar un cierto valor en el que se estabiliza.

El concepto de gelificación está estrechamente relacionado con el proceso de gelatinización. La gelificación es la formación de un gel y no se produce hasta que se enfría una pasta de almidón. No obstante el proceso de gelatinización debe preceder al de gelificación. Durante el enfriamiento de una pasta de almidón se forman enlaces intermoleculares entre las moléculas de amilosa y se forma una red donde queda el agua atrapada. Los geles formados se hacen progresivamente más fuertes durante las primeras horas de preparación, pero a medida que progresa el tiempo el gel tiende a envejecer debido a la retrogradación del almidón, perdiendo su fortaleza y permitiendo la salida de agua del gel (sinéresis).

La retrogradación puede ser definida como el proceso en el cual los constituyentes principales del almidón gelatinizado comienzan a asociarse para formar una estructura ordenada (Sandhu & Singh, 2007). Después de la gelatinización, durante el secado de las láminas, las cadenas de amilosa tienen una tendencia a orientarse unas con otras de forma paralela y aproximándose lo suficientemente cerca para permitir enlaces de hidrógeno entre los grupos hidroxilos de sus moléculas, para formar una estructura altamente ordenada (Vicentini et al., 2005). Mientras, la recristalización de la amilopectina ocurre por la re asociación de sus ramificaciones (Sandhu & Singh, 2007).

El paso principal en la producción de una lámina comestible a base de almidón, es el tratamiento térmico de la suspensión de almidón. Se han realizado estudios para relacionar las condiciones de gelatinización y las propiedades mecánicas y físicas de láminas comestibles a base de almidón. En el 2008, Paes y colaboradores estudiaron el efecto de las condiciones de gelatinización en la estructura y propiedades mecánicas de láminas comestibles a base de almidón de yuca. El estudio reflejó que cuando se realiza el proceso de gelatinización a diferentes temperaturas, con baja y alta velocidad de corte, la estructura de las láminas se afecta significativamente. El empleo de geles preparadas con baja velocidad de corte y temperatura $<100^{\circ}\text{C}$, produce láminas con remanentes de gránulos de almidón en su estructura resultando en una distribución más homogénea de amilosa-amilopectina y mejores propiedades

mecánicas. Además, se observó que al realizar el proceso de gelatinización usando temperaturas altas y velocidad de corte severa, se produjeron láminas que exhibían separación de fase en la estructura y pobres propiedades mecánicas.

Debido al fenómeno de retrogradación que experimentan los geles de almidón, las láminas comestibles a base de este biopolímero son rígidas y presentan pobres propiedades mecánicas, particularmente pobre elongación bajo condiciones ambientales y la incorporación de un agente plastificante es necesaria para vencer la fragilidad inherente a este material (Mali et al., 2008). Los plastificantes como glicerol, sorbitol, poli (glicol de etileno), aumentan la flexibilidad de las películas debido a su capacidad para reducir los enlaces de hidrógeno internos entre las cadenas de los polímeros mientras aumenta el espacio molecular (Zamudio et al., 2007). Los plastificantes más usados en las láminas de almidón son el sorbitol y el glicerol. Las películas de almidón se usan principalmente para disminuir el intercambio gaseoso entre el medio ambiente y el alimento, más que retardar la pérdida de humedad debido a su baja resistencia a la transmisión de vapor de agua. El carácter hidrofílico de los polisacáridos que constituyen el gránulo de almidón en similitud a las proteínas, y la presencia del glicerol (un plastificante hidrofílico) favorece la absorción de moléculas de agua (Yoshida et al., 2002). Aunque el plastificante mejora la flexibilidad de la lámina, lo cual puede prevenir el quiebre de la misma durante su preparación, manejo y almacenamiento, aumenta la permeabilidad al vapor de agua. Es necesario entonces establecer la cantidad y tipo de plastificante a utilizar en la formulación de una lámina comestible, de manera que se mejore su fortaleza y elongación sin aumentar significativamente su permeabilidad al vapor de agua.

Bozdemir y Tutas (2003) estudiaron el efecto de la concentración y el tipo de plastificante en las propiedades de vapor de agua de láminas comestibles a base de goma. Los plastificantes utilizados fueron glicerol, sorbitol, poli (glicol de etileno) y glicol de propileno. Además, las láminas fueron modificadas con la adición de materiales hidrofóbicos (“beewax” y “stearopten”). Ellos observaron que para obtener láminas más estables y de estructura íntegra debían utilizar poli (glicol de etileno) en su formulación y modificarlas con “beewax” o “stearopten” para reducir los valores de transmisión al vapor de agua a

niveles de otras láminas a base de proteínas y polisacáridos. Sin la modificación con materiales hidrofóbicos las láminas plastificadas con sorbitol presentaron valores menores de permeabilidad al vapor de agua en comparación con aquellas que fueron plastificadas con glicerol, poli (glicol de etileno) o glicol de propileno.

Zhang y Han (2006) estudiaron la plastificación en láminas a base de almidón con monosacáridos (glucosa, fructosa, manosa y galactosa) y polioles (sorbitol, maltitol, glicol de etileno y glicerol). Sus observaciones y conclusiones fueron basadas en términos del mecanismo de plastificación. Ellos observaron de manera general, que las láminas plastificadas con monosacáridos poseen mejores propiedades de barrera al vapor de agua que aquellas plastificadas con polioles. Además, las láminas plastificadas con monosacáridos presentaron características comparables en términos de fuerza ténsil, módulo elástico, elongación y transparencia con las láminas en las que se utilizaron polioles como plastificantes. A partir de sus observaciones, estos investigadores sugieren lo siguiente en relación a los plastificantes en las láminas de almidón:

1. Los plastificantes deben ser distribuidos en la matriz de la lámina de manera uniforme con las moléculas de almidón et alocarse entre los polímeros de almidón.
2. Para que la distribución sea uniforme, el plastificante debe presentar cierto grado de interacción con los polímeros del almidón para prevenir la separación de fase y recristalización del plastificante.
3. El plastificante debe ser capaz de crear un nivel de volumen libre entre los polímeros del almidón, lo cual está relacionado al tamaño molecular del plastificante.
4. El plastificante debe mantener una cantidad definida de agua, para ayudar a las moléculas de agua a actuar como plastificante.

2.4 Farináceos cultivados localmente en Puerto Rico

En la categoría de los farináceos se pueden agrupar aquellos productos cuya parte comestible contiene aproximadamente 20% de almidón. En Puerto Rico el sector de farináceos está constituido por la

empresa bananera (plátanos y guineos) y la empresa de raíces y tubérculos. La empresa de raíces y tubérculos está constituida a su vez de los siguientes cultivos: ñame, yautía, batata, malanga, apio y yuca.

Empresa bananera

El término banana se utiliza generalmente para referirse a un número de especies e híbridos del género *Musa* dentro de la familia Musaceae (Zang, 2005). Casi todas las cultivares de la fruta comestible conocidas derivan de dos especies diploides, *Musa acuminata* y *Musa balbisiana* (Zang, 2005). Para la comparación experimental de láminas comestibles a partir de almidón de faricenáceos, se utilizará el almidón de plátano. A nivel mundial el cultivo de plátano se ubica en el cuarto lugar en la categoría de productos alimenticios de gran demanda después del arroz, el trigo y la leche (Hoyos et al., 2008). Los plátanos son plantas herbáceas, que constan de un rizoma (tallo subterráneo), del cual brota un pseudo tallo aéreo, en cuyo interior crece el verdadero tallo. Poseen diferentes usos entre los cuales destacan el uso medicinal, la producción de alcohol y como fuente de fibra para elaboración de hamacas y cuerdas. El falso tronco sirve de alimento para el ganado y como materia prima en la industria papelera. Las hojas pueden tener varios usos caseros dentro de los cuales se puede mencionar su uso como envolturas de pasteles y guanimes aunque se prefiere la hoja de guineo para estos fines por ser más flexible.

Actualmente la producción de plátanos y guineos, entre las cosechas de Puerto Rico, ocupa uno de los principales renglones económicos de la agricultura puertorriqueña además de ser uno de los cultivos con mayor cuerdaje y de mayor distribución geográfica en la isla (Resolución del Senado 599, 2009). Estos tienen varias ventajas como cosecha, tanto en los trópicos como en subtrópicos, debido a que se adaptan a un alto nivel de tecnología con un mínimo de mecanización. Como cultivo son atacados por una variedad de plagas, que de no ser manejadas adecuadamente podrían reducir significativamente su producción. Actualmente la sigatoka negra es la enfermedad de mayor impacto económico en los cultivos de banana.

Según el Censo de Agricultura de 2007, en la isla para el año 2002 existían unas 6,340 fincas con unas 26,582 cuerdas en producción de plátanos, obteniéndose una producción de 391.7 millones de

plátanos anuales. Cinco años más tarde, para el 2007 existían en la isla unas 4,569 fincas con unas 18,034 cuerdas en producción obteniéndose unos 249.9 millones de plátanos anuales. Esta producción de plátano es desarrollada por 2,595 productores de plátanos y esta empresa agrícola es la principal fuente de ingreso para 3,500 agricultores además de miles de empleados y obreros de campo, cientos de compañías de servicios, suministros y mercadeo que apoyan y respaldan a esta industria en la Isla (Resolución de la Cámara 2429, 2008). La producción de plátano y guineo está dispersa por casi todos los municipios de Puerto Rico desde los llanos costeros hasta la zona montañosa. Los mayores productores son los agricultores de Yabucoa, Maunabo, Corozal, San Lorenzo, Salinas, San Sebastián, Las Piedras, Utuado y Lares.

El plátano y el guineo entran en la clasificación de farináceos por su alto contenido de almidón y se catalogan como principales alimentos en la dieta de los puertorriqueños (Resolución del Senado 599, 2009). El uso en la elaboración de diferentes platos le permite a estos alimentos tener una demanda continua siendo los farináceos de mayor importancia económica en Puerto Rico. Según el Departamento de Agricultura de Puerto Rico, en el año fiscal 2005-2006 y 2006-2007 no fue necesaria la importación de plátanos para suplir la demanda local.

Empresa de raíces y tubérculos

Estos cultivos se caracterizan por ser voluminosos, percederos, se propagan vegetativamente y son hipógeos. Son esencialmente una fuente de carbohidratos o almidones. En los países tropicales son tan importantes como el trigo en los países templados. Esto implica que fácilmente puede sustituir el arroz o el trigo. Estos productos se consumen en grandes cantidades en los países tropicales y proveen gran parte de las calorías en la dieta de sus habitantes. En la pirámide alimenticia para Puerto Rico estos productos aparecen en la parte más ancha, acompañados de los cereales. Además de su aportación económica, nos permiten tener una dieta más variada a todos los puertorriqueños. Estos cultivos pueden ser producidos en todo el país, sin embargo, la zona central y la zona este se han caracterizado por tener las mayores aéreas sembradas.

Según el Censo de Agricultura de 2007 en la isla, para el año 2002 existían unas 703 fincas con unas 1,040 cuerdas en producción de malanga, obteniéndose una producción de 44,808 quintales de malanga anuales. Cinco años más tarde, para el 2007 existían en la isla unas 395 fincas con unas 435 cuerdas en producción obteniéndose unos 34,837 quintales de malanga anuales. Del material presentado en la Tabla 2 se puede obtener esta misma información para los cultivos de yuca, batata, ñame y yautía. En la Tabla 3, se muestra la producción obtenida de los cultivos de malanga, ñame, batata, yuca y yautía para cuatro años fiscales acompañada del valor de dicha producción.

Tabla 2- Farináceos cosechados para la venta en los años 2007 y 2002

Farináceo	Fincas		Cuerdas		Quintales	
	2007	2002	2007	2002	2007	2002
Malanga	395	703	435	1040	34, 837	44, 808
Yuca	243	318	204	258	11, 702	12, 011
Batata	438	220	299	645	23, 274	42, 778
Ñame	985	995	1, 283	1, 461	70, 191	69, 253
Yautía	464	785	463	734	20, 975	21, 910

Tabla 3- Informe económico de la empresa según la división de estadísticas del Departamento de Agricultura.

Farináceo	2003-2004		2004-2005		2006-2007		2007-2008	
	Cantidad (qq)	Valor (millones)						
Batata	66, 751	2.2	72, 241	2.5	10, 038	0.34	9, 542	0.43
Ñame	72, 175	3.0	55, 211	2.7	33, 762	1.57	36, 488	1.88
Malanga	49, 339	1.75	37, 470	1.06	6, 462	0.28	5, 924	0.27
Yautía	49, 550	2.3	50, 745	2.65	20, 957	0.99	20, 690	1.09
Yuca	12, 174	0.19	10, 056	0.23	9, 321	0.27	9, 718	0.36

Estos valores representan una disminución de lo producido hace cinco años. La disminución en la producción ha sido drástica y para poder suplir la demanda local, ha habido un aumento de las

importaciones de estos productos. La mayoría de estas importaciones provienen de Costa Rica y República Dominicana en donde el costo de mano de obra es mucho más barato que en Puerto Rico. A parte de este factor puede haber muchas otras razones que hayan ocasionado la reducción sustancial en la producción de estos cultivos.

Teniendo claro que estos cultivos pueden producirse localmente y que pueden impactar los hábitos alimentarios y la economía de Puerto Rico, es necesario tomar las medidas requeridas para fortalecer este sector de nuestra agricultura. Para que el sector de farináceos pueda crecer y expandirse debe dirigirse hacia la elaboración con el fin de añadirle más valor a la producción. El sector posee la fortaleza de contar con muy buena tecnología de producción desarrollada por la Estación Experimental Agrícola de la Universidad de Puerto Rico.

2.5 Agentes antimicrobianos naturales

Las frutas, los vegetales y, generalmente todos los alimentos son perecederos. Su descomposición es el resultado del ataque de microorganismos. Los procesos que toman lugar durante el deterioro de un producto alimenticio, resultando en la disminución de su calidad incluyen la pérdida de color, sabor o textura y la generación de sabores y olores desagradables (Arvanitoyannis & Gorris, 1999). Los alimentos presentan microorganismos en su superficie o en su interior. Estos microorganismos en base a su origen, pueden ser endógenos o exógenos; y en base a su relación con el consumidor, pueden ser agentes patógenos o alterantes (causan deterioro). En la mayoría, pero no en todos los alimentos sólidos y semisólidos, el crecimiento de microorganismos ocurre primeramente en la superficie. El crecimiento microbiano en los alimentos preparados o mixtos, puede ocurrir en cualquier parte de la masa. Los microorganismos causantes de deterioro pueden ser bacterias, hongos y levaduras; siendo los más importantes el grupo de las bacterias y los hongos. De todos los microorganismos presentes en un alimento sólo algunos son capaces de multiplicarse activamente sobre el alimento resultando seleccionados con el tiempo. Por consiguiente, la población heterogénea inicial presente en el alimento va

quedando reducida a poblaciones más homogéneas y, finalmente, a un solo tipo de microorganismo que logra colonizar todo el alimento desplazando a los demás.

Muchos de los sistemas de preservación, tales como tratamientos de calor y adición de preservativos químicos, entre otros, son usados para reducir el riesgo de brotes producidos a causa de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) así como reducir el deterioro de los alimentos por parte de los microorganismos (Olasupo et al., 2003). Sin embargo algunos de estos sistemas pueden tener efectos no deseados que están en contra de las demandas de la industria y del consumidor, quienes desean alimentos que mantengan su apariencia fresca y natural por más tiempo, libre de aditivos y con un sabor natural, mientras la seguridad microbiológica y la estabilidad en el producto son conservadas (Min & Oh, 2009; Olasupo et al., 2003).

La incorporación de un agente antimicrobial en la matriz de una lámina comestible tiene el potencial de retardar la degradación microbiana de los alimentos y reducir el riesgo de contaminación en la superficie del alimento con microorganismos patógenos (Yener et al., 2009). Recientemente, compuestos naturales tales como ácidos orgánicos, enzimas antimicrobianas, bacteriocinas, triclosan, extracto de semillas de uvas, extracto de té verde, EDTA, aceites esenciales, fungicidas, tocoferol y quitosán entre otros, con actividad antimicrobial, han sido aplicados a sistemas de empaques bio-activos como una alternativa a los agentes antimicrobianos sintéticos (Min & Oh, 2009; Hong et al., 2009; Du et al., 2008; Ku et al., 2008; Datta et al., 2008; Gadang et al., 2008; Theron & Lues, 2007; Maizura et al., 2007). Es evidente que existe una variedad de agentes antimicrobianos naturales y que su actividad y efectividad bactericida, bacteriostática y fungicida en la prevención del deterioro de los alimentos ha sido investigada. Tales compuestos pueden ser derivados de sistemas animales (lizosimas y lactoferina), productos derivados de plantas (fitoalexinas, hierbas y especias) y metabolitos microbianos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas) (Acero, 2006). En la Tabla 4 se agrupan algunos compuestos naturales con capacidad antimicrobiana en base a su origen de procedencia. Como se mencionó anteriormente, los preservativos (compuestos antimicrobianos) en alimentos se usan para controlar el crecimiento microbiano; algunos tienen un alto grado de especificidad contra cierto tipo de

microorganismo, mientras que otros presentan un espectro de acción muy amplio y pueden inhibir una gran variedad de ellos. Los antioxidantes son preservativos que además previenen que los aceites y grasas se oxiden, perdiendo su sabor.

En la Tabla 4 se puede observar que uno de los agentes relacionados a los microorganismos con potencial antimicrobiano son los bacteriófagos. En la literatura no es de conocimiento que tal agente se haya incorporado en la matriz de una lámina comestible con el propósito de evaluar su calidad como biocida natural. Los bacteriófagos presentan un espectro de acción reducido, pero en combinación con otros bio-preservativos y/o sistemas de preservación convencionales, pueden resultar en un mayor efecto de la tecnología de barrera aplicada a los alimentos para su conservación.

Tabla 4-Agrupación de compuestos antimicrobianos naturales en base a su origen de procedencia.

Origen	Ejemplo	Agente antimicrobiano
Animales-constitutivos	Leche	Lactoperoxidasa, lactoferina
	Huevos	Lisozima, ovotransferina, avidina
Animales-inducidos	Sistema inmune	Anticuerpos
	Insectos	Antacina, cecropina
Plantas-pre infección	Hierbas, especies y otras plantas	Ácidos orgánicos (succínico, tartárico, málico, benzoico)
		Compuestos fenólicos (catecol, timol, DOPA, carvacrol)
		Flavonas metiladas (tengeretina)
		Flavonoles (morina, esperitina)
		Alcaloides (α -tomatina)
		Lactonas (borbonol)
		Compuestos similares a proteínas
		Compuestos fenólicos (taninos hidrolizables)
Plantas-post infección	Plantas infectadas o lastimadas	Isotiacionatos
		Fitoalexinas
Microorganismos	Bacterias ácido lácticas	Nisina, pediocina y otras bacteriocinas
	Otros microorganismos	Primaricina, subtilina, natamicina
		Bacteriófagos
		Otros metabolitos de bajo peso molecular (etanol, peróxido de hidrógeno)

Adaptado de Acero-Ortega, 2006

2.6 Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos, son virus que infectan y matan específicamente bacterias. Estos son partículas propagadas en el medio ambiente, lo que permite que se encuentren en cuerpos de agua dulce, océanos y suelos o en el medio en el cual se encuentre su célula huésped; convirtiéndose entonces en una de las entidades más distribuidas y de mayor número en la biosfera (Rojas, 2005). Se ha estimado que existen 10^{10} fagos por cada litro de agua, lo cual representa un excelente mecanismo para el control de las bacterias marinas, ya que se produce un equilibrio entre las bacterias que se multiplican y los fagos que destruyen una parte de esa población bacteriana (Ronda et al., 2003). En el suelo se han encontrado aproximadamente 10^{31} fagos y alrededor de 5,100 han sido identificados (Dorval et al., 2009). El organismo humano está acostumbrado al contacto con los fagos ya que son consumidos regularmente en los alimentos, son colonizadores habituales del intestino del ser humano y son muy abundantes en el medio ambiente (Ronda et al., 2003).

Se han descrito 12 familias de bacteriófagos con diferentes características estructurales y genéticas (Vispo & Puchades, 2001). Las propiedades morfológicas y del ácido nucleico han sido las bases para la descripción y clasificación de esas familias. En términos de la morfología se han observado formas: poliédrica, filamentosa, pleomórfica y con cola (Ackermann, 2007). En la Figura 1, se pueden observar algunas formas que presentan los fagos. Los fagos se encuentran entre los virus más complejos. Su estructura más común consiste en un ácido nucleico central (DNA o RNA) envuelto por una cubierta proteica llamada cápsido. Algunos virus están rodeados por una envoltura membranosa externa que contiene proteínas, lípidos, carbohidratos y vestigios de metales. Muchos fagos tienen una cola unida a la cabeza. El fago suele usar fibras que se extienden desde la cola para adherirse a la bacteria. Los bacteriófagos no son celulares y se les consideran parásitos intracelulares obligados que se multiplican en el interior de las bacterias. haciendo uso de algunas o todas sus maquinarias biosintéticas.

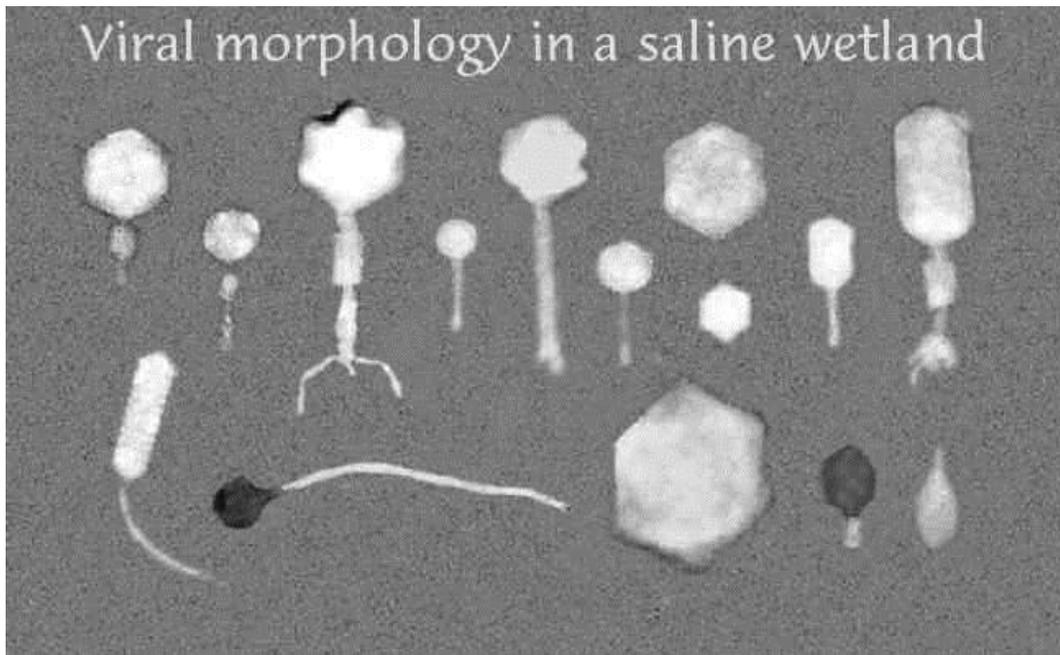


Figura 1- Diferentes morfologías de bacteriófagos. Tomado de Bird, D. (2012, octubre12).

En base al ciclo de vida que presente un bacteriófago puede clasificarse en lisogénico o lítico. Los fagos líticos o virulentos, en su ciclo de vida, presentan la siguiente secuencia de ataque:

1. El fago se ancla a la pared celular de la bacteria usando las fibras de la cola e inyecta a ella su material genético, el cual efectivamente toma control de la célula destruyendo la capacidad de la misma para funcionar o replicarse. En la Figura 2 se puede observar la apariencia de un fago antes y después de la inyección de su material genético.
2. Entonces comienza la replicación del material genético viral sincrónicamente con la síntesis de envolturas proteicas y el ensamblaje de proteínas para formar una partícula viral completa.

3. Cuando la replicación del bacteriófago debilita la pared celular y excede el espacio disponible dentro de la bacteria, culmina su ciclo de vida liberando las enzimas que lisan la pared celular bacteriana para liberar la progenie.

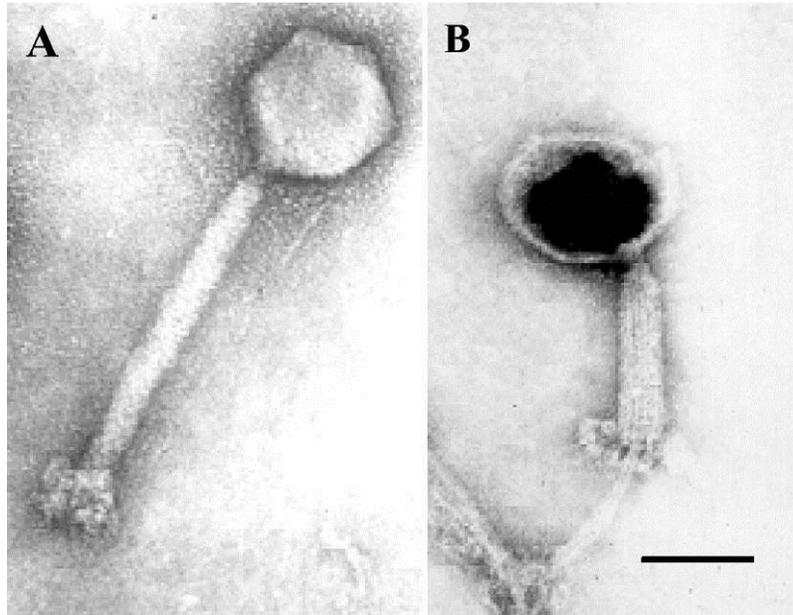


Figura 2- Bacteriófago K estafilococal; a) antes de inyectar el material genético (cápsido isométrico y cola contráctil) y b) después de inyectar el material genético (cápsido vacío y cola contraída).

Adaptado de O'Flaherty S et al. (2005)

Los fagos lisogénicos o temperados son aquellos que pueden multiplicarse vía el ciclo lítico o entran en un estado quiescente en la célula. Una vez producida la adsorción e inyección del genoma viral a la bacteria, el DNA viral se incorpora al cromosoma bacteriano, reprimiéndose la síntesis de nuevas partículas virales (estado quiescente). El término profago es utilizado para referirse al DNA del fago en estado reprimido porque no es un fago pero posee el potencial para producir fagos. En este estado no ocurre lisis celular y el DNA viral (profago) se va replicando junto al cromosoma bacteriano, dando lugar a una generación de células hijas lisogénicas que pueden crecer y dividirse sin liberar fagos al medio (Castelli, 2006). La célula que aloja un profago no se ve negativamente afectada por la presencia del

mismo y el estado lisogénico puede persistir indefinidamente. Debido a una inducción, ya sea física o química, se puede producir la liberación del profago del cromosoma bacteriano y generarse partículas virulentas que serán capaces de producir ciclos líticos (Castelli, 2006). Esta clase de fagos debe ser descartada en el uso como agentes antimicrobianos porque no pueden producir una lisis rápida ni un crecimiento exponencial en cantidades necesarias para conseguir una eficacia total, y, con frecuencia, son fagos que cargan genes que contribuyen a la patogenicidad o virulencia de la bacteria lisogénica a la que se incorpora el fago en cuestión (Ronda et al., 2003; Hagens & Loessner, 2007).

En la industria de alimentos los bacteriófagos tradicionalmente han presentado un impacto negativo. A modo de ejemplo se puede hacer alusión a los fagos que infectan los cultivos iniciadores en los procesos de fermentación de productos lácteos, perturbando el ciclo de fermentación. Particularmente en la producción de queso, una de las causas más relevantes relacionadas a la disminución de la actividad en los procesos de fermentación, es precisamente el ataque bacterofágico en las tinas de elaboración; acto que provoca una disminución pobre en el pH de la leche reflejándose en productos de mala calidad o incluso pérdidas de elaboración (Castelli, 2006). Sin embargo, debido a la demanda de parte del consumidor por alimentos más frescos y sin preservativos químicos, se ha hecho necesario buscar nuevas estrategias de preservación. Dentro de las estrategias novedales de preservación los bacteriófagos muestran un potencial invaluable en el biocontrol de microorganismos causantes de deterioro y patógenos del ser humano presentes en alimentos, además de ser una herramienta efectiva y rápida aplicable para la detección rutinaria de patógenos en un rango amplio de alimentos.

Experimentalmente, los bacteriófagos líticos han sido evaluados en el control biológico de microorganismos en las facilidades destinadas a la elaboración de alimentos y en los mismos alimentos. Muchos de los estudios relacionados a carne y productos cárnicos se han centrado en carne de ave. Los resultados muestran reducciones significativas en el número de células recuperables de *Campylobacter jejuni* y de *Salmonella enteritidis* en la piel de pollo (Atterbury et al., 2003; Goode et al., 2003; Bielke et al., 2007). En estos estudios el enfoque de la terapia fágica se realizó antes de la matanza del animal, debido a que este tipo de patógeno usualmente coloniza el animal durante su desarrollo. Por otra parte la

contaminación de alimentos por *Listeria monocitogenes* ocurre comúnmente durante su periodo de procesamiento, convirtiendo ese tiempo en el punto más razonable para el control del patógeno (Hagens & Loessner, 2007). En este contexto la FDA ha aprobado un aditivo de alimentos a base de fagos contra listeria y ha reconocido su estatus como GRAS. En el 2007, Hong y Conway aplicaron en combinación un bacteriófago y la bacteria *G. asaii* para reducir la contaminación de *Listeria monocitogenes* en pedazos de melón. En sistemas hidropónicos se han utilizado para reducir el número de células de *Salmonella* sp en germinados de semillas (Pao et al., 2004).

El concepto de emplear bacteriófagos para combatir patógenos es evidente, pero el éxito de la terapia fágica es una función de los principios básicos existentes en la relación entre la bacteria hospedera y el fago. Por lo tanto, se debe, como paso inicial, identificar un fago que pueda infectar una bacteria en particular y que de manera efectiva pueda adherirse a la misma, matarla y subsecuentemente amplificarse. En segundo lugar, si el alimento va a ser tratado durante la fase de iniciación de la infección debe haber una compensación empleando una dosis mayor de bacteriófagos. Por último, es necesario elegir el sistema de reparto más adecuado para introducir el bacteriófago en el alimento.

III. MATERIALES Y MÉTODO

3.1 Diseño experimental

En la Figura 3 se resumen en tres etapas la secuencia de pasos a seguir del diseño experimental. En la primera etapa de investigación se realizó un experimento para seleccionar la combinación de agentes antipardecimiento que permitiera inactivar las enzimas polifenol oxidasas en las pulpas de la materia prima rápidamente y con una dosis mínima de agente. En una serie de experimentos preliminares por separado se descartó la posibilidad de usar de manera individual ácido cítrico o bisulfito de sodio para desactivar las enzimas porque la concentración de estos agentes por encima de 1% no inactivó las enzimas aún después de 25 minutos de exposición.

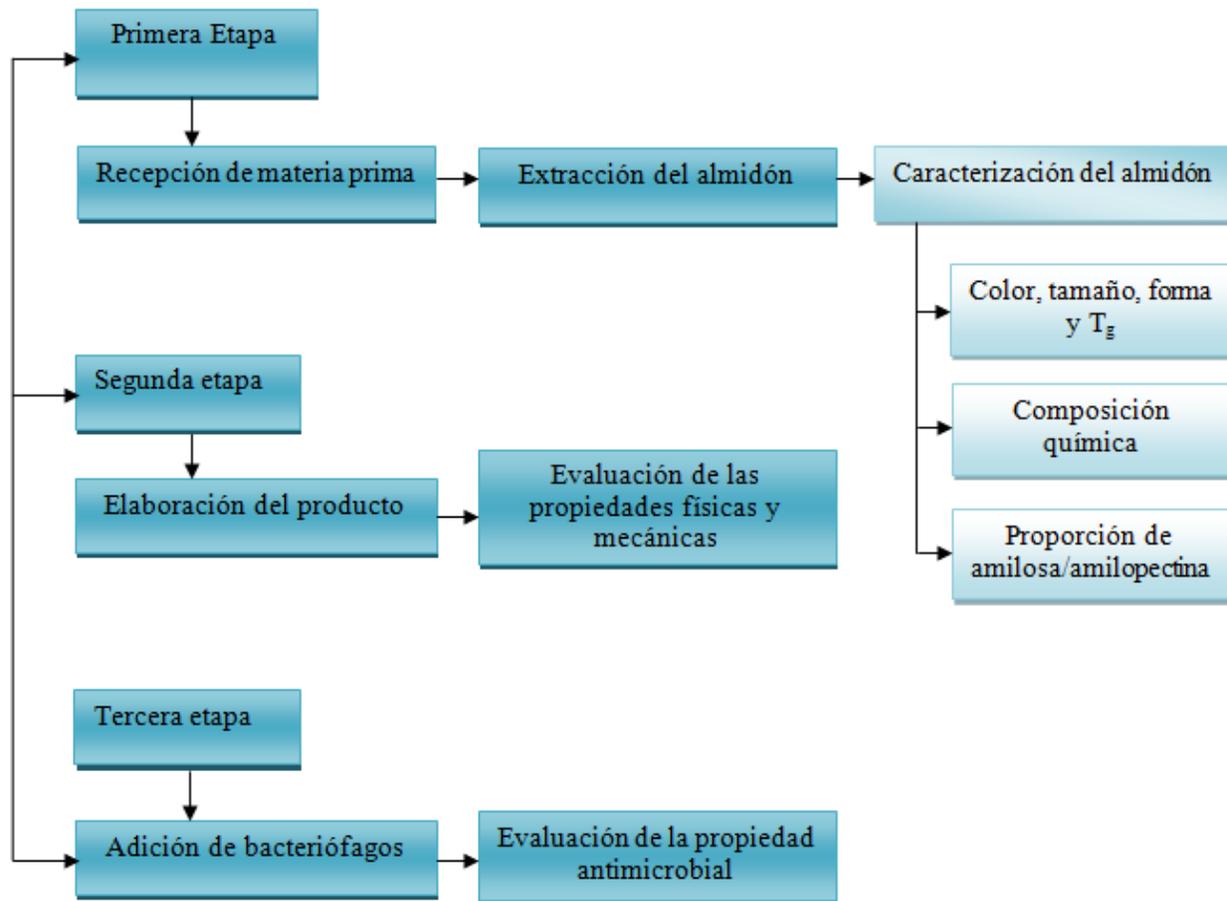


Figura 3- Flujograma de proceso

Con base en estos resultados se decidió aplicar en combinación los agentes antipardeamiento. La concentración de ácido cítrico se mantuvo constante a 1%, se incluyó un grupo control positivo y otro negativo. Para el análisis del experimento se planteo la siguiente notación:

Factor cualitativo: Tipo de tubérculo (T): cuatro niveles

T_1 = yuca, T_2 = yautía, T_3 = batata y T_4 = ñame

Factor cuantitativo: Concentración de bisulfito de sodio (BS): cuatro niveles

$(BS)_1$ = 0%, $(BS)_2$ = 0.25%, $(BS)_3$ = 0.50% y $(BS)_4$ = 1.0%

Respuesta: Presencia de la actividad de la enzima polifenol oxidasa

Se realizó una réplica con una observación en cada punto de muestreo (ver sección 4.2). La caracterización parcial del almidón fue en base a sus propiedades físicas (color, forma, tamaño y Tg) y su composición química (análisis proximal y razón amilosa/amilopectina). Para las determinaciones de la composición química y color se realizó una réplica con tres repeticiones. La temperatura de gelatinización (Tg) se calculó mediante los datos de dos observaciones de una réplica. En la sección 4.3 se explica en detalle como se determinó la forma y tamaño del almidón.

En la segunda parte experimental se trabajó con la formulación para elaborar las láminas comestibles. El diseño experimental fue uno factorial 4x4x3 con un total de 48 posibles tratamientos o formulaciones resultantes de la combinación de los diferentes niveles de los factores (Cuadro 2). Las variables de respuesta que se midieron fueron la permeanza al vapor de agua, la fuerza tensil y el porcentaje de elongación. El grupo control estaba compuesto por aquellas láminas cuya concentración de glicerol fue 0%. Se realizaron dos réplicas con tres observaciones para medir la permeanza al vapor de agua y dos réplicas con cinco observaciones para medir las otras dos variables de respuesta. A continuación se presentan los factores envueltos en el experimento y sus niveles.

Factor cualitativo: Fuente de almidón (FA): cuatro niveles

FA₁= yuca, FA₂= yautía, FA₃= batata y FA₄= ñame

Factor cuantitativo: Concentración de glicerol (CG): cuatro niveles

CG₁= 0%, CG₂=10%, CG₃=20% y CG₄= 30%

Factor cuantitativo: Cantidad de almidón (CA): tres niveles

CA₁= 1.0g, CA₂= 2.5g y CA₃= 4.0g

En la tercera parte se evaluó la posibilidad de utilizar bacteriófagos en calidad de biocidas naturales contra *S. aureus* mediante su incorporación en la matriz de una lámina comestible. Para esto se seleccionó aquella formulación que presentó mejor armonía entre las propiedades de barrera al vapor de agua (permeanza) y mecánicas (fuerza tensil y % elongación). La formulación se mantuvo constante y se

Cuadro 2- Tratamientos posibles de la combinación de los diferentes factores.

Tratamiento	FA	CG	CA
1	Yuca	0	1.0
2	Yuca	0	2.5
3	Yuca	0	4.0
4	Yuca	10	1.0
5	Yuca	10	2.5
6	Yuca	10	4.0
7	Yuca	20	1.0
8	Yuca	20	2.5
9	Yuca	20	4.0
10	Yuca	30	1.0
11	Yuca	30	2.5
12	Yuca	30	4.0
13	Yautía	0	1.0
14	Yautía	0	2.5
15	Yautía	0	4.0
16	Yautía	10	1.0
17	Yautía	10	2.5
18	Yautía	10	4.0
19	Yautía	20	1.0
20	Yautía	20	2.5
21	Yautía	20	4.0
22	Yautía	30	1.0
23	Yautía	30	2.5
24	Yautía	30	4.0
25	Batata	0	1.0
26	Batata	0	2.5
27	Batata	0	4.0
28	Batata	10	1.0
29	Batata	10	2.5
30	Batata	10	4.0
31	Batata	20	1.0
32	Batata	20	2.5
33	Batata	20	4.0
34	Batata	30	1.0
35	Batata	30	2.5
36	Batata	30	4.0
37	Ñame	0	1.0
38	Ñame	0	2.5
39	Ñame	0	4.0
40	Ñame	10	1.0
41	Ñame	10	2.5
42	Ñame	10	4.0
43	Ñame	20	1.0
44	Ñame	20	2.5
45	Ñame	20	4.0
46	Ñame	30	1.0
47	Ñame	30	2.5
48	Ñame	30	4.0

FA= fuente de almidón; CG= (glycerol); CA= cantidad de almidón.

varió la concentración de bacteriófago adicionada a la formulación. Se utilizaron dos niveles de concentración (baja y alta). La variable respuesta medida fue la propiedad antimicrobial de las láminas por el método de Kirby Bauer. El tamaño del halo de inhibición expresado en mm después de realizar la prueba de Kirby Bauer fue la medida de la propiedad antimicrobial.

El grupo control estuvo compuesto por aquellas láminas sin incorporación de bacteriófagos en su matriz. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado donde los tres tratamientos se aplicaron al azar. Se consideraron 9 repeticiones para cada tratamiento.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se utilizaron para medir el efecto de los factores en las variables de respuesta a través de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia de 95%. El análisis se realizó con el software estadístico InfoStat versión estudiante utilizando la prueba de Tukey para la comparación de medias. Los resultados de los análisis se resumen en el Apéndice.

3.2 Materia prima

Los farináceos fueron suministrados por la Estación Experimental Agrícola de Corozal de la Universidad de Puerto Rico-Recinto de Mayagüez. Las variedades que se utilizaron como fuente de almidón fueron las siguientes:

1. Ñame (*Dioscorea rotundata*): variedad guinea blanco
2. Yautía (*Xanthosomas sagittifolium*): variedad estela
3. Yuca (*Manihot esculenta*): variedad serrallés
4. Batata (*Ipomoea batatas*): variedad selección 98-040

A continuación se presentan unas Figuras (4, 5, 6 y 7) con los tubérculos que se utilizaron en la investigación, cortesía del Agrónomo Manuel Díaz.



Figura 4- Ñame variedad guinea blanco



Figura 5- Yautía variedad estela



Figura 6- Yuca variedad serralés



Figura 7- Batata selección 98-040

Los farináceos fueron recolectados, colocados en cajas de cartón que permitían la libre circulación del aire y transportados hasta la planta piloto del edificio Alfredo Ramírez de Arellano y Rosell, en el Recinto de Mayagüez. En el manejo pos-cosecha de este tipo de producto lo ideal es procesar los alimentos la más pronto posible para evitar pérdidas. Los farináceos proveedores de almidón no se procesaron el mismo día de su recolección. Para evitar perdidas se almacenaron siguiendo las recomendaciones establecidas en el Conjunto Tecnológico de Raíces y Tubérculos. En resumen, las condiciones de almacenamiento fueron a temperatura ambiente, en un lugar bajo techo y con buena ventilación; asegurando una circulación adecuada del aire entre las cajas de cartón y que la humedad relativa oscile entre 70-80%. Bajo estas condiciones de almacenamiento los tubérculos se conservan con buenas propiedades culinarias y sin brotes de 2 a 3 semanas. Para este trabajo de tesis los tubérculos se procesaron entre el segundo y tercer día después de su recolección.

3.3 Extracción del almidón

El almidón extraído de los tubérculos empleados como materia prima en esta investigación se obtuvo siguiendo el procedimiento establecido por Alarcon & Dufour (1998). Los procesos principales involucrados en la extracción de almidones a partir de tubérculos incluyen molienda, tamizado, separación con agua, sedimentación y secado.

Antes de proceder con la extracción del almidón se realizó una operación de lavado utilizando agua y jabón, para remover el sucio y reducir la carga microbiana en la superficie de los farináceos. Esta operación es importante porque además ayuda a disminuir la dosis de desinfectante requerida en el proceso de desinfección. El proceso de desinfección se realizó por inmersión de los farináceos en agua clorinada a una concentración de 200 ppm de cloro con hipoclorito de sodio (XY-12®, Ecolab, Unc. 8.4% w/w de hipoclorito de sodio) a temperatura ambiente por un periodo de 10 minutos. Las operaciones de pelado y trozado se realizaron de manera manual empleando cuchillos de acero inoxidable. La pulpa obtenida a partir de los tubérculos presentó pardeamiento enzimático. Esto era de esperarse debido a la actividad de enzimas polifenol oxidasas, las cuales producen compuestos de color oscuro que pueden provocar problemas en la calidad final del almidón en términos de la apariencia, específicamente, el color.

Para evitar la generación de tales compuestos en las pulpas provenientes de los diferentes tubérculos se realizó la operación de molienda utilizando soluciones con agentes antipardeamiento de calidad alimentaria en una licuadora comercial. Para determinar el tratamiento más efectivo se emplearon soluciones de ácido cítrico y bisulfito de sodio en las siguientes proporciones (1%:0%, 1%:0.25%, 1%:0.50%, 1%:1%). La razón de pulpa y solución empleada en la molienda fue de 1:1(w/w). El tiempo de exposición fue de 16 minutos y el intervalo de muestreo 2 minutos. La operación de molienda se aplicó junto con el tratamiento más efectivo por espacio de tres minutos, con el objetivo de romper la pared celular y de esta manera liberar los gránulos de almidón contenidos en las células de los tejidos de las raíces. La pulpa molida permaneció en reposo hasta que las enzimas fueran desactivadas. Se utilizó la prueba cualitativa de peroxidasa para verificar la desactivación de las enzimas. Los reactivos usados

fueron; solución de guayacol al 1% en etanol 95%, peróxido de hidrógeno 1% y agua destilada. Para realizar la prueba se pesó una muestra de 5g de la pulpa molida en un plato de pesada desechable y se mezcló con 5ml de agua destilada. Luego la muestra se transfirió a un tubo de ensayo de 10ml y se añadió un 1ml de solución de guayacol seguido de 1ml de peróxido de hidrógeno. El tubo se tapó y agitó ligeramente. Se observó para detectar la presencia o ausencia de actividad de la enzima polifenol oxidasa, evidente por la formación de un compuesto color rojizo. Si no ocurre la formación de un compuesto color rojizo entre un lapso de tiempo de 3 a 5 minutos la prueba es considerada negativa.

La pulpa molida fue filtrada con ayuda de un “cheese cloth” doble. La lechada se colectó en un recipiente plástico con capacidad de 3 cuartillos. Las pulpas fueron lavadas con agua del grifo hasta que no quedara residuo aparente de almidón en la lechada filtrada. Se dispuso del gabazo resultante en bolsas plásticas que posteriormente se depositaron en el zafacón. Los recipientes plásticos se cubrieron con redecillas para evitar la entrada de insectos y la generación de un ambiente anaeróbico en los mismos. La lechada resultante consiste de almidón, fibra fina y material proteico en suspensión. Para minimizar los componentes de la lechada que no son almidón, se realizó, por duplicado un proceso de sedimentación. El mismo consistió en dejar reposar la lechada a temperatura ambiente en los recipientes por 24 horas para permitir la deposición de los gránulos de almidón en el fondo de los recipientes por acción de la gravedad. Al cabo de las 24 horas, el sobrenadante fue descartado, la pasta resultante (almidón húmedo) se lavó y recibió un segundo paso de sedimentación.

Una vez terminado el proceso de sedimentación el almidón húmedo se transfirió a bandejas de aluminio y se colocaron en un horno convencional a 40°C para secar el almidón hasta alcanzar un porcentaje de humedad entre 12-14%. El tiempo de secado varió entre 18 a 24 horas dependiendo de la cantidad de almidón colocada. Los terrones duros resultantes se pasaron por un molino y luego se cernió sucesivamente utilizando tamices de mallas 20, 40, 80 y 100 U.S. Este proceso se repitió hasta conseguir que la mayoría del almidón pasara por la malla de 100 U.S y fue la fracción que se utilizó en los experimentos siguientes. El almidón en polvo obtenido se almacenó a 20°C luego de ser empacado en botellas de cristal ámbar rotuladas con el tipo de almidón y la fecha de extracción.

3.4 Caracterización del almidón

Para determinar el tamaño y forma del gránulo se prepararon laminillas con una gota de solución de almidón de cada tipo al 1% (w/v). Las laminillas se cubrieron con un cubre objeto y se observaron bajo un microscopio de Normasky (Olympus BH2) para determinar la forma. Luego se tomaron micrografías que se emplearon para determinar el tamaño promedio de cada tipo de almidón con ayuda del software “Spot Advance”. El tamaño de los diferentes almidones se reportó como el promedio de las medidas de aquellos gránulos que ocupaban el espacio de la laminilla al colocar un cubre objeto. Usando las mismas soluciones se montaron laminillas y se observaron bajo un microscopio de luz polarizada para evaluar la integridad de la estructura de los gránulos de almidón basándose en la propiedad de birrefringencia.

El color de los cuatro tipos de almidones se determinó usando un colorímetro (HunterLab – Miniscan XE) con un iluminante D65 y un ángulo de observación de 10°. El equipo fue calibrado con un estándar de color blanco y un estándar de color negro antes de la toma de lecturas. Las muestras de almidón fueron colocadas en las unidades de prueba en cantidad suficiente para llenar las mismas. Se prepararon tres unidades de prueba para cada tipo de almidón y las lecturas se reportaron en el sistema L*, a* y b* como el promedio de las lecturas.

La composición proximal del almidón se determinó en base al contenido de humedad, grasa, proteína, ceniza y fibra siguiendo los métodos correspondientes propuestos por la AOAC (1990). La humedad se determinó utilizando el método por desecación en estufa Nro. 925.10. La grasa por extracción utilizando como solvente éter de petróleo de grado analítico, método Nro. 920.39. La Proteína (N X 6.25) por el método 960.52. La ceniza por el método Nro. 923.03. Para la fibra cruda se utilizó el método 962.09. Los carbohidratos totales se calcularon restando a 100 la suma de los porcentajes obtenidos de las determinaciones de los componentes antes mencionados. El método colorimétrico descrito por Hoover y Ratnayake (2005) fue utilizado para determinar el contenido de amilosa total.

Este protocolo se basa en la afinidad del yodo con la amilosa para producir un color azul y involucra los siguientes pasos;

1. Remoción de los lípidos presentes en las muestras de almidón utilizando n-propanol al 75% por 7 horas.
2. Dispersión del almidón en sulfoxido de dimetilo (DMSO) al 90%.
3. Determinación de la absorbancia a 600nm del almidón dispersado.
4. Preparación de una curva estándar sobre un rango de 0-100% de amilosa, a partir de mezclas de amilosa y amilopectina pura. Se utilizaron amilosa y amilopectina estándar de papa (Sigma Aldrich) para preparar la curva estándar.
5. Calcular el contenido total de amilosa a partir de la curva estándar usando la fórmula que se muestra a continuación, donde m es la pendiente de la ecuación de la línea recta después de haber aplicado una regresión lineal y b es el intercepto en y.

$$\% \text{ amilosa} = (\text{absorbancia}-b)/m \qquad \text{Ecuación (1)}$$

La temperatura de gelatinización se determinó por medio de calorimetría diferencial de barrido (CDB). Para esto se prepararon celdas de aluminio con 12 mg de almidón en 48µl de agua destilada, por duplicado. Se sellaron herméticamente y se dejaron en reposo toda la noche. Después de este tiempo, las celdas conteniendo almidón fueron escaneadas contra una celda vacía de referencia en un calorímetro diferencial de barrido previamente calibrado con indio y conectado a una computadora para el manejo y análisis de datos. El rango de temperatura usado fue de 25 a 100°C a una velocidad de calentamiento de 10°C/min y la unidad de muestreo fue purgada con N₂ a 50ml/min. A partir de los termogramas obtenidos y usando el software “Advantage” versión 5.0.1 se calcularon las temperaturas de gelatinización (T_g).

3.5 Elaboración de la lámina comestible

Las técnicas que son usadas para procesar materiales a base de almidón, tales como extrusión, moldeo por inyección (“injection molding”) y “film casting”, son similares a aquellas ampliamente usadas en el procesamiento tradicional de plásticos a base de petróleo. Las láminas comestibles se elaboraron a través de la técnica de moldeo, la cual típicamente envuelve la preparación de una solución filmogénica, gelatinización, moldeo y secado.

La preparación de la solución formadora de lámina consistió en mezclar directamente almidón y agua. La cantidad de agua se mantuvo constante (100ml) en todos los tratamientos y la cantidad de almidón varió entre 1 a 4g. En la elaboración de las láminas se utilizó glicerol como plastificante en concentraciones entre 0-30% (w/w) en base a la cantidad de almidón. La solución filmogénica se calentó desde temperatura de salón hasta alcanzar $80 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo a esa temperatura por 15 minutos en agitación constante. La solución gelatinizada fue enfriada a 65°C para tomar alícuotas de 30ml que se vertieron en platos Petri. Estos se almacenaron sin tapar para permitir evaporación del exceso de agua a temperatura ambiente toda la noche en un gabinete con flujo laminar.

El grosor de las láminas comestibles elaboradas por la técnica de moldeo en plato depende del volumen de la solución gelatinizada vertido. Normalmente las láminas presentan un grosor entre 0.02-0.10 mm. El grosor de las láminas obtenidas a partir de 30ml se determinó utilizando un micrómetro manual. Se obtuvieron cinco medidas, una en el centro y cuatro en el perímetro de las láminas, el valor del promedio de las medidas se reportó como el grosor de las láminas comestibles.

3.6 Evaluación de las propiedades de la lámina comestible

Propiedades de barrera (vapor de agua)

Dentro de las funciones que tienen los empaques, las cuales han sido previamente mencionadas, la más importante es proteger al producto y conservar su calidad e inocuidad durante el almacenamiento. La permeabilidad de un material de empaque es una de las propiedades más importantes que afectan la

calidad e inocuidad de los productos alimenticios. En términos de las láminas comestibles, la permeabilidad se puede definir como la propiedad de las mismas que permite el paso de sustancias a través de su estructura molecular. Estas sustancias pueden ser gases o vapor, aromas y sabores. Las láminas comestibles a base de almidón presentan poca barrera al vapor de agua; reflejándose esto en altos valores de permeabilidad al vapor de agua en comparación con láminas plásticas flexibles a base de polímeros sintéticos. La permeabilidad al vapor de agua para las láminas comestibles elaboradas a base de almidón de farináceos en este trabajo, se evaluaron gravimétricamente por el método estándar ASTM E96-80 con algunas modificaciones.

El estándar provee tres procedimientos; método vía desecante, método vía húmeda y el método de agua invertida. Los materiales básicos necesarios para realizar los métodos son; espécimen de prueba, plato o taza de prueba, agente desecante, agua destilada y una cámara para controlar las condiciones atmosféricas. El arreglo en que se utilicen estos materiales para determinar la permeabilidad al vapor de agua del espécimen define el tipo de método utilizado. En el método vía desecante el espécimen de prueba es sellado en la apertura de un plato o taza de prueba conteniendo un agente desecante, y el arreglo es colocado en una cámara con atmósfera controlada. El agua destilada se usa para generar condiciones altas de humedad relativa por encima del espécimen de prueba. La temperatura a la cual puede tomar lugar la prueba puede variar entre 21 a 32 C°. Una vez se elige la temperatura debe mantenerse constante. Periódicamente se obtienen medidas de peso del arreglo que determinan la razón del movimiento de vapor de agua hacia el agente desecante. En el método vía húmeda el arreglo cambia y el agua destilada se utiliza para generar condiciones de alta humedad relativa por debajo del espécimen de prueba. En la Figura 8 se presentan las configuraciones de ambos métodos. En el método de agua invertida se sigue la misma configuración del método vía húmeda, pero la taza de prueba es invertida antes de colocarla en la cámara.

Joy y Wilson (1966) reportaron valores de permeanza para diferentes tipos de materiales utilizando el método vía desecante y el método vía húmeda. Al comparar los valores, ellos encontraron que aquellos materiales higroscópicos eran afectados grandemente por las condiciones de humedad,

haciendo el método vía húmeda menos confiable para este tipo de material. Además se ha observado que al utilizar el método vía húmeda arroja valores de transmisión al vapor de agua aparente, que incluyen una contribución a partir de la fase líquida absorbida por el material de prueba (Bomberg, 1989). Debido a que es de conocimiento que las láminas comestibles a base de almidón son higroscópicas, y por lo antes mencionado, se seleccionó el método vía desecante para las determinaciones de permeabilidad al vapor de agua.

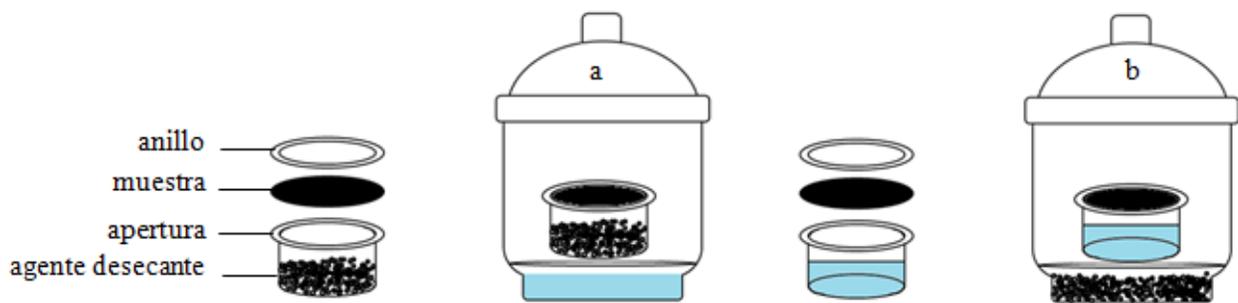


Figura 8: Representación esquemática para; a) arreglo para el método vía desecante y b) arreglo para el método vía húmeda. Método para determinar la permeancia en láminas comestibles.

Para esto se utilizó sílica gel (6-12 mesh) como agente desecante, activado por 24 horas a 200°C antes de ser utilizado en las determinaciones para generar una condición de 0% de humedad relativa dentro de la taza de prueba. La taza de prueba consistió en un pote de cristal de forma redonda con una altura de 9.9cm y un diámetro de apertura de 6.9cm (Figura 9). El desecante se colocó en el interior del pote en cantidad suficiente para permitir un espacio de una pulgada entre el desecante y la lámina comestible. La lámina comestible se pre-selló en la apertura del pote utilizando “vacuum grease” y se colocó luego la tapa. Los envases, una vez preparados, se pesaron inmediatamente y se colocaron en un desecador conteniendo agua destilada en el fondo para generar una condición de 100% de humedad relativa por encima de la lámina. La prueba tomó lugar a una temperatura de 23±1 °C por un lapso de 12

horas. Se tomaron medidas de peso a los pots cada dos horas y se agitaron horizontalmente antes de ser colocados nuevamente en los desecadores.

Con los pesos obtenidos durante el tiempo de muestreo se generaron gráficas de peso versus tiempo. Luego se aplicó una regresión lineal y se obtuvieron los valores de las pendientes para cada curva (razón de la transferencia de vapor de agua en las láminas comestibles) y se utilizó para calcular la permeabilidad al vapor de agua (P) usando la siguiente ecuación:

$$P = GL / A\Delta P \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde; G es la pendiente, L es el grosor de la lámina comestible, A es el área de prueba y el ΔP es la diferencia en presión de vapor de agua a través de la lámina.

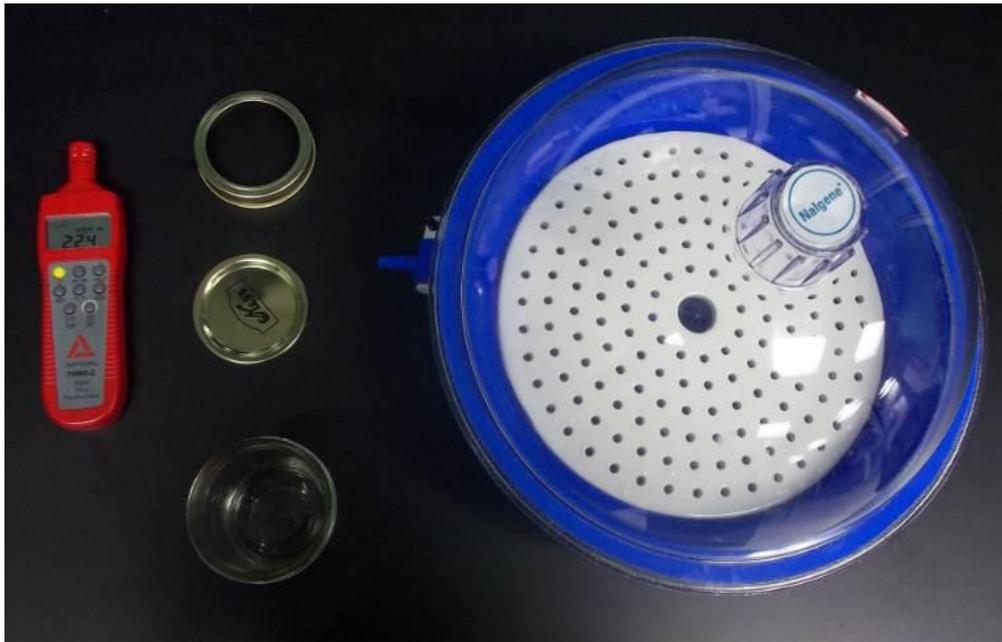


Figura 9- Equipo y sus componentes, usado para la prueba de permeanza al vapor de agua.

Propiedades mecánicas

El estudio de las propiedades mecánicas se realizó en base a los valores calculados de fuerza tensil y porcentaje de elongación de las láminas comestibles utilizando un analizador de textura

(Texturometro TA-XT2). Las láminas se prepararon para el análisis cortándolas en tirillas de 2.57 cm de ancho y 4.60 cm de largo, utilizando un bisturí, después de haber sido acondicionadas por 72 horas en un desecador a 55% de humedad relativa y 22°C. Las condiciones de prueba fueron a una distancia de 10mm a razón de 10mm/seg. Con la información obtenida a partir del software Expert del texturómetro se calculó la fuerza tensil (TS) y el porcentaje de elongación (%E) usando las siguientes ecuaciones (Ehivet et al., 2011):

$$TS \text{ (MPa)} = \text{Peak load (N)} / \text{área inicial cros-seccional (m}^2\text{)} \quad \text{Ecuación (3)}$$

$$E\% = (\text{Aumento en longitud al punto de quiebre (mm)} / \text{longitud original}) * 100 \quad \text{Ecuación (4)}$$

3.7 Adición de bacteriófago

Bacteria huésped y bacteriófago

A través de la “American Type Culture Collection” (ATCC) se obtuvo el bacteriófago 52 (ATCC 27692-B1) con un ciclo lítico de infección y especificidad para la bacteria *S. aureus* subsp. *aureus* (ATCC 27692). Tanto la bacteria como el bacteriófago se recibieron liofilizados y congelados. Para la propagación de la bacteria se preparó un tubo de ensayo con capacidad de 10ml con 5ml del medio de cultivo “Trypticase Soy Broth” (TSB) estéril. Se retiró 1ml del tubo conteniendo TSB y se transfirió al vial de la bacteria para rehidratar el pellet. Asépticamente se transfirió la alícuota de regresó al tubo con TSB y se mezcló bien. Se utilizaron varias gotas de la suspensión para inocular dos platos con medio de cultivo “Trypticase Soy Agar” (TSA) y dos platos con medio de cultivo “Mannitol Salt Agar” (MSA). El tubo de ensayo y los platos inoculados fueron incubados a 37°C por 18-24 horas. Luego del tiempo de incubación a partir del tubo de ensayo se preparó y fijó un frotis en una laminilla. El frotis se utilizó para realizar una tinción de Gram. Después, la laminilla fue observada bajo el microscopio para observar el resultado de la tinción, identificar el arreglo celular de la bacteria y confirmar la obtención de un cultivo puro. Los platos de TSB y MSA se utilizaron para observar la morfología de colonia y la fermentación de

manitol en presencia de altas concentraciones de sal. A partir del tubo de ensayo se retiraron 400 μL de la suspensión bacteriana y se mezclaron con 400 μL de glicerol al 50% en un vial de congelación. El vial fue rotulado con el nombre de la bacteria, fecha e iniciales de la persona que realizó el “stock”, y se almacenó a -80°C .

Antes de comenzar con la propagación del bacteriófago se preparó un cultivo activo de la bacteria hospedera en fase logarítmica temprana. Además, se prepararon platos con “Nutrient Agar” (NA) y tubos de ensayo con 3 ml de agar semisólido suplementados con cloruro de calcio (Ca_2Cl) que fueron utilizados en el ensayo de titulación. Los tubos con agar blando se calentaron a 80°C para derretir el agar y enfriados a 45°C usando un baño de agua. Los platos conteniendo NA se colocaron 15 minutos en una incubadora a 37°C para ser atemperados antes de realizar el ensayo. Para propagar el bacteriófago, se rehidrató el vial utilizando medio de cultivo “Nutrient Broth” (NB) en cantidad suficiente para obtener un volumen de 1.5 ml, según las instrucciones provistas por el fabricante. Se realizó una titulación para conocer la concentración de bacteriófago en el volumen del vial utilizando la técnica de doble capa de agar. Se separaron 14 tubos de microcentrífuga de 2 mL. A 7 de los cuales se le adicionaron 900 μL de NB y donde se realizaron diluciones seriadas hasta 10^{-7} . Los tubos fueron previamente rotulados con el número de dilución correspondiente. Partiendo del vial con el bacteriófago propagado se transfirió una alícuota de 100 μL al tubo número 1 (dilución 10^{-1}) y se mezcló utilizando vórtex. Luego se transfirieron 100 μL de esta primera dilución al tubo número 2, ejecutando el mismo procedimiento antes mencionado. De esta forma se realizaron de forma sucesiva las 7 diluciones seriadas. En los 7 tubos restantes se adicionaron 100 μL de la suspensión de la bacteria hospedera en fase de crecimiento logarítmica y 100 μL de las diluciones realizadas. Los tubos se rotularon con las diluciones correspondientes y se esperó 4 minutos antes de transferir el contenido a siete tubos de ensayo con 3 mL de agar blando previamente rotulados con la dilución correspondiente. Para validar el ensayo se corrió un control negativo y un blanco. El control negativo consistió en un tubo con 3 ml de agar blando sin la adición de bacteria y bacteriófago. El blanco se preparó adicionando solamente 100 μL de la suspensión de bacteria a un tubo con 3 mL de agar blando. Luego se vertió el contenido de los tubos de ensayo en la superficie de platos Petri con NA

asegurando una distribución homogénea de la capa del agar blando. Una vez solidificada la capa de agar blando, los platos se incubaron invertidos a 37°C por 24 horas. Después del tiempo de incubación se realizó el recuento de las placas obtenidas por cada dilución. Se tomó en consideración aquella dilución en la cual el recuento de placas estuvo entre 30 y 300 para reportar el resultado final (Apéndice 3). La siguiente fórmula fue usada para calcular las unidades formadoras de placa (UFP) en 1 ml de suspensión.

$$\frac{\text{UFP} = \# \text{ placas} \times \text{inverso factor de dilución}}{\text{mL} \quad \text{volumen de la alícuota}} \quad \text{Ecuación (5)}$$

Curva de crecimiento

Fue necesario realizar una curva de crecimiento para identificar el tiempo en cual la bacteria alcanza un crecimiento exponencial o logarítmico. Para esto se tomaron 100µL del cultivo almacenado a -80°C y se puso a crecer en un tubo con 10ml de TSB toda la noche. Luego se determinó la absorbancia (OD real) en el cultivo y se utilizó la siguiente fórmula para determinar el volumen necesario de cultivo iniciador a utilizar para realizar la curva de crecimiento a partir de 100 mL de medio fresco de TSB.

$$\text{mL}_{\text{cultivo iniciador}} = (\text{OD}_{\text{deseado}} / \text{OD}_{\text{real}}) \times \text{mL}_{\text{medio sin inocular}} \quad \text{Ecuación (6)}$$

Después de adicionar el volumen de cultivo iniciador necesario al matraz conteniendo el medio fresco se procedió a tomar una lectura de absorbancia para verificar que la medida de OD estuviera cercana a la deseada (0.025). Luego se colocó el matraz en un agitador orbital operado a 200 rpm y 37°C hasta que la bacteria entró a fase estacionaria. El crecimiento bacteriano se monitoreo a través del tiempo tomando alícuotas para realizar lecturas de absorbancia y determinar el recuento en placa de microorganismos cada 30 minutos. El medio usado para determinar el recuento en placa fue TSA y la técnica de vertido en plato. Se utilizaron los recuentos de colonias en cada punto de muestreo para estimar el número de microorganismos que estuvieron en el rango de 25 a 250 colonias. El crecimiento bacteriano fue graficado

en función del tiempo y se correlacionó el logaritmo del número de células frente al tiempo con el valor de OD (densidad óptica).

Propagación de bacteriófagos (fagos)

Se realizaron propagaciones del fago para obtener lisados de fagos en un volumen suficiente para los ensayos posteriores. Se realizaron propagaciones en plato usando la técnica de doble capa de agar con una multiplicidad de infección (MOI) igual a 0.00001. Después de incubar a 37°C por 18-24 hrs los platos con las propagaciones se colocaron en un congelador a -80°C por dos horas. Luego se descongelaron a temperatura ambiente y el líquido expulsado se transfirió a tubos de centrifuga.

$$\text{MOI} = \text{N}^\circ \text{ fagos} / \text{N}^\circ \text{ células}$$

Ecuación (7)

También se realizaron propagaciones en tubos de ensayo con 10mL de “Nutrient Broth” suplementado con CaCl_2 usando una MOI igual a 0.01 y 1. Después de adicionar la cantidad necesaria de fagos y bacterias a los tubos de ensayo para obtener la MOI deseada se incubaron por 15 minutos a 37°C sin agitación. Luego se incubaron a la misma temperatura por 30 minutos a 200 rpm. Después se incubaron por 18-24 hrs y el contenido fue transferido a tubos de centrifuga. Los tubos de centrifuga rotulados apropiadamente conteniendo las diferentes propagaciones se centrifugaron a 10000 rpm por 25 minutos. En los diferentes tubos se observó la formación de un sedimento en el fondo debido a la sedimentación bacteriana y un sobrenadante. El sobrenadante fue conservado pasando a denominarse lisado de fagos y el sedimento fue descartado. Se realizó un ensayo de infectividad a los diferentes lisados para determinar su viabilidad y tener una idea de la cantidad de fagos presente en los mismos. Si se observó lisis de la bacteria hospedera en el ensayo evidente por la formación de placas y estas placas eran totalmente transparentes se procedió a filtrar el lisado a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm . Luego los lisados de fagos filtrados fueron titulados y se realizó una prueba de esterilidad. Los lisados

fueron almacenados a 4°C hasta el momento de uso para la elaboración de láminas comestibles antimicrobianas.

Adición del bacteriófago

La formulación para elaborar la lámina comestible en esta etapa experimental está compuesta de agua, almidón, glicerol y bacteriófago. Las cantidades de los primeros tres componentes permaneció constante y se varió la concentración de bacteriófago adicionada a la formulación. A diferencia de otros agentes antimicrobianos naturales (Tabla 4) los bacteriófagos, a pesar de ser entidades no vivas, en presencia de la bacteria hospedera adecuada adquieren la capacidad de replicarse. Por consiguiente, si se establecen niveles de concentración de prueba siguiendo los patrones utilizados con otros agentes antimicrobianos incorporados en láminas comestibles la probabilidad de no detectar diferencias aumenta. Es por esto que se decidió evaluar dos niveles de concentración encarados; concentración baja y alta.

La solución filmogénica se preparó siguiendo los pasos descritos en la sección 4.4. Después del tiempo de procesamiento a 80°C la solución se enfrió a temperatura de salón hasta 50°C en agitación constante y se adicionó el bacteriófago según las concentraciones establecidas: 0, 10^3 y 10^6 . La solución permaneció en agitación por 5 minutos adicionales para permitir una distribución homogénea de los fagos en la solución. Antes de vertir la solución filmogénica en los platos Petri para obtener las láminas comestibles se removió una alícuota de 100µL para confirmar la cantidad de fagos adicionada. Las láminas se despegaron de los platos y se almacenaron en un desecador a 55% de humedad relativa y 22°C por 72 horas antes de proceder con su preparación para la evaluación de la propiedad antimicrobial.

Evaluación de las propiedades antimicrobial

Preparación de la bacteria huésped

A partir del cultivo almacenado a - 80°C se tomó una alícuota de 100 µL y se transfirió a un tubo de ensayo con 10 ml de TSB. El tubo se incubó toda la noche a 37°C. Se tomó una alícuota y se transfirió

a un matraz con 100mL de medio fresco de TSB suplementado con CaCl_2 . El matraz fue incubado hasta obtener una lectura de absorbancia de 0.500 que indica un crecimiento logarítmico del cultivo (10^8 UFC/mL) ver Tabla 11.

Ensayo antimicrobial

Para el estudio microbiológico se utilizó la prueba de difusión en agar (método modificado de Kirby-Bauer). Esta prueba es uno de los métodos más utilizados en muchos de los laboratorios de microbiología para determinar “in vitro” la susceptibilidad de las bacterias ante agentes microbianos (Cona, 2002). Para comenzar con el ensayo se inoculó, de forma homogénea y utilizando un aplicador estéril de algodón, la superficie de platos Petri conteniendo el medio de cultivo “Müeller-Hinton Agar” con la suspensión preparada de *S. aureus*. La distribución homogénea se logró extendiendo el aplicador de un extremo a otro sobre toda la superficie del medio de cultivo. Este proceso fue repetido dos o más veces, rotando el plato aproximadamente 60° después de cada aplicación para asegurar la distribución constante del inóculo (Apéndice 2). Finalmente se pasó el aplicador sobre los bordes del agar.

Un periodo de 3 minutos fue cedido para permitir la impregnación del inóculo. Durante ese tiempo el exceso de humedad en la superficie del agar fue absorbida antes de aplicar las láminas comestibles con el agente antimicrobiano (bacteriófago). Las láminas comestibles conteniendo diferentes concentraciones de bacteriófagos fueron cortadas en discos de 3.8cm de diámetro usando un bisturí estéril para obtener las muestras requeridas para el análisis microbiológico. Se obtuvieron nueve discos de cada formulación y se designo un plato Petri para cada uno. Luego se colocó un disco de muestra en el centro de cada plato ejerciendo presión para asegurar contacto con la superficie del agar (Apéndice 2). Los platos Petri se incubaron a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas y se midió el tamaño del halo de inhibición alrededor de los discos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Desactivación enzimática

Los cuatro tratamientos que se aplicaron a las pulpas de los farináceos (yuca, batata, yautía y ñame) para el control de la enzima polifenol oxidasa se designaron con la siguiente notación:

Tratamiento A- solución de ácido cítrico al 1% en agua destilada

Tratamiento B- solución de ácido cítrico al 1% y 0.25% de bisulfito de sodio en agua destilada

Tratamiento C- solución de ácido cítrico al 1% y 0.50% de bisulfito de sodio en agua destilada

Tratamiento D- solución de ácido cítrico al 1% y 1% de bisulfito de sodio en agua destilada

Se utilizó la prueba cualitativa de peroxidasa para verificar la inhibición enzimática en base al estudio realizado por Arnok y colaboradores (2010) en pimiento. Ellos encontraron que la actividad de peroxidasa era mayor que polifenol oxidasa en un rango de pH de 3 a 8.

Tabla 5- Resultados para la prueba de peroxidasa realizada en pulpa de farináceos.

Farináceo	Tratamiento	Tiempos en minutos							
		2	4	6	8	10	12	14	16
Yuca	A	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	-							
	D	-							
Batata	A	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+
	D	-							
Yautía	A	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+
	D	-							
Ñame	A	+	+	+	+	+	+	+	+
	B	+	+	+	+	+	+	+	+
	C	+	+	+	+	+	+	+	+
	D	-							
Controles	+	La prueba de peroxidasa realizada a los controles se hizo al tiempo cero y en el control + hubo formación de color rojizo y en el control- no.							
	-								

El pH en la solución conteniendo 1% de ácido cítrico fue de 2.27 en promedio. Se esperaba que la exposición de la enzima a un pH extremo por fuera del intervalo óptimo desactivara la enzima, pero no fue así en las diferentes pulpas de tubérculos probadas. En la Tabla 5 se puede observar, que después de 16 minutos de exposición, las pulpas exhibieron un resultado positivo. El efecto que ejerce el pH en las enzimas cuando está por debajo o por encima del óptimo se debe a que ocasiona cambios en su conformación afectando la especificidad por ciertos sustratos. La enzima polifenoloxidasasa (PPO) en la mayoría de las plantas exhibe un máximo de actividad a un pH cercano a neutral, siendo el intervalo de 4 a 8 el que mejor recoge los valores de pH óptimo de muchas frutas y vegetales (Manohan y Chen Wai, 2012). Pero se ha encontrado que ésta puede retener parte de su actividad aún a pH por debajo del óptimo. Shengming y colaboradores (2005), estudiaron la estabilidad de PPO extraída de “water chestnut” frente a un rango de pH de 3.0 a 8.0, reportaron una actividad a pH 3 de 10% después de incubar por un periodo de 12 horas a 20°C. Gogbeu y colaboradores (2012), estudiaron la estabilidad de la enzima PPO extraída de 6 cultivares de yuca a un rango de pH entre 2.0 a 11.0 y encontraron que dependiendo del sustrato y el cultivar la actividad variaba entre 0 a 45% de actividad relativa a pH 2.0. La temperatura del ensayo fue 30°C pero el tiempo de exposición no fue mencionado. En adición Mehrnoush y colaboradores (2012) reportaron que la PPO de mango presenta una actividad de 82% en un intervalo de pH de 3 a 6.

Se realizaron tratamientos utilizando soluciones de 0.25%, 0.5% y 1.0% de bisulfito de sodio y se observó que aún después de 30 minutos los resultados para la prueba de peroxidasa eran positivos. Debido a estos resultados se decidió combinar los tratamientos y aplicarlos a las pulpas. El bisulfito de sodio pertenece a la categoría de los agentes reductores. Estos actúan como inhibidores competitivos contra los sustratos (compuestos fenólicos) por el sitio activo de la enzima y reduciendo las quinonas para formar compuestos estables no coloreados. Los resultados obtenidos después de aplicar los tratamientos con bisulfito de sodio y ácido cítrico muestran las diferencias existentes entre las pulpas de los farináceos. En la Tabla 5, se puede observar que el tratamiento D desactivó las enzimas en los tubérculos evaluados a los dos minutos de exposición. El tratamiento C fue efectivo al mismo tiempo de exposición solo para yuca. Los tratamientos A y B no fueron efectivos en desactivar las enzimas durante el tiempo de

exposición para ninguno de los tubérculos. Una posible explicación puede ser que en la pulpa de yuca los compuestos fenólicos se encuentren a una menor concentración en comparación con las otras pulpas probadas. Aunque el tratamiento C demostró ser efectivo para la pulpa de yuca se seleccionó solo el tratamiento D y aplicó a todas las pulpas durante la molienda húmeda para mantener uniformidad durante el proceso de extracción del almidón.

4.2 Caracterización de almidón

Propiedades físicas del almidón

Es de conocimiento que la morfología, tamaño y la distribución de tamaño del gránulo de almidón dependen de la fuente de procedencia. En las Figuras 10, 11, 12 y 13 se agrupan las micrografías obtenidas para los gránulos de almidón de yautía, ñame, yuca y batata, respectivamente, después de su observación microscópica utilizando la técnica diferencial de interferencia y luz polarizada. En estas figuras se pueden observar que existen diferencias en forma y tamaño entre los gránulos de almidón de la misma fuente. En la Tabla 6 se resume la información relacionada al tamaño, temperatura de gelatinización y color presentados por los almidones.

Yautía

Los gránulos (Figura 10a) muestran forma esférica y esférica-truncada (como si hubiesen recibido cortes en direcciones aleatorias, en uno de sus extremos). Al ser observados bajo luz polarizada presentaron el fenómeno de birrefringencia evidente por la formación de la cruz de malta (cruz blanca sobre un fondo negro). Indicando que los gránulos no recibieron ningún daño por el método de extracción usado y conservan su organización granular. Se puede observar una disposición de las capas de las moléculas de amilosa y amilopectina de origen céntrico con hendidura simple o puntiforme. El diámetro medio en los gránulos de almidón fue de 9 μm con un valor mínimo de 5 μm y un valor máximo de 8 μm .

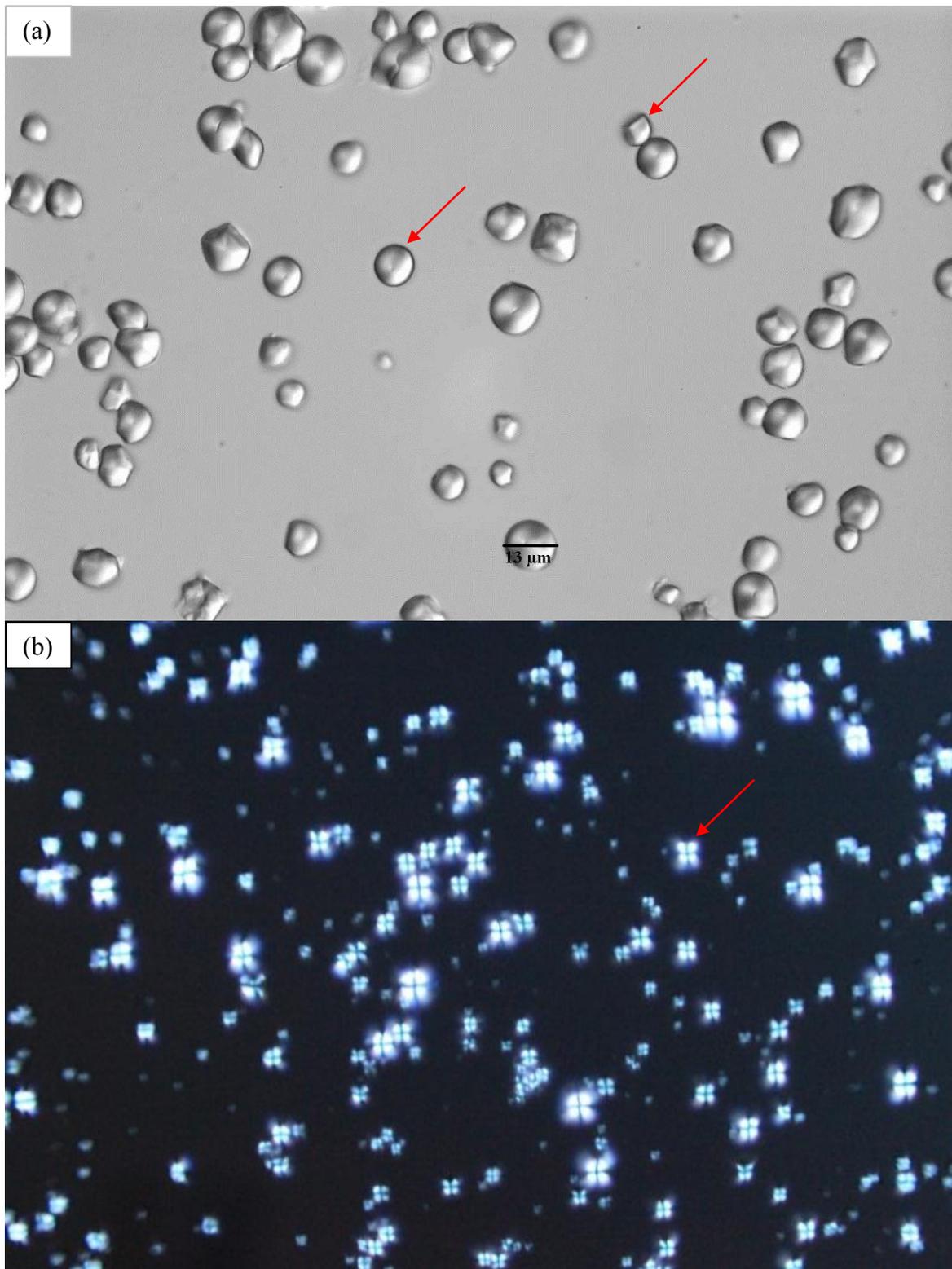


Figura 10- Micrografías de almidón de yautía: (a) microscopía a contraste interferencial diferencial “Normasky” y (b) microscopía en luz polarizada (nótese la cruz de malta sobre un fondo oscuro).

Este intervalo permite una distribución de los gránulos dentro las categorías de tamaño entre pequeño y mediano, prevaleciendo los gránulos pequeños con un porcentaje de 74.19%. La temperatura de gelatinización fue determinada mediante calorimetría de barrido diferencial, lo cual envuelve la ruptura del gránulo al someterlo a un rango de temperatura en exceso de agua con la subsecuente pérdida de birrefringencia. A partir de los termogramas se calculó la temperatura de gelatinización con un valor de 78°C.

Ñame

Los gránulos presentan formas aproximadas a una elipse y a una pirámide con los extremos redondeados. Se puede apreciar la presencia de anillos que siguen un patrón de crecimiento excéntrico alrededor del hilio a partir del cual se desarrolla el gránulo (Figura 11a) y la presencia de birrefringencia (Figura 11b). Indicando que la disposición radial y ordenada de las moléculas de almidón no han sufrido daños a través del método de extracción utilizado. Los tamaños de los gránulos se hallaron en el intervalo de 13-36µm con un tamaño medio de 24µm. El intervalo de tamaño permite la categorización de estos almidones en grandes y medianos, predominando los almidones grandes en un porcentaje de 71.43%. La temperatura de gelatinización fue 80°C.

Yuca

En similitud con el almidón de yautía, los gránulos del almidón de yuca, al ser observados al microscopio, presentaron las formas esférica y esférica-truncada. Se puede visualizar claramente un patrón birrefringente y la presencia de un proceso de crecimiento céntrico alrededor del hilio con aspecto hendido multiforme o puntiforme. Los tamaños de los gránulos se hallaron en el intervalo de 6-19µm con un tamaño medio de 14µm. El intervalo de tamaño permite la categorización de estos almidones en medianos y pequeños, predominando los almidones medianos en un porcentaje de 84.21%. La temperatura de gelatinización fue 65°C.

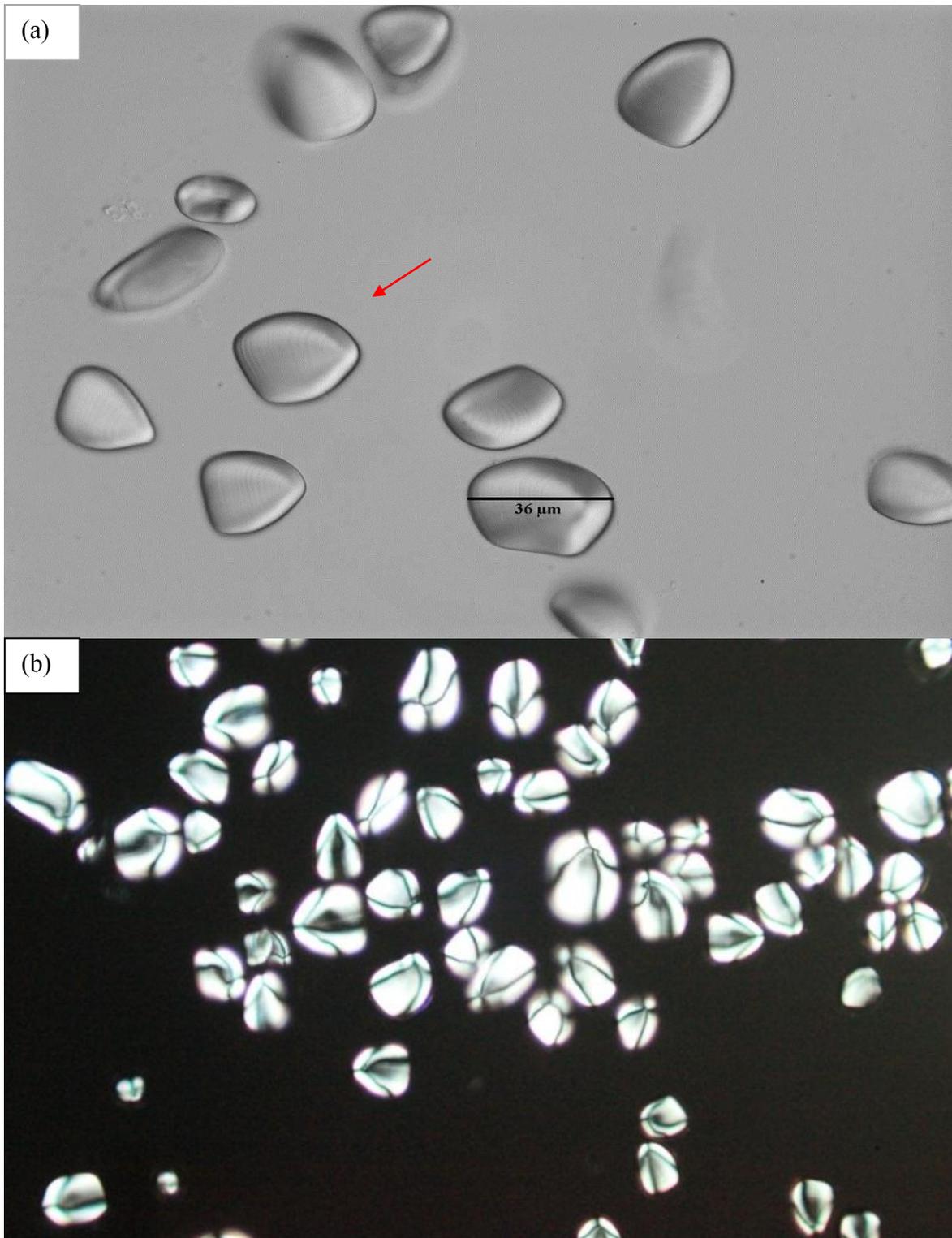


Figura 11- Micrografías de almidón de ñame: (a) microscopía a contraste interferencial diferencial “Normasky” y (b) microscopía en luz polarizada (nótese la cruz de malta sobre un fondo oscuro).

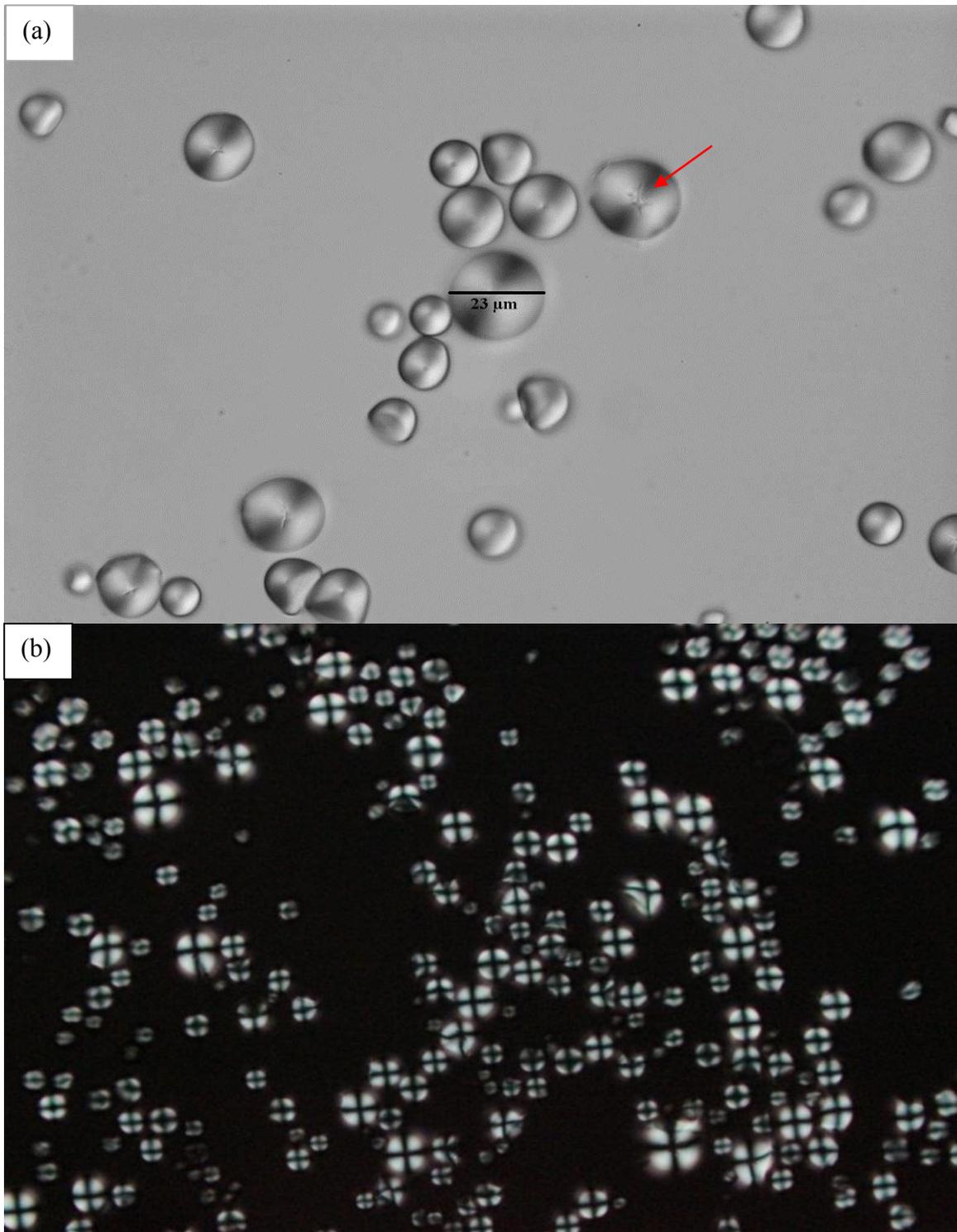


Figura 12- Micrografías de almidón de yuca: (a) microscopía a contraste interferencial diferencial “Normasky” y (b) microscopía en luz polarizada (nótese la cruz de malta sobre un fondo oscuro).

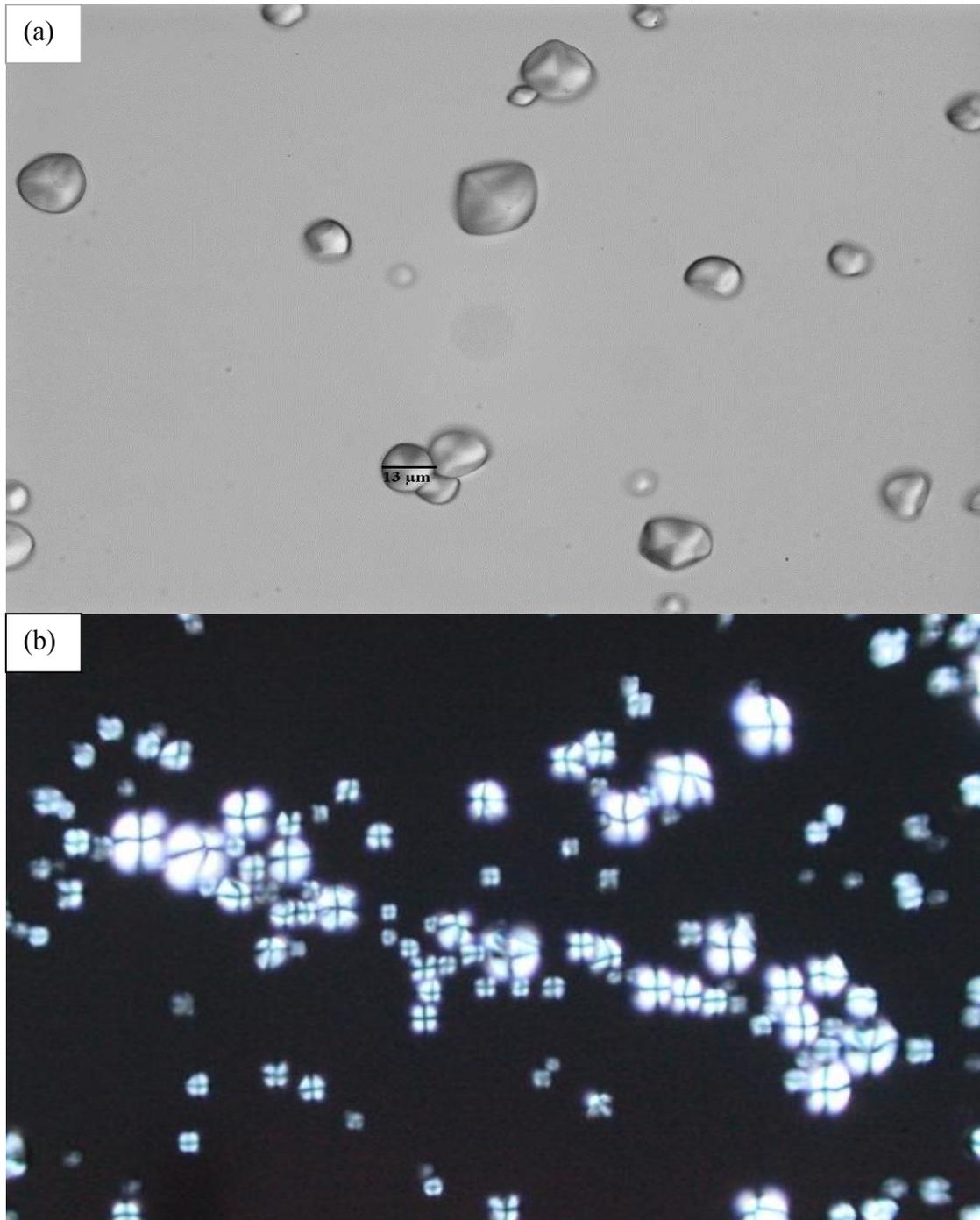


Figura 13- Micrografías de almidón de batata: (a) microscopía a contraste interferencial diferencial “Normasky” y (b) microscopía en luz polarizada (nótese la cruz de malta sobre un fondo oscuro).

Batata

Los gránulos observados bajo el microscopio presentan formas esférica y esférica-truncada. Se puede observar que el almidón conserva su propiedad de birrefringencia al formar la cruz de polarización reflejando ausencia de daño en la integridad del mismo mediante el proceso de extracción usado. El tamaño de los gránulos fluctuó en el intervalo de 6-18 μm con un tamaño medio de 10 μm . El intervalo de tamaño permite la categorización de estos almidones en pequeños y medianos, predominando los almidones pequeños en un porcentaje de 63.16%. La temperatura de gelatinización fue 76°C.

Tabla 6- Resumen de los datos obtenidos de las propiedades físicas de almidones.

Parámetro	Farináceo			
	Yautía	Ñame	Yuca	Batata
Tamaño promedio (μm)	9 \pm 3.28	24 \pm 5.41	14 \pm 3.62	10 \pm 3.23
Tamaño mínimo (μm)	5	13	6	6
Tamaño máximo (μm)	8	36	19	18
Categorías de tamaño (%)				
grandes (>25 μm)	0.00	28.57	0.00	0.00
medianos (10-25 μm)	25.81	71.43	84.21	36.84
pequeños (5-10 μm)	74.19	0.00	15.79	63.16
muy pequeños (< 5 μm)	0.00	0.00	0.00	0.00
Tg (°C)	78	80	65	76
Color				
L*	93.64 \pm 1.75a	93.83 \pm 0.47ab	96.15 \pm 0.16ab	95.89 \pm 0.03b
a*	-0.03 \pm 0.01a	-0.09 \pm 0.02b	-0.09 \pm 0.01b	-1.13 \pm 0.01c
b*	1.10 \pm 0.02a	2.99 \pm 0.05a	1.07 \pm 0.01b	2.65 \pm 0.02c
IP	6.36 \pm 1.75a	6.17 \pm 0.47ab	3.85 \pm 0.16ab	4.11 \pm 0.03b
IB	93.50 \pm 1.72a	93.14 \pm 0.42a	96.01 \pm 0.15ab	94.98 \pm 0.02b
IA	1.67 \pm 0.05a	4.55 \pm 0.07a	1.59 \pm 0.02b	3.95 \pm 0.02c

Índice de luminosidad (L*); Índice de longitud de onda predominante para colores rojo y verde (a*); Índice de longitud de onda predominante para colores amarillo y azul (b*); Índice de pardeamiento (IP); Índice de blanco (IB); Índice de amarillo (IA); Temperatura de gelatinización (T_g). Letras diferentes en una misma fila indica diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

Uno de los atributos físicos de importancia del almidón es su color. Para evaluar el color de los polvos de almidón se utilizaron tres índices de color: índice de pardeamiento (IP), índice de blanco (IB) e

índice de amarillo/azul (IA). Después de obtener los valores de los parámetros de color en el sistema CIELAB, estos se emplearon para calcular los índices de interés. A continuación se presenta la ecuación usada para calcular el IP (Jimoh et al., 2009), IB (Palomino et al., 2010; Chin-Lin et al., 2003) e IA (Ramírez-Navas, 2010) junto a un diagrama que representa el espacio vectorial de color de la escala CIELAB (Cassasa y Sari, 2006) (Figura 14).

$$IP= 100-L^*$$

Ecuación (8)

$$IB= 100- ((100-L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

Ecuación (9)

$$IA= 142.86 * (b^*/L^*)$$

Ecuación (10)

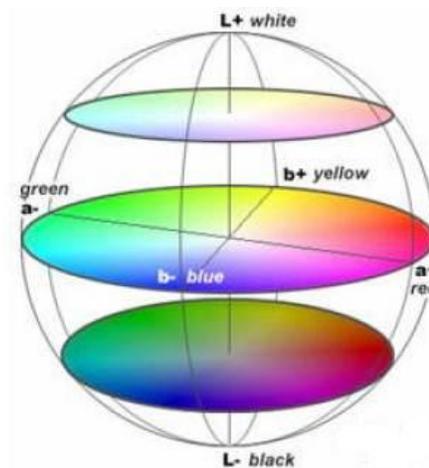


Figura 14- Espacio de color

El parámetro L^* representa el índice de luminosidad con un valor máximo de 100 (blanco) y un valor mínimo de 0 (negro). El parámetro a^* mide los colores de rojo (+) a verde (-), y el cero es neutro. El parámetro b^* mide los colores de amarillo (+) a azul (-), y el cero es neutro. La intensidad de los colores que mide a^* y b^* tiene un valor máximo de 60, de esta manera los colores se representan en el espacio a unas distancias proporcionales a las diferencias visuales entre ellos (Ramírez-Navas, 2010).

En la Tabla 6 se puede observar que los valores de L^* obtenidos fueron 93.64, 93.83, 96.15 y 95.89 para yautía, ñame, yuca y batata, respectivamente. Estos valores reflejan una alta luminosidad. El índice de pardeamiento fue relativamente bajo con valores de 6.36, 6.17, 3.85 y 4.11 para yautía, ñame, yuca y batata, respectivamente. Los valores de a^* están cercanos a cero, midiendo un color prácticamente neutral. Los compuestos coloreados que se desarrollan durante las reacciones de pardeamiento incluyen tonos que van de marrón a rojo. Estos resultados corroboran la efectividad del tratamiento antipardeamiento seleccionado en inhibir la formación de tales compuestos.

La fuente de procedencia tiene un efecto significativo en los parámetros de color del almidón. La tendencia a una apariencia de color blanco reflejada por el valor de L^* antes mencionado es más influenciada por los valores de b^* . El índice de amarillo/azul (IA) indica el grado en que la superficie del almidón es diferente del blanco ideal. Cuando la diferencia desde el blanco ideal incrementa el IA lo hace también. De esta manera, si el valor aumenta en la escala positiva indica diferencia hacia el amarillo y si lo hace hacia la escala negativa indica diferencia hacia el azul. Los valores de b^* fluctuaron entre 1.10 y 2.99. Presentando el valor más bajo yautía y el más alto el ñame. Los valores de IA se hallaron en un rango de 1.59 a 4.55. Los almidones que presentaron una desviación mayor hacia el color amarillo fueron el de ñame con un IA de 4.55 y batata con un IA de 3.95. Los valores de IB fueron 93.50, 93.14, 96.01 y 94.98 para yautía, ñame, yuca y batata, respectivamente. Se puede observar que el almidón con una apariencia total más blanca es el almidón de yuca con valor de $IB=96.15$ y un $IA=1.59$.

Uno de los procesos usados para mejorar el color blanco del almidón es la oxidación con hipoclorito de sodio. García y colaboradores (2011), aplicaron un proceso de blanqueado usando hipoclorito de sodio hasta obtener una concentración de 3% de cloro residual para mejorar la blancura en el almidón nativo de plátano para su aplicación en la elaboración de empaques biodegradables. Ellos lograron una mejoría en la apariencia obteniendo valores de $L^*=94.7$, $a^*=0.28$ y $b^*=5.74$. Al comparar con nuestros resultados se puede observar claramente que sin necesidad del tratamiento con hipoclorito se obtuvieron valores de L^* comparables y valores de a^* y b^* menores.

Composición química del almidón

La Tabla 7, muestra la composición química de los almidones de yautía, ñame, yuca y batata. Los almidones presentaron diferencias estadísticas significativas ($p<0.05$) en el contenido de los parámetros evaluados en el análisis proximal y en la cantidad de amilosa total. El contenido de proteína varió entre 0.02% y 0.11%, y fue similar en el almidón de ñame y batata, teniendo la yuca el valor mayor. El contenido de grasa estuvo entre 0.11% y 0.54%. Según el análisis estadístico hubo similitud entre yautía (0.54%) y ñame (0.43%) obteniendo los valores más altos. Los almidones de batata y ñame presentan

más cantidad de cenizas en comparación con los almidones de yuca y yautía. El almidón de ñame tuvo el valor mayor de cenizas (0.24%) y no hubo diferencias entre el almidón de yautía y yuca. El almidón de ñame presentó el valor de humedad mayor (15.39%) y el almidón de yuca el valor menor (10.32%). El contenido de amilosa presente en el almidón de ñame (18.27%) y yuca (16.05%) resultó ser menor al compararlos con el de yautía (23.42%) y batata (25.40%). Estos últimos se pueden clasificar como almidones normales de acuerdo a su porcentaje de amilosa. En la literatura se ha reportado que almidones nativos con mayor temperatura de gelatinización, indica una mayor estabilidad interna granular la cual está generalmente asociada a un mayor contenido de amilosa y zonas semicristalinas (Alvis et al. 2008).

Tabla 7- Resumen de la composición química de almidones.

Parámetro (%)	Farináceo			
	Yautía	Ñame	Yuca	Batata
*Proteína	0.00±0.00a	0.03±0.01b	0.11±0.02c	0.02±0.00ab
Grasa	0.54±0.03b	0.43±0.03b	0.11±0.10a	0.27±0.05a
Ceniza	0.06±0.02a	0.24±0.02c	0.06±0.01a	0.17±0.01b
Humedad	13.68±0.04b	15.39±0.33c	10.32±0.04a	15.02±0.02c
Fibra	nd	nd	nd	nd
**Carbohidratos	85.72±0.01c	83.91±0.32a	89.40±0.07d	84.53±0.05b
Amilosa aparente	23.42±1.32b	18.27±1.29a	16.05±0.35a	25.40±1.3b

No detectable por el método usado (nd); *N x 6.25; **Se calculo por diferencia; Los resultados se han reportado como la media aritmética de tres determinaciones ± error estándar. Letras diferentes en una misma fila indica diferencias estadísticas significativas (P<0.05).

Esta tendencia se puede observar en los almidones de yuca, yautía y batata con temperaturas de gelatinización de 65°C, 76°C y 78°C respectivamente; presentando similitud en el contenido de amilosa batata y yautía, teniendo la yuca el contenido menor de amilosa. Sin embargo el almidón de ñame tuvo un contenido de amilosa similar al de yuca pero presentó mayor temperatura de gelatinización (80°C). Al comparar el tamaño promedio del almidón de yuca y ñame, se puede observar que el almidón de ñame es

relativamente grande. Se presume que el tamaño ejerce una influencia en la estabilidad granular del almidón de ñame reflejado en una mayor temperatura de gelatinización.

Tabla 8- Composición química de almidón de tubérculos reportados en la literatura.

Parámetro %	Yautía*	Yautía[§]	Ñame^{1^u}	Ñame^{2^u}	Ñame^{3^u}	Ñame^{4^u}	Yuca*	Batata*
Proteína	0.16	0.10	0.10	0.28	0.13	0.49	0.06	0.22
Grasa	0.19	1.00	0.00	0.00	0.06	0.06	0.20	0.31
Ceniza	0.12	0.10	0.39	0.36	0.45	0.69	0.29	0.26
Fibra	0.35	0.40	0.00	0.00	0.00	0.00	1.01	0.28
Amilosa	23.60	22.40	27.89	27.55	25.87	25.95	17.00	19.60

*Hernández et al. 2008; [§]Torruco et al. 2007; ^u Alvis et al. 2008:1Boañero, 2Diamante 22, 3Ecuatoriano y 4Pico de botella.

En la Tabla 8 se resume la composición química de algunos trabajos realizados en el almidón de yautía, ñame, yuca y batata. Al comparar con los resultados obtenidos en esta investigación, se puede observar que los valores obtenidos en el contenido de amilosa son similares, excepto para el almidón de ñame que fue mucho menor. De igual manera se pueden observar que se presentan similitudes y diferencia entre los otros parámetros asociados al origen botánico, variedad y método de extracción utilizado.

4.3 Evaluación de las propiedades mecánicas (fuerza tensil y elongación) y de permeabilidad al vapor de agua.

En la formulación de las láminas comestibles se utilizó almidón como material polimérico base. Al ser procesado en exceso de agua y a temperaturas adecuadas es capaz de producir una solución filmogénica que permite la formación de una matriz preformada delgada (lámina comestible). Las láminas a base de almidón se distinguen por presentar poca flexibilidad y una alta fragilidad. En la práctica se hace necesaria la incorporación de un agente plastificante a la formulación cuyo objetivo principal es asegurar la flexibilidad de la lámina y reducir su fragilidad. En esta investigación se utilizó glicerol para conseguir dicho objetivo. El glicerol tiene tres grupos hidroxilos y un tamaño adecuado que

le permite entrar e interactuar con las cadenas poliméricas del almidón que forman la lámina (Bajpai et al., 2011). Las interacciones reducen la formación de enlaces de hidrógeno entre las moléculas del almidón debilitando las fuerzas intermoleculares entre el polímero. De esta manera aumentan los espacios intermoleculares causando un incremento en las propiedades flexibles del material con una disminución de su rigidez. Al aumentar el volumen libre se ha observado además que la eficiencia de barrera al vapor de agua en las láminas disminuye y se obtienen valores menores de fuerza tensil (Talja et al., 2008). Es por esto que es importante elegir cuidadosamente la cantidad de glicerol o cualquier otro plastificante que se desee utilizar para promover la flexibilidad en las láminas sin comprometer significativamente la propiedad de barrera al vapor de agua y las propiedades mecánicas.

El diseño experimental para esta etapa de investigación fue pensado de manera que permitiera evaluar el efecto de la concentración de glicerol junto con otros dos factores en la formulación destinada para elaboración de láminas comestibles a base de almidón. Las observaciones del experimento factorial 4x4x3 dispuesto en un diseño de bloques completamente aleatorizado pueden describirse mediante el siguiente modelo lineal donde m es el número de bloques.

$$Y_{ijkm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + \alpha\beta\gamma_{ijk} + \epsilon_{ijkm} \quad i=1, 2, 3, 4; j=1, 2, 3, 4; k=1, 2, 3; m=1, 2$$

En el Apéndice se resumen los resultados del ANOVA realizado para cada variable respuesta junto con las pruebas realizadas para determinar la validez del análisis en términos de los supuestos que se asumen. En el caso de la variable % Elongación fue necesario aplicar una transformada logarítmica ya que los datos en la escala original no estaban en cumplimiento con los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas. En el Apéndice se explica en detalle los pasos que se siguieron para validar el análisis y se muestra cómo la transformada elegida es apropiada ya que permite cumplir con ambos supuestos. Una vez se validaron los resultados del análisis, se procedió a evaluar las interacciones de segundo orden, luego las de primer orden y los efectos principales de los factores.

Prueba de hipótesis sobre el efecto interacciones de segundo orden de los factores: Fuente de almidón-Cantidad de almidón-Concentración de glicerol.

H_0 : $\alpha\beta\gamma_{ijk} = 0$ para todo i, j, k

H_a : al menos uno ($\alpha\beta\gamma_{ijk} \neq 0$)

Con un valor de $p=0.9958$ para Fuerza tensil, $p=0.9343$ para % Elongación y $p=0.5952$ para Permeanza, se acepta la hipótesis nula y se concluye que el efecto de la interacción no es significativo.

Prueba de hipótesis sobre el efecto de interacciones de primer orden:

Fuente de almidón-cantidad de almidón

H_0 : $\alpha\gamma_{ik} = 0$ para todo i, k

H_a : al menos uno ($\alpha\gamma_{ik} \neq 0$)

Con un valor de $p= 0.1091$ para fuerza tensil y $p= 0.4258$ para % elongación se acepta la hipótesis nula. El valor de $p= 0.0018$ para permeanza permite rechazar la hipótesis nula y se concluye que el efecto de la interacción es diferente de cero, siendo significativo en esta variable respuesta. Por lo tanto, la permeanza promedio de la lámina comestible depende de la combinación fuente de almidón-cantidad de almidón. Entonces es conveniente realizar pruebas de diferencias entre las cantidades de almidón para una misma fuente. Se utilizó la prueba de Tukey para evaluar las diferencias.

Tabla 9- Prueba de Tukey para permeanza; interacción fuente de almidón-cantidad de almidón

Fuente de almidón	Almidón (g)			Totales CA
	1.0	2.5	4.0	
Batata	3.76 ^c	2.68 ^{ab}	2.41 ^a	8.85
Yautía	3.00 ^{abc}	3.23 ^{bc}	2.62 ^{ab}	8.85
Yuca	3.18 ^{abc}	2.82 ^{ab}	2.91 ^{ab}	8.91
Ñame	3.06 ^{abc}	2.68 ^{ab}	2.68 ^{ab}	8.42
Totales FA	13.00	11.41	10.62	35.03

Valores con letras diferentes, son diferentes significativamente ($p<0.05$); FA= fuente de almidón; CA= almidón (g)

Hay diferencias significativas entre batata-4g, yautía-2.5g, batata-1.0g. No hay diferencia significativa entre las demás combinaciones. Batata con 4 g es la combinación que presenta la permeanza menor y difiere significativamente si se usa con 1g (peor condición). Ñame y yuca presentan menor permeanza cuando se usan 4 y 2.5g. Yautía con 4g presenta menor permeanza y difiere significativamente si usa a 2.5g. Talja y colaboradores (2008), hacen referencia al estudio de Alves y colaboradores (2007) para exponer que se ha reportado en la literatura que las diferencias en la composición química del almidón pueden influenciar la propiedad de barrera al vapor de agua en las láminas comestibles en términos del contenido de amilosa. Talja y colaboradores (2008) estudiaron las propiedades de barrera en láminas a partir de diferentes variedades de papas cuyo contenido de amilosa varió entre 11.9 a 20.1% y, al igual que en este trabajo de investigación las diferencias de barrera al vapor de agua no pueden explicarse en base al contenido de amilosa, debido a que almidones con contenido de amilosa diferente mostraron similitud en los valores de permeanza. Esto indica que los otros componentes en la composición química del almidón pudiesen afectar en menor grado la permeanza. Además se puede observar por los totales de la fila que el efecto en la permeanza refleja una tendencia; cuando se aumenta la cantidad de almidón disminuye (Tabla 9).

Fuente de almidón-concentración de glicerol

$H_0: \alpha\beta_{ij} = 0$ para todo i, j

$H_a: \text{al menos uno } (\alpha\beta_{ij}) \neq 0$

Con un valor de $p= 0.7862$ para fuerza tensil, $p= 0.7457$ para % elongación y $p= 0.7570$ para permeanza no hay suficiente evidencia para rechazar la hipótesis nula y se concluye que el efecto de la interacción no es significativo en las variables respuesta.

Cantidad de almidón-concentración de glicerol

$H_0: \beta\gamma_{jk} = 0$ para todo j, k

$H_a: \text{al menos uno } (\beta\gamma_{jk}) \neq 0$

Con un valor de $p= 0.7861$ para % elongación y $p= 0.6686$ para permeanza se acepta la hipótesis nula. El valor de $p= 0.0039$ para fuerza tensil permite rechazar la hipótesis nula y se concluye que el efecto de la interacción es significativo en esta variable respuesta. Es decir que la fuerza tensil promedio de la lámina comestible depende de la combinación cantidad de almidón-concentración de glicerol. Entonces es conveniente realizar pruebas de diferencias entre las concentraciones de glicerol para una cantidad de almidón. Para esto se utilizó la prueba de Tukey.

Tabla 10- Prueba de Tukey para fuerza tensil; interacción cantidad almidón-concentración glicerol

Almidón (g)	Concentración de glicerol %				Totales CG
	0	10	20	30	
1.0	15.98 ^{cdef}	13.31 ^{bcde}	6.98 ^{abc}	2.48 ^a	38.75
2.5	22.29 ^{ef}	20.46 ^{def}	15.35 ^{cdef}	5.72 ^{ab}	63.82
4.0	32.96 ^g	23.78 ^{fg}	11.18 ^{abcd}	5.12 ^{ab}	73.04
Totales CA	71.23	57.55	33.51	13.32	175.61

Valores con letras diferentes, difieren significativamente ($p<0.05$); CA= almidón (g); CG= concentración de glicerol.

En la Tabla 10 se nota que cuando se usa 1g de almidón con 30% de glicerol se manifiesta la peor condición; obteniendo en promedio el valor de fuerza tensil más bajo en las láminas. Al utilizar 4g de almidón en ausencia de glicerol se obtiene el valor promedio mayor de fuerza tensil en las láminas y difiere significativamente si se usa a 20% ó 30%. Se puede observar que cuando no se utilizó glicerol en la formulación las láminas comestibles presentaron mayor resistencia obteniendo los valores de fuerza tensil mayores. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Oses y colaboradores (2009) quienes evaluaron esta variable respuesta en láminas a base de almidón de papa utilizando 5 niveles de glicerol en su formulación (0, 10, 20, 30 y 40%). Ellos además observaron la misma tendencia que se observa en la Tabla 10 al comparar los totales: al aumentar la concentración de glicerol la fuerza tensil disminuye. En términos de la tendencia del efecto de la cantidad de almidón se puede apreciar que su aumento en la formulación aumenta la resistencia de las láminas.

Prueba de hipótesis sobre el efecto de los factores principales:

Fuente de almidón

$$H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = 0$$

$$H_a: \text{al menos un } \alpha_i \neq 0$$

Cantidad de almidón

$$H_0: \gamma_1 = \gamma_2 = \gamma_3 = 0$$

$$H_a: \text{al menos un } \gamma_i \neq 0$$

Concentración de glicerol

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_3 = \beta_4 = 0$$

$$H_a: \text{al menos un } \beta_i \neq 0$$

Fuerza tensil

Con un valor de $p=0.8758$ se acepta la hipótesis nula y se concluye que el efecto del factor fuente de almidón no es significativo. Con un valor de $p<0.0001$ y $p<0.0001$ para cantidad de almidón y concentración de glicerol respectivamente, se rechaza la hipótesis nula. Hay suficiente evidencia para decir que estos factores ejercen un efecto significativo en la fuerza tensil promedio de las láminas comestibles el cual fue explicado en términos de la interacción de primer orden cantidad de almidón-concentración de glicerol.

%Elongación

Con un valor de $P=0.1394$ se acepta la hipótesis nula y se concluye que el efecto del factor fuente de almidón no es significativo. Con un valor de $p=0.0151$ y $p<0.0001$ para cantidad de almidón y concentración de glicerol respectivamente, se rechaza la hipótesis nula. Hay suficiente evidencia para decir que estos factores ejercen un efecto significativo en el % elongación promedio de las láminas comestibles.

Tabla 11- Prueba de Tukey para efecto de cantidad de almidón y concentración de glicerol

Cantidad de almidón (g)	% Elongación
1.0	2.00 ^a
2.5	2.07 ^{ab}
4.0	2.47 ^b
Glicerol %	% Elongación
0.0	1.70 ^a
10.0	1.68 ^a
20.0	2.04 ^a
30.0	3.29 ^b

Valores en la misma con letras diferentes indican diferencias significativas, p (<0.05)

Si se usan 4.0g de almidón se obtiene el valor de % elongación mayor y difiere significativamente si se usa 1.0g. Utilizando 30% de glicerol se obtiene mayor % de elongación promedio y este difiere significativamente si se usan las demás concentraciones.

Permeanza

Con un valor de $p=0.5876$ se acepta la hipótesis nula y se concluye que el efecto del factor fuente de almidón no es significativo. El efecto principal de este factor está opacado por la interacción de primer orden fuente de almidón-cantidad de almidón. El efecto global depende de la combinación de los dos factores, así que su efecto no puede ser descartado ya que si se usa en combinación con una cantidad de almidón da mejores resultados. Con un valor de $p<0.0001$ y $p<0.0006$ para cantidad de almidón y concentración de glicerol, respectivamente, se rechaza la hipótesis nula. Hay suficiente evidencia para decir que estos factores ejercen un efecto significativo en la permeanza promedio de las láminas comestibles. El efecto de la cantidad fue explicado en términos de la interacción fuente de almidón-cantidad de almidón. Para el efecto de la concentración de glicerol se realizaron las comparaciones de medias y se presentan el resultado a continuación.

Tabla 12- Prueba de Tukey para el efecto de concentración de glicerol en la permeanza

Glicerol %	Permeanza
0.0	3.20 ^b
10.0	2.71 ^a
20.0	2.72 ^a
30.0	3.05 ^{ab}

Valores en la misma con letras diferentes indican diferencias significativas p (<0.05)

Se puede observar que ejerciendo su efecto de manera independiente el utilizar glicerol en la formulación mejora la propiedad de permeanza al vapor de agua en láminas comestibles. Se obtiene el valor menor de permeanza usando 10% y difiere significativamente si no se usa glicerol. Se puede observar además que añadir glicerol es bueno, pero el exceso es igual de malo que no utilizarlo.

Resumiendo, se observó que al aumentar la cantidad de almidón se mejoran las propiedades mecánicas y de barrera al vapor de agua de la lámina y es por esto que se decidió utilizar 4.0g de almidón en la formulación. Se descartó la posibilidad de utilizar el almidón de ñame como polímero base porque necesitaba más tiempo para disolverse y se requería de más cuidado durante su procesamiento en el laboratorio para controlar la formación de espuma. Las láminas a base de almidón de batata y yuca tuvieron una matriz homogénea con una apariencia más transparente que las láminas de yautía. El uso del almidón de yuca presentó la opción más adecuada por tener una temperatura de gelatinización menor (65°C) que permite obtener en un corto periodo de procesamiento la desintegración del almidón produciendo láminas homogéneas con buena transparencia. A parte de que la solución filmogénica aún a 50°C conserva una viscosidad manejable para la elaboración de láminas con la técnica de moldeado usada en el laboratorio; reduciendo el riesgo de exposición a altas temperaturas del bacteriófago que pudiesen comprometer su viabilidad. En términos de la concentración de glicerol utilizar 10 ó 20% provee relativamente el mismo grado de barrera al vapor de agua. Sin embargo, usar 10% no mejora la flexibilidad de las láminas. Si se desea notar un cambio positivo partiendo de la condición con ausencia

de glicerol es necesario agregar 20% de este agente plastificante a la formulación aunque esto implique sacrificar un poco la resistencia de la lámina para obtener una mejoría global.

4.4 Evaluación de la propiedad antimicrobiana

Por definición un cultivo puro es aquel que contiene una sola clase de microorganismos. Para corroborar la pureza del cultivo de *S. aureus* obtenido a través de la ATCC se realizó una tinción de Gram luego de reconstituir el mismo. Esta tinción, permitió visualizar las células bacterianas bajo el microscopio y su coloración diferencial. En la Figura 15a se puede apreciar que las células presentan una morfología esférica (cocos) y tienden a mantenerse unidas después de la división celular formando patrones que se denominan arreglos celulares. Se observan cocos solos, en cadenas y en ramilletes; predominando el arreglo celular en ramilletes. Los cocos que se agrupan en ramilletes definen el arreglo celular denominado estafilococos, el cual es característico de la bacteria utilizada en esta investigación y del cual recibe su nombre. Las células exhiben una coloración violeta distintivo de un resultado positivo a la tinción de Gram. Estas observaciones junto a la ausencia de otra coloración y morfologías celulares indican que el cultivo estaba conformado por un solo tipo de microorganismo: estafilococos Gram positivo. Con este resultado, solamente queda determinar si estos corresponden a *S. aureus* para validar la pureza del cultivo.

El medio de cultivo “Mannitol Salt Agar” es un medio selectivo y diferencial. El agente que lo hace selectivo es la sal cloruro de sodio (NaCl) que se encuentra en una alta concentración (7.5%). La mayoría de las bacterias no toleran el ambiente hipertónico que se genera en el medio por el alto contenido de sal y no sobreviven. Sin embargo las bacterias que pertenecen al género Estafilococos son halofílicas y crecen bien en este medio de cultivo. El medio contiene manitol como fuente de carbono y rojo fenol como indicador de pH, lo que permite la diferenciación entre bacterias patogénicas (*S. aureus*) y no patogénicas dentro de este género. La bacteria *S. aureus* cuando crece en este medio es capaz de fermentar el manitol con la subsecuente producción de ácidos orgánicos que acidifican el medio y son detectados por el indicador rojo de metilo ocasionando un cambio en color de rojo a amarillo en el medio.

En la Figura 15b se muestra el crecimiento de un estriado a partir del cultivo previamente reconstituido sobre la superficie de un plato Petri conteniendo “Manitol Salt Agar” (observar en el Apéndice 3 un plato Petri con medio sin inocular). Se puede observar, que hubo crecimiento acompañado de un cambio en color de rojo a amarillo en el medio debido a la fermentación del manitol típico de la bacteria *S. aureus*. Este resultado apoya la hipótesis de que el cultivo de la bacteria es puro.

De acuerdo a la Hoja de Información del Producto suministrada por la ATCC para el microorganismo, el crecimiento del mismo en el medio de cultivo “Trypcase Soy Agar” debe mostrar colonias con un color blanco cremoso y morfología circular con superficie convexa y bordes redondeados. Al crecer la bacteria en TSA se pudo confirmar la morfología de colonia descrita por ATCC y confirmar la pureza e identidad del cultivo reconstituido de *S. aureus*. Una vez confirmada la pureza del cultivo, se realizaron “stocks” y se almacenaron a - 80°C para los ensayos posteriores.

La Gráfica 1 muestra el crecimiento de *S.aureus* en “Trypticase Soy Broth” determinado por espectrofotometría cada 30 minutos, aproximadamente. En la Tabla 11 se resumen los recuentos (UFC/mL) de la batería estimados en cada punto de muestreo durante el tiempo estipulado por el cual se permitió su crecimiento. Los datos obtenidos permiten observar las fases de adaptación, exponencial y el inicio de la estacionaria. La curva se inició con una cantidad de células que arrojó una lectura de absorbancia de 0.022 (Tabla 11) muy cercana a la deseada (0.025). La población bacteriana permaneció en fase de adaptación aproximadamente cuatro horas. Luego comenzó la fase logarítmica con un tiempo de duración de diez horas para dar inicio a la fase estacionaria. El crecimiento se detuvo cuando se observó que la población entró en fase estacionaria ya que para esta investigación solamente era de interés la fase logarítmica para determinar el tiempo en que le toma a la población alcanzar la fase logarítmica temprana.

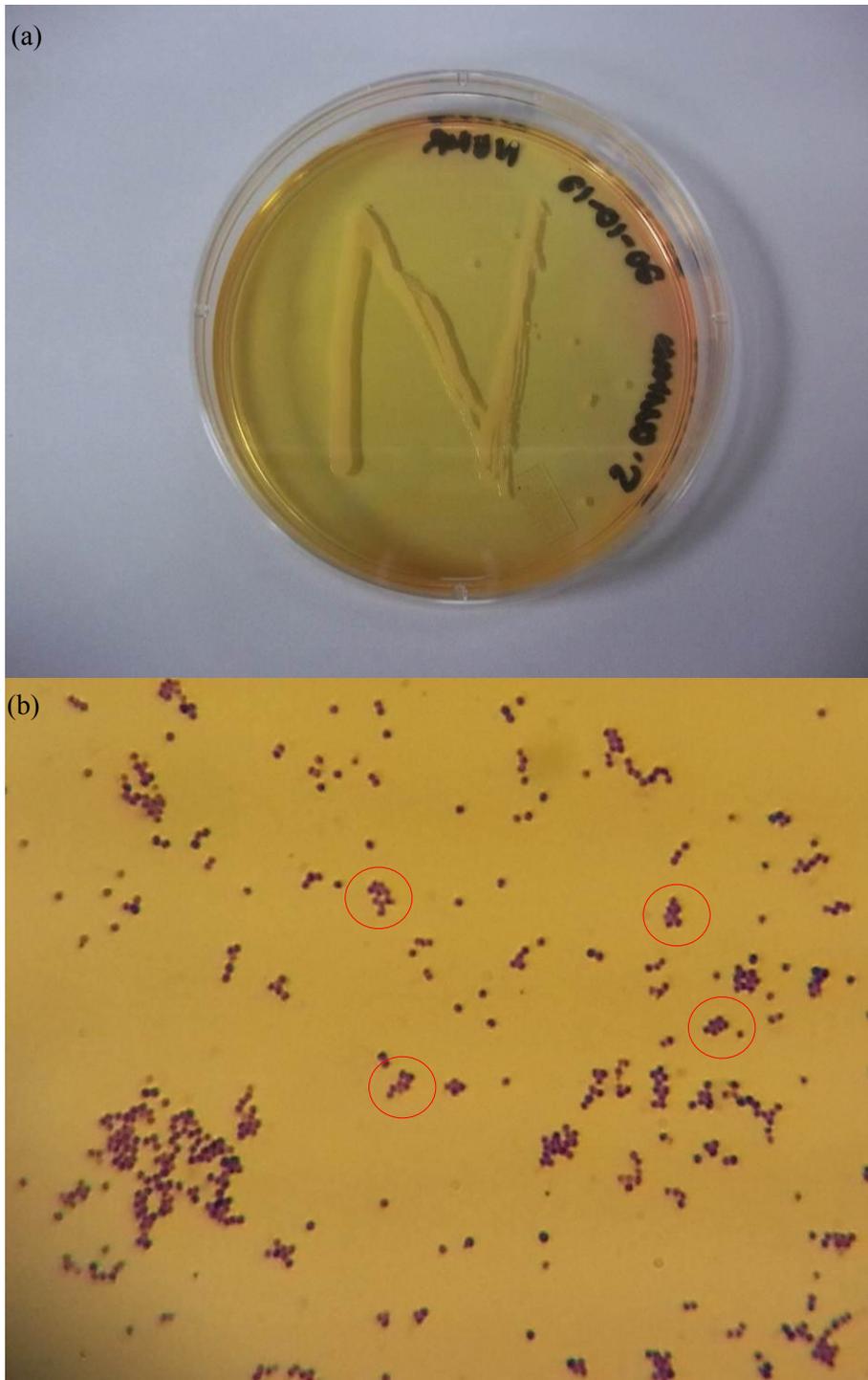
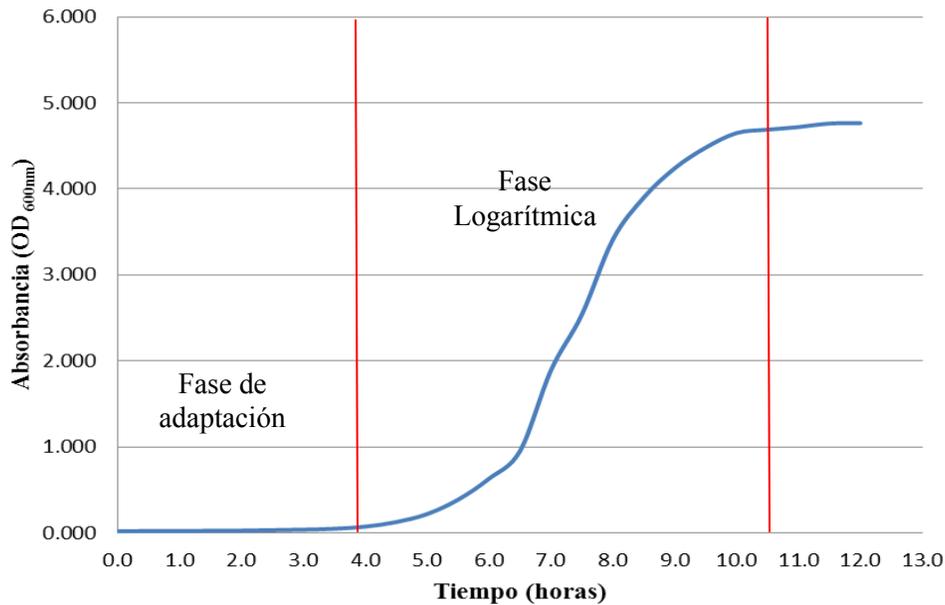


Figura 15- Crecimiento de *S. aureus* en “Mannitol Salt Agar” (a); Observación microscópica de *S. aureus* después de realizar una tinción de Gram (b).

Gráfica 1- Curva de crecimiento de *S. aureus* en “Tryptic soy broth”



Establecer la relación entre cantidad (UFC/mL) de bacterias y lectura de absorbancia permitió simplificar eventualmente el procedimiento al momento de propagar el fago y realizar las titulaciones de los lisados de fagos obtenidos. El lisado de fago obtenido a través de la ATCC y los obtenidos de las propagaciones se titularon usando un cultivo de bacteria hospedera en fase logarítmica temprana con una lectura de absorbancia de aproximadamente 0.50. Se obtuvo un título de 6.0×10^9 UFP/mL para el lisado obtenido de la ATCC.

Al observar los resultados de los ensayos de infectividad se pudo observar la formación de placas de lisis bien definidas y transparentes que sugieren una alta concentración de fagos presentes, por lo que se procedió a filtrar los lisados. El lisado obtenido de la propagación en plato (MOI = 0.0001) tuvo un título de 7.1×10^8 UFP/mL mientras que los títulos obtenidos en los lisados de las propagaciones en caldo fueron de 3.0×10^5 UFP/mL (MOI = 0.01) y 9.8×10^8 UFP/mL (MOI = 1), respectivamente. Estos resultados sugieren que la propagación en plato es más efectiva en multiplicar los fagos que la propagación en caldo. No obstante, la propagación en plato resulta en volúmenes considerablemente menores de lisados y requiere de mayor esfuerzo que la propagación en caldo.

Tabla 13- Absorbancia y número de microorganismos presentes en un tiempo dado.

Tiempo (hr)	Absorbancia (OD_{600nm})	Recuentos (UFC/mL)
0.0	0.020	544000
0.5	0.022	580000
1.0	0.022	990000
1.5	0.025	1080000
2.0	0.027	1210000
2.5	0.032	1410000
3.0	0.038	1420000
3.5	0.048	3600000
4.0	0.073	7300000
4.5	0.126	13700000
5.0	0.219	29000000
5.5	0.386	160000000
6.0	0.631	360000000
6.5	0.952	500000000
7.0	1.890	1070000000
7.5	2.540	1150000000
8.0	3.410	1870000000
8.5	3.900	2000000000
9.0	4.240	2190000000
9.5	4.480	3300000000
10.0	4.650	4400000000
10.5	4.690	4500000000
11.0	4.720	4700000000
11.5	4.761	nd*
12.0	4.764	nd*
*nd = No se determinó por estar en fase estacionaria y no ser de interés para esta investigación		

Los lisados filtrados se utilizaron en la prueba de esterilidad. Puesto que no se observó crecimiento bacteriano en esta prueba, se presume que los lisados no contenían bacterias que pudiesen interferir en los resultados de esta investigación. Por tanto, los lisados obtenidos de las propagaciones en caldo se usaron para elaborar las láminas antimicrobiales y el lisado obtenido de la propagación en plato se almacenó a 4°C para futuras propagaciones.

Para evaluar la interacción in vitro entre la bacteria *S. aureus* y las láminas comestibles antimicrobianas se realizaron antibiogramas por el método de difusión en agar. El método de difusión se basa en la distribución homogénea del agente antimicrobiano sobre un medio de cultivo sólido. El agente antimicrobiano se difunde por el agar creando un gradiente de concentración decreciente según se aleja del disco. Se espera que si la bacteria resulta susceptible al agente antimicrobiano, no crezca en las inmediaciones del disco y forme un halo de inhibición de tamaño proporcional al grado de sensibilidad de la bacteria al agente antimicrobiano.

En la Figura 16 se presentan los platos de la prueba de interacción, antes y después de la incubación. En la Figura 16b se puede observar que las láminas con los diferentes tratamientos se comportaron igual que el control y no mostraron inhibición. Aunque en la figura aparecen tres de los nueve platos de cada tratamiento, el comportamiento observado fue el mismo en las seis muestras restantes. Los resultados de esta prueba sugieren la ineffectividad del tratamiento según aplicado ya que el halo de inhibición no se formó a partir de los fagos contenidos en las láminas comestibles y la concentración de bacterias utilizada (10^3 ó 10^6 UFP/mL fagos versus 10^8 UFC/mL bacterias). Se presume que este resultado pudo ser motivado porque la razón de fagos a bacterias no es la apropiada o porque las láminas no permiten a los fagos la movilidad requerida para realizar su función.

Como se discutió anteriormente, una de las condiciones que debe prevalecer para que la terapia fágica sea exitosa es que, si el alimento va a ser tratado durante la fase de iniciación de la infección, debe haber una compensación empleando una dosis mayor de bacteriófagos. Considerando que los alimentos deben ser elaborados siguiendo las buenas prácticas de manufactura y tomando los controles de inocuidad apropiados, resulta evidente que la aplicación de láminas comestibles persigue controlar el efecto de microorganismos que entren en contacto con el alimento durante el manejo final del producto previo al empaque. El contacto de las bacterias con el alimento en estas etapas marcaría el momento de la infección y daría lugar a que dichos microorganismos comiencen sus procesos de crecimiento.

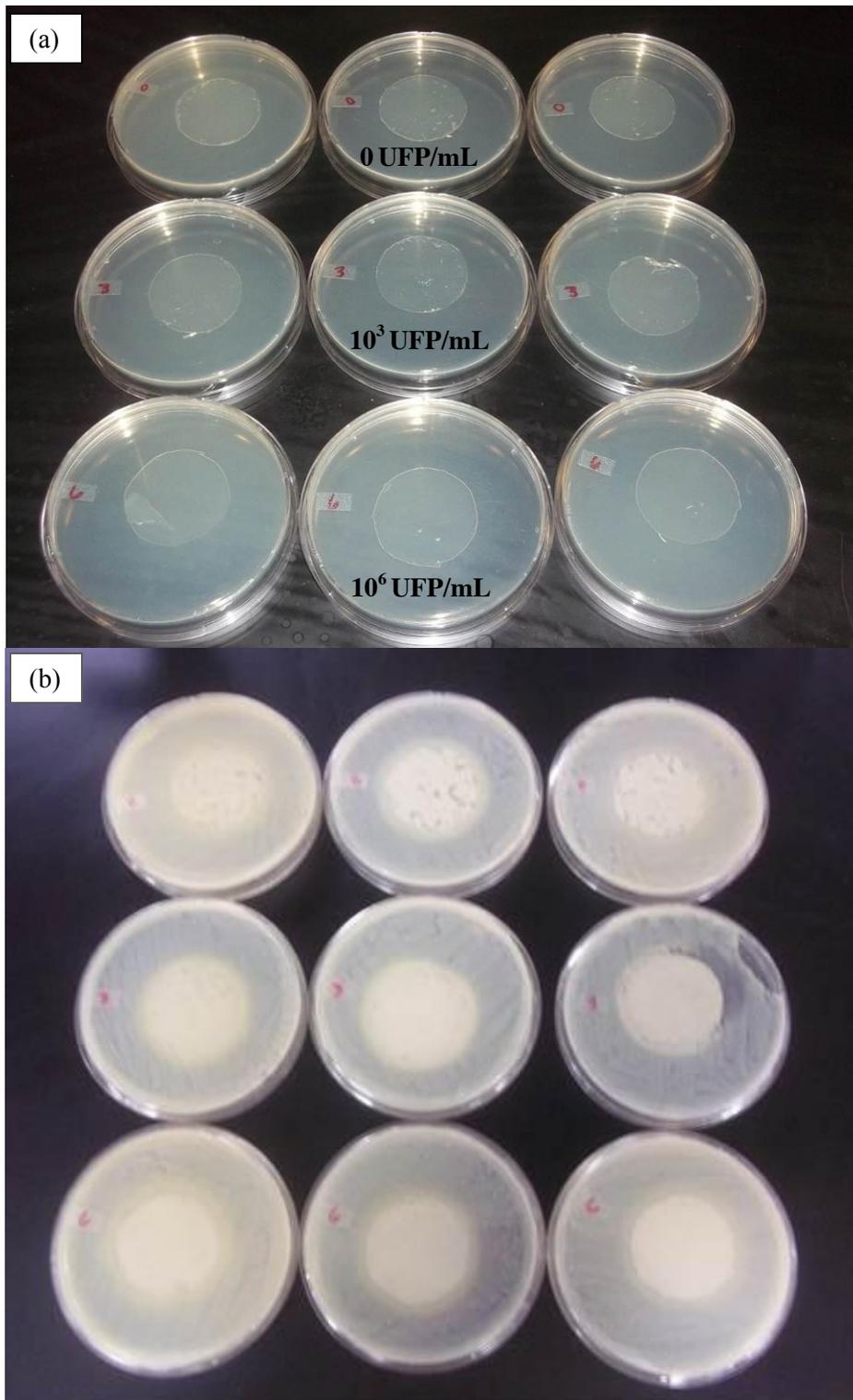


Figura 16- Evaluación de la propiedad antimicrobial: (a) platos preparados con las muestras antes de incubar y (b) platos preparados con las muestras después de incubar.

Se decidió, entonces, repetir el ensayo usando una concentración mayor de fago en el tratamiento designado para la concentración alta de fagos. Para el nuevo ensayo se evaluaron láminas con 0, 10^3 y 10^7 UFP/mL de solución filmogénica (versus 10^8 UFC/mL de bacterias) y se siguió el mismo procedimiento anterior. Las láminas elaboradas se evaluaron mediante titulación para corroborar que los fagos se encuentran en las concentraciones establecidas para cada tratamiento. Los resultados de las titulaciones fueron 0, 3.0×10^3 y 1.07×10^7 UFP/mL para el control, baja y alta concentración de fagos, respectivamente. Estos resultados indican que los fagos se incorporaron a la solución filmogénica y que la temperatura a la cual se adicionaron no afectó su viabilidad.

Cabe recalcar que en el experimento solamente se varió el título de la concentración alta del fago y todos los demás aspectos se mantuvieron constantes, incluyendo la concentración de bacterias. La intención de hacer esto fue asegurar que los resultados del control y la concentración baja de fagos eran iguales que en el ensayo anterior. Además, la concentración alta de fagos se elevó solamente de 10^6 a 10^7 , en vez de subirlo a 10^9 (que sería 10 veces más que la concentración de bacterias y hubiese realmente sido una dosis mayor). Esto se hizo debido a que se observó que las láminas aplicadas tendían a arrugarse a los pocos minutos de ser colocadas y que la cantidad o tamaño de la arruga parecía aumentar proporcionalmente a la concentración de fagos.

En la Figura 17 se muestran los platos Petri después del tiempo de incubación. El comportamiento entre las láminas del grupo control y aquellas conteniendo 10^3 UFP/mL fue similar, lo que valida tanto los resultados anteriores como la integridad de la metodología utilizada. Las láminas con 10^3 UFP/mL de fagos no fueron efectivas en inhibir el crecimiento bacteriano.

En los platos Petri con láminas conteniendo 10^7 UFP/mL se puede observar un comportamiento distinto. Se observan zonas claras sin crecimiento por debajo de las láminas, pero no hay halos de inhibición que se extiendan más allá de las áreas de contacto. La aparición de áreas de inhibición sugiere que aumentar la dosis de fagos tiene un efecto positivo en la efectividad de la terapia.

El método de difusión en agar ha sido empleado para estudiar la interacción in vitro de láminas comestibles conteniendo diferentes agentes antimicrobianos como extracto de “Kiam wood” (Chana et al.,

2011), aceite de *Cymbopogon citratus* (Maizura et al., 2007) y ácidos orgánicos (Manab et al., 2011) entre otros. Los estudios reportan que los agentes antimicrobianos migran a partir de las láminas y se difunden a través del medio sólido usado formando gradientes de concentración que definen halos de inhibición de crecimiento bacteriano. La ausencia de halos de inhibición apoya la hipótesis de que los fagos quedan inmobilizados en la matriz de las láminas comestibles o no tienen la capacidad de difundirse a través del agar.

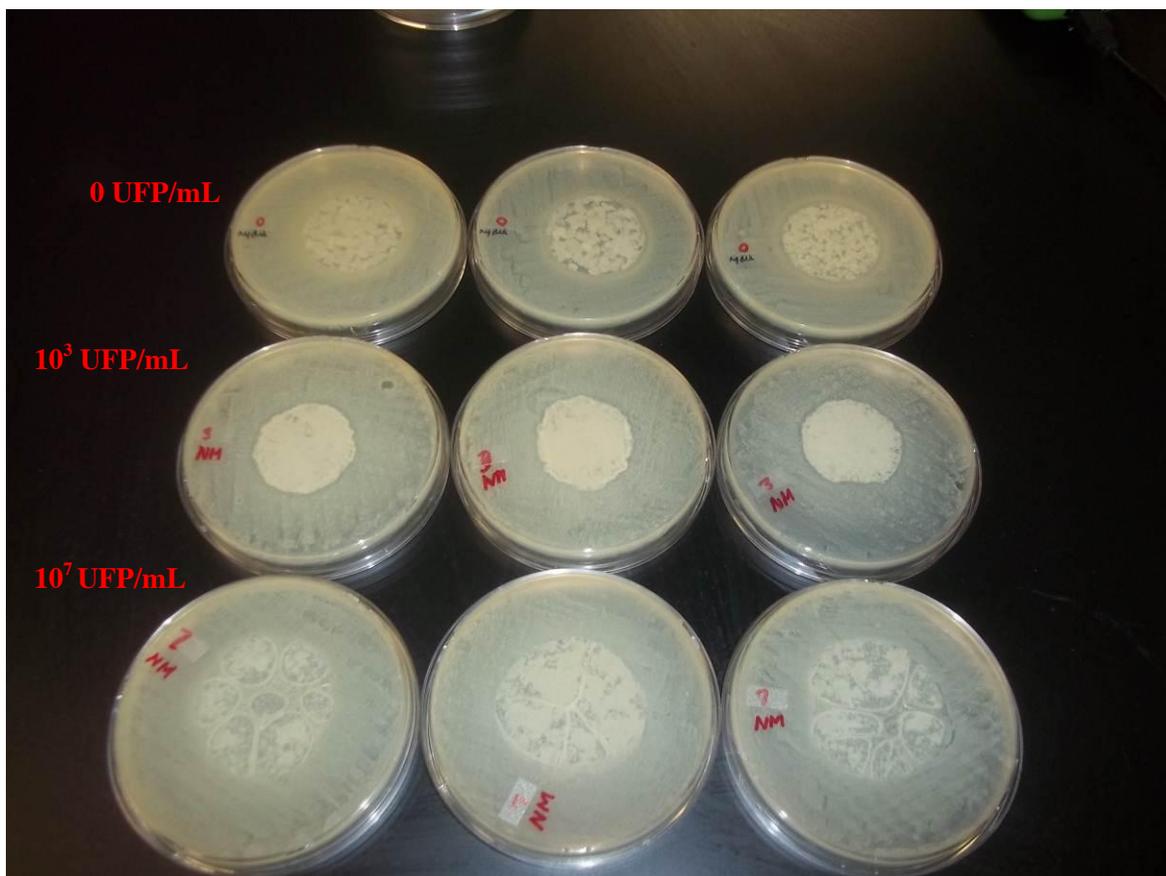


Figura 17- Ensayo antimicrobial usando una concentración alta de 10^7 UFP/mL

V. CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo, se pueden llegar a las siguientes conclusiones a partir de los datos obtenidos bajo las condiciones de investigación:

1. Los farináceos respondieron de manera distinta ante los tratamientos de desactivación enzimática aplicados. El tratamiento D desactivó las enzimas en los tubérculos evaluados a los dos minutos de exposición, el tratamiento C fue efectivo al mismo tiempo de exposición solo para yuca. Los resultados de los tratamientos A y B no fueron efectivos para ninguno de los tubérculos. Por lo tanto una solución de ácido cítrico al 1% con pH 2.27 sola o en combinación con concentraciones de bisulfito de sodio por debajo de 0.5% no desactivan las enzimas en 16 minutos.
2. Los almidones de yuca, ñame, batata y yautía bajo el microscopio mostraron formas e hilos característicos de cada uno, y bajo luz polarizada mostraron un patrón birrefringente. Por lo tanto el método de extracción no afectó la morfología ni la organización granular de los almidones extraídos.
3. La composición proximal (contenido de proteína, ceniza, grasa y fibra) proporciona una medida indirecta de la pureza de los almidones extraídos. Se obtuvieron valores bajos de esos componentes y la suma de los porcentaje obtenidos es menor de 1.0% indicando un alto nivel de pureza en los almidones extraídos.
4. En general los almidones presentaron una blancura total y contenido de amilosa que les permite su aplicación en la elaboración de láminas comestibles.
5. Al observar el efecto de los factores que se tomaron en consideración al momento de elaborar las láminas se puede decir que:
 - La resistencia de la lámina aumenta al aumentar la cantidad de almidón y bajar la concentración de glicerol en la formulación.
 - La flexibilidad de la lámina aumenta al aumentar la cantidad de almidón y usando una concentración mayor o igual a 20% de glicerol.

- La permeanza disminuye si se aumenta la cantidad de almidón y se obtienen mejores resultados si se usa con ñame. Por el contrario si se aumenta la concentración de glicerol aumenta la permeabilidad.
6. El cultivo de *S. aureus* obtenido de la ATCC al observarse bajo el microscopio presento la forma y arreglo característico de esta bacteria. Fue capaz de crecer y fermentar el manitol en el medio selectivo y diferencial para *S. aureus* “Mannitol Salt Agar” además de presentar las características comunes de colonia al crecer en el medio “Trypticase Soy Agar”. Estos resultados permiten concluir que en efecto el cultivo estaba compuesto por la bacteria *S. aureus* con la ausencia de otro tipo de microorganismos.
 7. Los resultados muestran que hay un efecto inhibitor del fago pero se tienen que considerar lo siguiente:
 - La ausencia de formación de halo de inhibición sugiere que el fago no tiene movilidad en la lámina ni en el agar.
 - Para que sea efectivo, la concentración de fagos debe ser cercano (o mayor) a la de bacterias.

VI. RECOMENDACIONES

Los almidones estudiados en esta investigación a partir de farináceos cultivados localmente en Puerto Rico fueron caracterizados parcialmente y exhibieron características según el método de extracción usado que los hace apto para aplicaciones industriales como la producción de jarabes y alimentos enlatados. También se pueden elaborar láminas comestibles a partir de cualquiera de ellos. Es evidente que el procesamiento de estos farináceos para la producción de almidón les agrega valor y pueden ser introducidos al mercado del almidón. Para conocer en detalle las propiedades de estos almidones y recomendar su uso en una aplicación en particular se recomienda continuar con la caracterización de dichos almidones; realizando estudios para:

1. Determinar la calidad microbiológica del almidón con el método de extracción usado.
2. Determinar las propiedades de solubilidad, empastamiento e hinchamiento de los almidones, y estudiar la retrogradación de los geles.

En el caso de utilizar los almidones para la elaboración de láminas comestibles se recomienda para mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua realizar modificaciones en el almidón, explorar el uso de incorporar otros polímeros a la formulación y la inducción de enlace cruzados en la matriz de las láminas.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Rahman, E., El-Fishawy, F.A., El-Geddawy, M.A., Kurz, T. & El-Rify, M.N. (2008). Isolation and physico-chemical characterization of Mung Bean Starches. *International Journal of Food Engineering*, 4(1): 1-12.
- Aceró, C. A. (2006). Antimicrobianos naturales: cómo la naturaleza nos protege de los microorganismos. *Hospitalidad- ESDAI* (9), 73-88.
- Ackermann, H.W. (2007). 5500 Phages examined in the electron microscope. *Archives of Virology*, 152(2): 227-243.
- Alarcon, F. & Dufour, D. (1998). Almidón agrio de yuca en Colombia: Producción y Recomendaciones. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Alvis, A., Vélez, C.A., Villada, H.S. & Rada, M. (2008). Análisis físico-químico y morfológico de almidones de ñame, yuca y papa y determinación de la viscosidad de las Pastas. *Información Tecnológica*, 19(1): 19-28.
- American Society for Testing and Materials. Standard Test Method for Water Vapor Transmission on Materials. Designation: E96-80.
- AOAC (1990) International Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C.
- Arnnok, P., Ruangviriyachai, C., Mahachai, R., Techawongstein, S. & Chanthai, S. (2010). Optimization and determination of polyphenol oxidase and peroxidase activities in hot pepper (*Capsicum annum* L.) pericarb. *International Food Research Journal*, 17(2): 385-392.
- Arvanitoyannis, I. & Gorris, G. M. (1999). Edible and biodegradable polymeric materials for food packaging or coating. En J.C. Oliveira & F.A.R. Oliveira. (Eds.), *Processing food quality optimization and process assessment* (pp. 357-372). Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Atterbury, R. J., Connerton, P. L., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D. & Connerton, I. F. (2003). Application of host-specific bacteriophages to the surface of chicken skin leads to a reduction in recovery of *Campylobacter jejuni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(10): 6302-6306.

- Aydinly, M., Tutas, M. & Bozdemir, O. A. (2004). Mechanical and light transmittance properties of locust bean gum based edible films. *Turkish Journal of Chemistry*, 28(3): 163-171.
- Azeredo, H.M.C. Mattoso, L.H.C., Wood, D., Williams, T.G., Avená, R.J. & McHugh, T.H. (2009). Nanocomposite edible films from mango puree reinforce with cellulose nanofiber. *Journal of Food Science*, 74(5): 31-35.
- Bajpai, S.K., Navin, C. & Ruchi, L. (2011). Water vapor permeation and antimicrobial properties of sago starch based films formed via microwaves irradiation. *International Food Research Journal*, 18(1): 417-426.
- Bernal, L. & Martínez, E. (2006). Una nueva visión de la degradación del almidón. *Revista del Centro de Investigación*, 7(25): 77-90.
- Bielke, L. R., Higgins, S. E., Donoghue, A. M., Hargis, B. M. & Tellez, G. (2007). Use of wide-host-range bacteriophages to reduce Salmonella on poultry products. *International Journal of Poultry Science*, 6(10): 754-757.
- Bird, D. (2012, octubre 12). Saline lake Bacteriophage [Fotografía]. Recuperado de www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedoh/bghws004.htm#phage_image_archive.
- Bozdemir, O. A. & Tutas, M. (2003). Plasticiser effect on water vapor permeability on locust bean gum based edible films. *Turkish Journal Chemistry*, 27(6): 773-782.
- Castelli, M. V. (2006). Los fagos en la industria quesera. *Tecnología Láctea Latinoamericana*, 40: 18-20.
- Cassasa F. & Sari S. (2007). Aplicación del sistema Cie-Lab a los vinos tintos. Correlación con algunos parámetros tradicionales. *Revista Enología*, 5: 1-15.
- Chana J., Chanthachum S. & Wittaya T. (2011). Properties and antimicrobial activity of edible films incorporated with Kiam wood (*Cotyleobium lanceotatum*) extract. *Food Science and Technology*, 44(1): 284-291.
- Chin-Lin, H., Wenlung, C., Yih-Ming, W. & Chin-Yin, T. (2003). Chemical composition, physical properties, and antioxidant activities of yam flours as affected by different drying methods. *Food Chemistry*, 83(1): 85-92.

- Conca, K.R. (2002). Protein-based film and coatings for military packaging applications. En A. Gennadios (Ed.) Protein-based film and coatings (pp. 551-575). Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Copeland L., Blazek J., Salman H. & Tan M. C. (2009). Form and functionality of starch. *Food hydrocolloids*, 23(6): 1527–1534.
- Datta, S., Janes, M. E., Xue, Q. G., Losso, J. & La Peyre, J. F. (2008). Control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella anatum* on the surface of smoked salmon coated with calcium alginate coating containing oyster lysozyme and nisin. *Journal of Food Science*, 73(2); 67-71.
- Druchta, J.M. & DeMulder-Johnston, C. (1997). An update on edible film. *Food Technology*, 51(2): 60-63.
- Dorval, N.M., Parisien, A. & Lan, C.Q. (2009). Production and application of bacteriophage and bacteriophage-encoded lysins. *Recent Patents on Biotechnology*, 3(1): 37-45.
- Du, W.X., Olsen, C. W., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Levin, C. E. & Friedman, M. (2008). Antimicrobial activity against *E.coli* O157:H7, physical properties, and storage stability of novel carvacrol-containing edible tomato film. *Journal of Food Science*, 73(7): 378-383.
- Ehivet F.E., Min B., Park M.K & Oh J.H. (2011). Characterization and antimicrobial activity of sweet potato starch-based edible film containing *Thymus capitatus* oil. *Journal of Food Science*, 76(1): 178-184.
- Flores, E., García, F. J., Flores, E., Núñez, M. C., González, R. A. & Bello, L. A. (2004). Rendimiento del proceso de extracción de almidón a partir de frutos de plátano (*Musa paradisiaca*); estudio en planta piloto. *Acta Científica Venezolana*, 55(1): 86-90.
- Gadang, V. P., Hettiarachchy, N. S., Johnson, M. G. & Owens, C. (2008). Evaluation of antimicrobial activity of whey protein isolate coating incorporated with nisin, grape seed extract, malic acid, and EDTA on a turkey frankfurter system. *Journal of Food Science*, 73(8): 389-394.
- García, M. A., Martino, M. N. & Zaritzky, N. E. (2000). Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal of Food Science*, 65(6): 941-947.

- García-Tejeda, Y.V., Zamudio-Flores, P.P., Bello –Pérez, L.A., Romero-Bastia, C.A. & Zolorza-Feria, J. (2011). Oxidación del almidón nativo de plátano para su uso potencial en la fabricación de materiales de empaque biodegradables: caracterización física, química, térmica y morfológica. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 12(3): 125-135.
- Giraldo, E. (2001). Tratamiento de lixiviados de rellenos sanitarios: Avances recientes. *Revista de Ingeniería*, 14: 44-55.
- Gogbeu, S.J., Dogbo, D.O., Gonnety, J.T., Zohouri, G.P., N’Zue, B. & Boka, A. (2012). Study of some characteristic of soluble polyphenol oxidase from sex cultivar callus of cassava (*Manihot sculenta* Crantz). *Journal of Animal and Plant Science*, 9(3): 1169-1179.
- Goode, D., Allen V. M. & Barrow, P. A. (2003). Reduction of experimental Salmonella and Campylobacter contamination of chicken skin by application of lytic bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8): 5032–5036.
- Hagens, S. & Loessner, M. J. (2007). Applications of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(3): 513-519.
- Hernández, V. M. & Krochta, J. (2008). Thermoplastic processing of protein for film formation-A review. *Journal of Food Science*, 73(2): 30-39.
- Hernández, M., Torruco, J. G., Chel, L. & Betancur, D. (2008). Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México. *Ciencia e Tecnología de Alimentos*, 28(3): 718-726.
- Hoover, R. & Ratnayake, W. (2005). Determination of total amylose content of starch. In: *Handbook of food analytical chemistry: water, proteins, enzymes, lipids, and carbohydrates*. (pp. 689-693). Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.
- Hong, Y. & Conway, W. S. (2007). Combined application of bacteriophage and *G. asaii* in reducing *L. monocytogenes* in honeydew melon pieces. *Horticulture, Environment and Biotechnology*, 48(6): 365-369.

- Hong, Y. H., Lim, G. O. & Song, K. B. (2009). Physical properties of Gelidium corneum- gelatin blend films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging pork lions. *Journal of Food Science*, 74(1): 6-10.
- Iwata, K., Ishizaki, S., Handa, A. & Tanaka, M. (2000). Preparation and characterization of edible films from fish water-soluble proteins. *Fisheries Science*, 66(2): 372-378.
- Jimoh, K.O., Olurin, T.O. & Aina, J.O. (2009). Effect of drying methods on the rheological characteristics and colour of yam flours. *African Journal of Biotechnology*, 8(10): 2325-2328.
- Joy, F.A. & Wilson, A.G. (1966). Standardization of the dish method for measuring water vapor transmission. Washington, D.C.: Division of Building Research, National Research Council.
- Khwalidia, K., Perez, C., Banon, S., Desobry, S. & Hardy, J. L. (2004). Milk proteins for edible films and coatings. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(4):239–251.
- Kim, K. W., Ko, C. J. & Park, H.J. (2002). Mechanical properties, water vapor permeabilities and solubilities of highly carboxymethylated starch-based edible films. *Journal of Food Science*, 67(1): 218-222.
- Ku, K.-J., Hong, Y.-H. & Song, K.B. (2008). Mechanical properties of a Gelidium corneum edible film containing catechin and its application in sausages. *Journal of Food Science*, 73(3): 217-221.
- Liu, Z. & Han, J. H. (2005). Film-forming characteristics of starches. *Journal of Food Science*, 70(1): 31-36
- Maizura, M., Fazilah, A., Norziah, M.H. & Karim, A.A. (2007). Antibacterial activity and mechanical properties of partially hydrolyzed sago starch–alginate edible film containing lemongrass oil. *Journal of Food Science*, 72(6): 324-330.
- Maftoonazad, N., Ramaswamy, H. S. & Marcotte, M. (2007). Moisture sorption behavior, and effect of moisture content and sorbitol on thermo-mechanical and barrier properties of pectin based edible films. *International Journal of Food Engineering*, 3(4): 1-24.

- Mali, S., Grossmann, M. V. E., Garcia, M. A., Martino, M. N. & Zaritzky, N. E. (2008). Antiplasticizing effect of glycerol and sorbitol on the properties of cassava starch films. *Brazilian Journal of Food Technology*, 11(3): 194-200.
- Manab A., Sawihi M.E., Al Awwaly K.U. & Purnomo H. (2011). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with organic acids. *African Journal of Food Science*, 5: 6-11.
- Manohan, D. & Wong-Chen, W. (2012). Characterization of polyphenol oxidase in sweet potato (*Ipomoea batata* (L.)). *Journal for the Advancement of Science and Arts*, 3(1): 14-30.
- Mayachiew, P. & Devahastin, M. (2008). Comparative evaluation of physical properties of edible chitosan films prepared by different drying methods. *Drying Technology*, 26(2): 176–185.
- Mehrnoush A., Shuhaimi M. & Mohd, A.M. (2012). Characterization of polyphenol oxidase from mango (*Mangifera indica* cv. Chokanan) peel. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 10(1): 85-88.
- Mchugh, T. H. & Senesi, E. (2000). Apple wraps: A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 65(3): 480-485.
- Min, B. J. & Oh, J. H. (2009). Antimicrobial activity of catfish gelatin coating containing *Origanum* (*Thymus capitatus*) oil against gram-negative pathogenic bacteria. *Journal of Food Science*, 74(4): 143-148.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M. & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1): 67–89.
- Oh, J. H., Wang, B., Field, P.D.& Aglan, H.A. (2004). Characteristic of edible films made from dairy proteins and zein hydrolysate cross-linked with transglutaminase. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(3): 287-294.
- O’Flaherty, S., Ross, R. P., Meaney, W., Fitzgerald, G. F., Elbreki, M. F. & Coffey, A. (2005). Potential of the polyvalent anti-*Staphylococcus* bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4): 1836-1842.

- Olasupo, N.A., Fitzgerald, D.J., Gasson, M.J. & Narbad, A. (2003). Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Letters in Applied Microbiology*, 7(6): 448–451.
- Padín-Bibiloni, C. M. (2008-2009, diciembre-enero). Desafío en el manejo de residuos sólidos. *Diálogo*. Recuperado de <http://dialogodigital.com/>.
- Paes, S. S., Yakimets, I. & Mitchell, J. R. (2008). Influence of gelatinization process on functional properties of cassava starch films. *Food Hydrocolloids*, 22(5): 788–797.
- Palomino, C., Molina, Y. & Pérez, E. (2010). Atributos físicos y composición química de harina y almidones de los tubérculos de *Colocasia esculenta* (L.) Schott y *Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott. *Revista Facultad de Agronomía*, 36(2): 58-66. Recuperado de www.revistaagronomiaucv.org.ve.
- Pao, S., Randolph, S. P., Westbrook, E. W. & Shen, H. (2004). Use of bacteriophages to control *Salmonella* in experimentally contaminated sprout seed. *Journal of Food Science*, 69(5): 127-130.
- Peressini, D., Bravin, B. & Sensidoni, A. (2004). Tensile properties, water vapor permeabilities and solubilities of starch-methylcellulose-based edible films. *Journal of Food Science*, 16: 5-16.
- Pérez, M. & Krochta, J. (2002). Formation and properties of whey protein films and coating. En A. Genadios (Ed.) *Protein-based films and coatings* (pp. 159-180). Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Ramírez-Navas, J.S. (2010) Espectro colorimetría en caracterización de leche y quesos. *Revista Tecnología Láctea Latinoamericana*, 61:52-58.
- Resolución de la cámara 2493. 15ta. Asamblea Legislativa, 7ma. Sesión Ordinaria. (2008).
- Resolución del Senado 599, Senado de Puerto Rico, 16 ta Asamblea Legislativa, 2 da Sesión Ordinaria. (2009).
- Rojas, M.F. (2005). Bacteriófagos específicos para *Rhodobacter sphaeroides*: aislamiento, caracterización y Potenciales Transductores. (Tesis de maestría). Disponible en ProQuest and Theses database. (UMI No. 1430598)

- Ronda, C., Vázquez, M. & López, R. (2003). Los bacteriófagos como herramientas para combatir infecciones en acuicultura. *Revista AquaTIC*, 18: 3-10.
- Lu, S., Tong, G., Long, Y. & Feng, H. (2006). Partial purification and characterization of polyphenol oxidase from fresh-cut chinese water chesnut. *Journal of Food Biochemistry*, 30(2): 123-137.
- Solimán, E. A., Tawfik, M. S., El-Saye, H. & Moharram, Y. G. (2007). Preparation and characterization of soy protein based edible/biodegradable films. *American Journal of Food Technology*, 2(6): 462-476.
- Talja, R.A., Peura, M., Serimaa, R. & Jouppila, K. (2008). Effect of amylose content on physical and mechanical properties of potato-starch-based edible films. *Biomacromolecules*, 9(2): 658-663.
- Tanaka, M., Iwata, K., Sguandeeul, R., Hnada, A. & Ishizaki, S. (2001). Influence of plasticizers on the properties of edible films prepared from fish water-soluble proteins. *Fisheries Science*, 67(2): 346-351.
- Tapia, D., Mauiri, A. N., Menegalli, F. C., Sobral, P. J. A. & Añón, M. C. (2007). Contribution of the starch, protein and lipid fraction to the physical, thermal and structural properties of Amaranth (*Amaranthus caudatus*) flour films. *Journal of Food Science*, 72(5): 293-300.
- Tester, R. F., Karkalas, J. & Qi, X. (2004). Starch-composition, fine structure and architecture. *Journal of Cereal Science*, 39(2): 151-165.
- Theron, M.M & Lues, J. F. R. (2007). Organic acid and meat preservation: A review. *Food Reviews International*, 23(2):141–158.
- Torruco-Uco, J. & Betancour-Ancona, D. (2007). Physicochemical and functional properties of makal (*Xanthosoma yucatanensis*) starch. *Food Chemistry*, 101(4): 1319-1326.
- United States Department of Agriculture. National Agricultural Statistics Service (2007). Census of Agriculture. Puerto Rico Island and Municipio Data. Recuperado de www.agcensus.usda.gov/publications/2007/Full-Report/outlying-Areas/prv1.pdf.
- Universidad de Puerto Rico, Estación experimental Agrícola. (1997). Conjunto tecnológico de raíces y tubérculos. (Num. de publicación 101). Rio Piedras, Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico.

- Vicentini, M.N., Dupuy, N., Leitzelman, M., Cereda, M. P. & Sobral, P. J. A. (2005). Prediction of cassava starch edible film properties by chemometric analysis of infrared spectra. *Spectroscopy Letters*, 38(6): 749-767.
- Vispo, N. S. & Puchades, Y. (2001). Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria. *Biotecnología Aplicada*, 18(3): 135-147.
- Wischmann, B., Ahmt, T., Bandsholm, O., Blennow, A., Young, N., Jeppesen, L. & Thomsen, L. (2007). Testing properties of potato starch from different scales of isolations-A ringtest. *Journal of Food Engineering*, 79(3): 970-978.
- Wu, Y., Weller, C. L., Hamouz, F., Cuppett, S. & Schnepf, M. (2001). Moisture loss and lipid oxidation for precooked ground-beef patties package in edible starch-alginate-based composite films. *Journal of Food Science*, 66(3): 486-493.
- Wu, Y., Weller, C. L., Hamouz, F., Cuppett, S.L. & Schnepf, M. (2003). Water vapor permeability, water solubility, and microstructure of emulsified Starch-Alginate-Fatty acid composite films. En J. Welti-Chanes, J.F. Vélez-Ruiz & G.V. Barbosa-Canovas (Eds.) *transport phenomena in food processing*. (pp. 235-246). Boca ratón, Florida: CRC Press.
- Xu, Y.X., Kim, K. M., Hanna, M. A. & Nag, D. (2005). Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products*, 21(2): 185-192.
- Yener, F. Y. G., Korel, F. & Yemenicioglu A. (2009). Antimicrobial activity of lactoperoxidase system incorporated into cross-linked alginate films. *Journal of Food science*, 74(2): 73-79.
- Yoshida, C.M.P., Antunes, A.C.B. & Antunes, A.J. (2002). Moisture adsorption by milk whey protein films. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(3): 329-332.
- Zamudio, P.B. Bello, L. A., Vargas, A., Hernández, J. P. & Romero, C.A. (2007). Partial characterization of films prepared with oxidized banana starch. *Agrociencia*, 41(8): 837-844.
- Zhang, P., Whistler, R. L., BeMiller, J. N. & Hamaker, B. R. (2005). Banana starch: production, physicochemical properties, and digestibility—a review. *Carbohydrate Polymers*, 59(4): 443–458.

- Zhang, Y. & Han, J.H. (2006). Plasticization of pea starch films with monosaccharides and Polyols. *Journal of Food Science*, 71(6): 253-261.
- Zhang, S., Wang, Y., Herring, J.L. & Oh, J.-H. (2007). Characterization of edible film fabricated with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) gelatin extract using selected pretreatment methods. *Journal of Food Science*, 72(9): 498-503.

APÉNDICE 1- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las observaciones del experimento factorial 4x4x3 dispuesto en un diseño de bloques completamente aleatorizado pueden describirse mediante el siguiente modelo lineal donde m es el número de bloques.

$$Y_{ijkm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \alpha\beta_{ij} + \alpha\gamma_{ik} + \beta\gamma_{jk} + \alpha\beta\gamma_{ijk} + \epsilon_{ijkm} \quad i= 1, 2, 3, 4; j=1, 2, 3, 4; k= 1, 2, 3; m=1, 2$$

Resultados del ANOVA para el experimento factorial.

New table: 9/27/2012 - 3:41:03 PM

Analysis of variance

Fuerza tensil

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
Fuerza tensil	96	0.85	0.70	38.25

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	8532.85	48	177.77	5.67	<0.0001
Bloque	585.29	1	585.29	18.68	0.0001
Fuente de almidón	21.52	3	7.17	0.23	0.8758
Cantidad de almidón	1258.72	2	629.36	20.09	<0.0001
[Glicerol]	5269.68	3	1756.56	56.07	<0.0001
Fuente de almidón*Cantidad..	348.27	6	58.05	1.85	0.1091
Fuente de almidón*[Glicero..	170.63	9	18.96	0.61	0.7862
Cantidad de almidón*[Glice..	705.35	6	117.56	3.75	0.0039
Fuente de almidón*Cantidad..	173.38	18	9.63	0.31	0.9958
Error	1472.35	47	31.33		
Total	10005.19	95			

% Elongación

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
% Elongación	96	0.75	0.49	90.93

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	24600.08	48	512.50	2.86	0.0002
Bloque	1.01	1	1.01	0.01	0.9405
Fuente de almidón	2312.78	3	770.93	4.31	0.0092
Cantidad de almidón	2086.39	2	1043.19	5.83	0.0055
[Glicerol]	11352.60	3	3784.20	21.15	<0.0001
Fuente de almidón*Cantidad..	2905.21	6	484.20	2.71	0.0244
Fuente de almidón*[Glicero..	2265.84	9	251.76	1.41	0.2124
Cantidad de almidón*[Glice..	1389.50	6	231.58	1.29	0.2784
Fuente de almidón*Cantidad..	2286.76	18	127.04	0.71	0.7837
Error	8410.18	47	178.94		
Total	33010.26	95			

Permeanza

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
Permeanza	96	0.70	0.39	15.53

Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	22.40	48	0.47	2.27	0.0028
Bloque	1.29	1	1.29	6.29	0.0156
Fuente de almidón	0.40	3	0.13	0.65	0.5876
Cantidad de almidón	5.91	2	2.96	14.39	<0.0001
[Glicerol]	4.31	3	1.44	6.99	0.0006
Fuente de almidón*Cantidad..	5.18	6	0.86	4.20	0.0018
Fuente de almidón*[Glicero..	1.18	9	0.13	0.64	0.7570
Cantidad de almidón*[Glice..	0.83	6	0.14	0.68	0.6686
Fuente de almidón*Cantidad..	3.28	18	0.18	0.89	0.5952
Error	9.66	47	0.21		
Total	32.06	95			

Antes de proceder a la comprobación de si existen diferencias entre las medias se debe verificar si el análisis de varianza es válido. Para esto, al realizar el ANOVA se crearon las variables correspondientes a los residuos y predichos que se utilizaron en las pruebas de los supuestos necesarios para que el análisis esté en cumplimiento. Las pruebas fueron; la prueba de normalidad de Shapiro Wilks y la prueba de homogeneidad de varianzas.

Resultados de la prueba de normalidad de residuos.

New table: 9/27/2012 - 7:31:53 PM

Shapiro-Wilks (modified)

Variable	n	Mean	S.D.	W*	p(one tail)
RES_Fuerza tensil	96	0.00	3.94	0.99	0.9948
RES_% Elongación	96	0.00	9.41	0.85	<0.0001
RES Permeanza	96	0.00	0.32	0.98	0.4267



Hipótesis estadísticas:

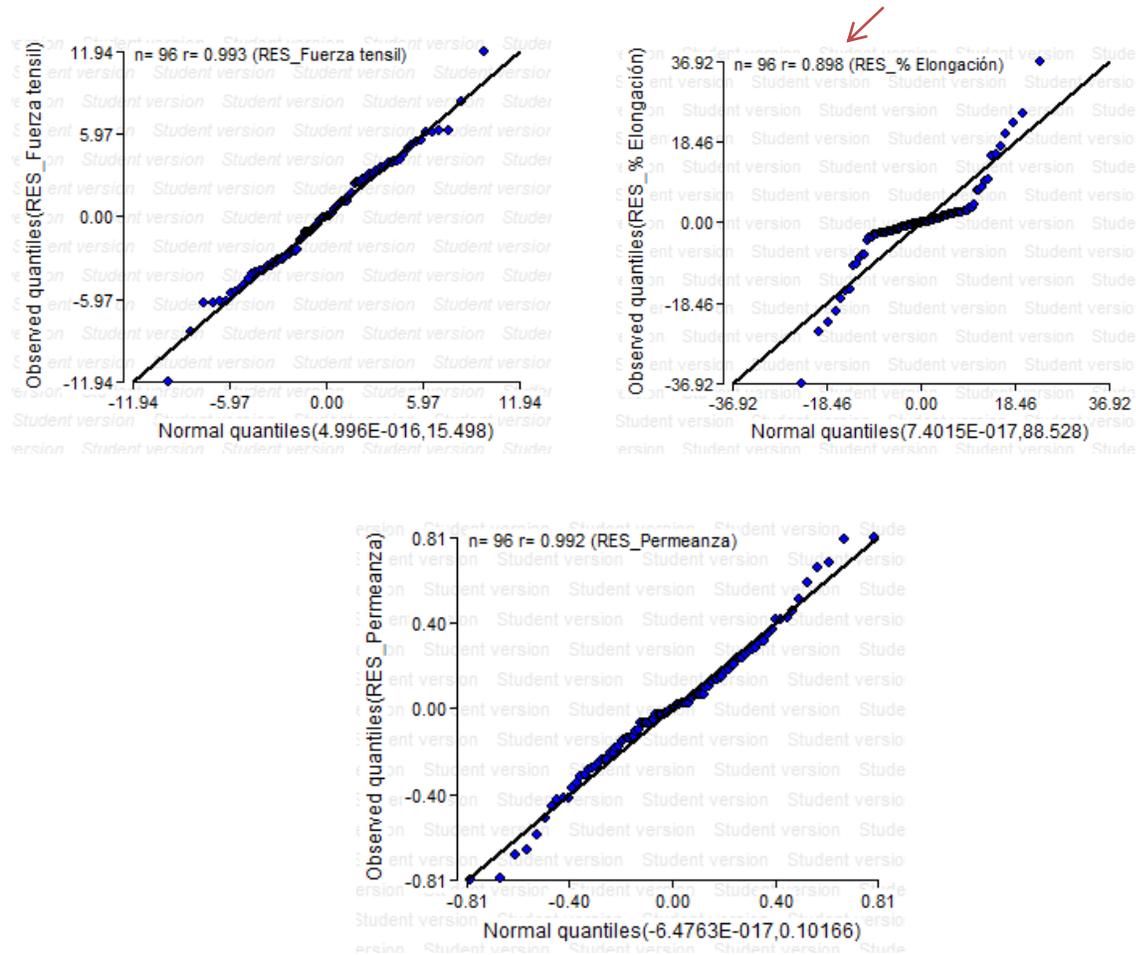
H₀: Se cumple con el supuesto de normalidad

H_a: No se cumple con el supuesto de normalidad

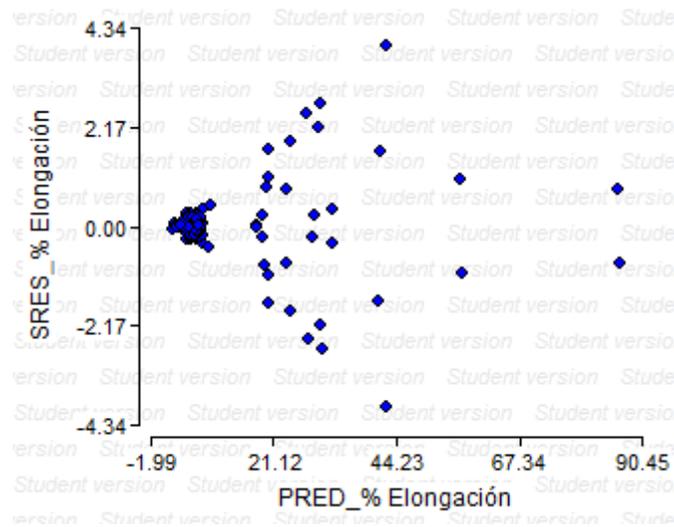
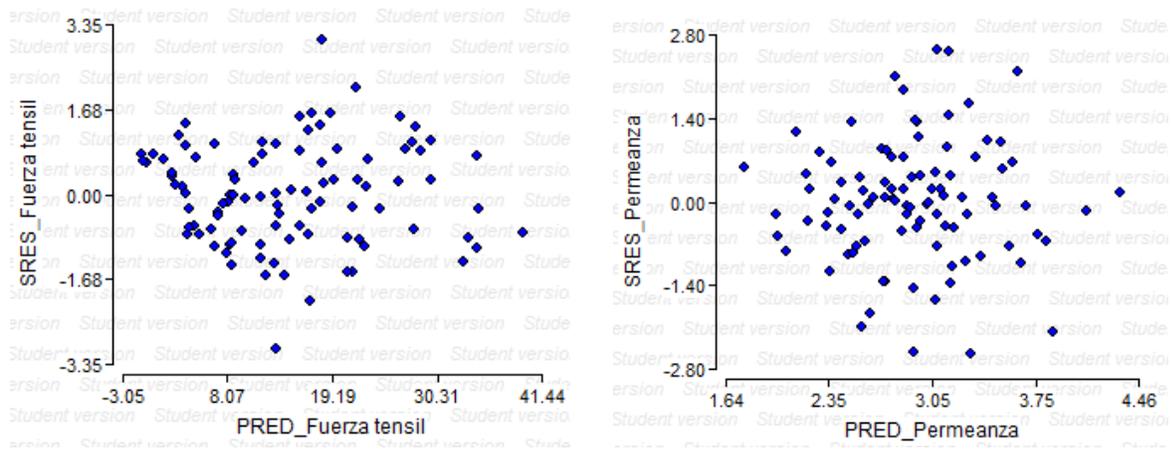
Con un valor de p=0.9948 para Fuerza tensil y p=0.4267 para Permeanza mayor a α (0.05) no se rechaza la hipótesis nula. No hay evidencia suficiente para decir que los residuos no tienen distribución normal.

En el caso de los residuos de % Elongación se obtuvo un valor de p<0.0001 bajo, indicando que no se

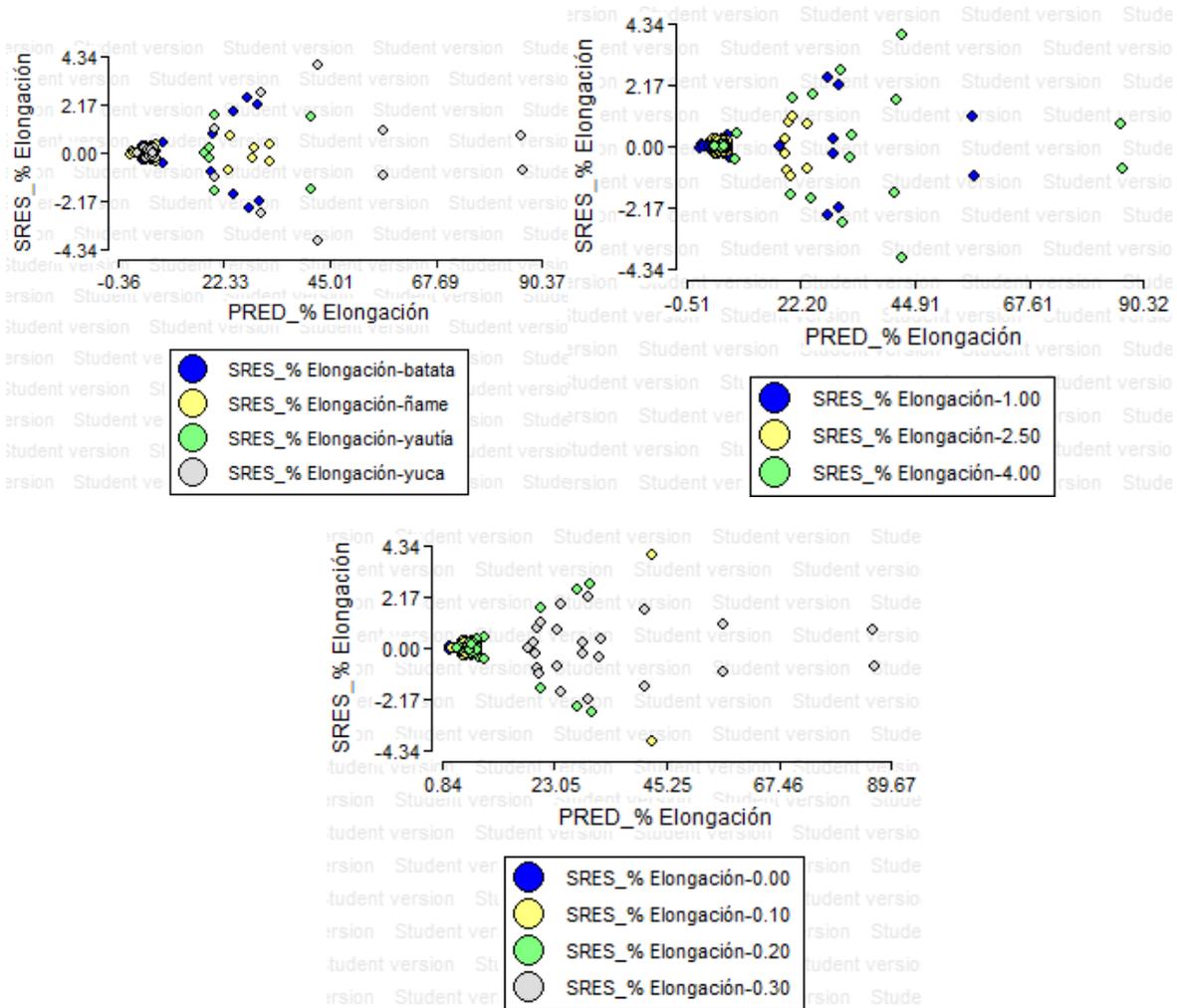
cumple con el supuesto de normalidad. Para observar las distribuciones en los residuos se realizaron Q-Q plot. A continuación se presentan las gráficas con la variable Residuos (RES) para Fuerza tensil, %Elongación y Permeanza. La aproximación de los puntos a la recta sugiere que la distribución de los residuos es normal para Fuerza tensil y Permeanza a diferencia de % Elongación.



La homogeneidad de varianzas se inspeccionó gráficamente mediante un gráfico de dispersión. Los mismos se presentan a continuación.



Se puede observar que en la gráfica 1 y 2 no se manifiesta ninguna tendencia o patrón de dispersión. A diferencia de la gráfica 3 que muestra un patrón de dispersión hacia la izquierda. Se realizó nuevamente el gráfico de dispersión pero particionando los residuos estudiantizados de %Elongación por cada factor y se presentan a continuación en gráficas separadas. Se puede observar (gráfica 3 abajo) que el patrón de dispersión es influenciado por la concentración de glicerol.



Como se puede observar es necesaria una transformación para los datos de la respuesta % Elongación ya que no cumple con ninguno de los supuestos en la escala original. Se probaron dos transformaciones: logarítmica y raíz cuadrada. La transformada logarítmica resultó ser la más apropiada en este caso porque cumple con ambos supuestos. A continuación se presentan los resultados del ANOVA realizado y la prueba de Shapiro Wilks con los datos de % Elongación transformados además de la representación gráfica de la inspección de la homogeneidad de varianzas junto al Q-Q plot (prueba de normalidad). En base a estos resultados se decidió utilizar los datos transformados.

New table: 9/27/2012 - 7:30:43 PM

Analysis of variance

Variable	N	R ²	Adj R ²	CV
LN % Elongación	96	0.74	0.47	30.94

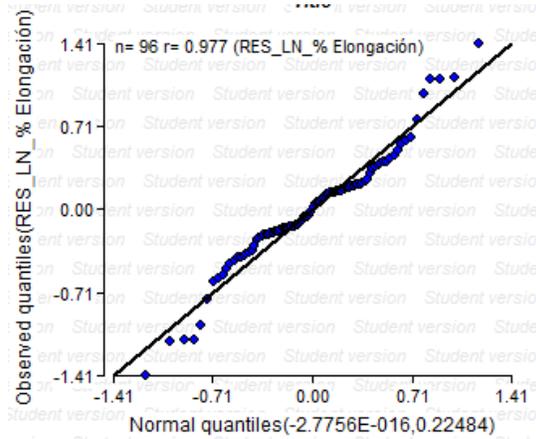
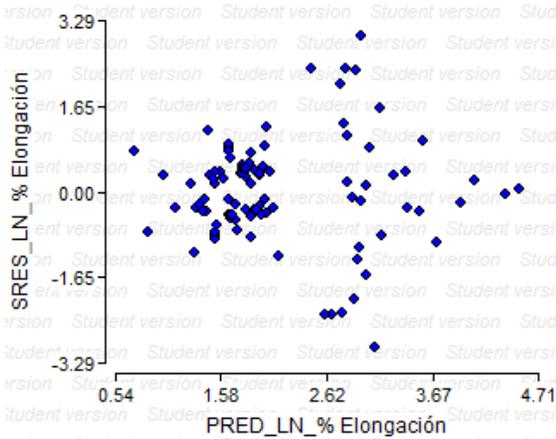
Analysis of variance table (Partial SS)

S.V.	SS	df	MS	F	p-value
Model.	59.96	48	1.25	2.75	0.0004
Bloque	0.42	1	0.42	0.91	0.3437
Fuente de almidón	2.62	3	0.87	1.92	0.1394
Cantidad de almidón	4.17	2	2.08	4.59	0.0151
[Glicerol]	41.62	3	13.87	30.53	<0.0001
Fuente de almidón*Cantidad..	2.77	6	0.46	1.02	0.4258
Fuente de almidón*[Glicero..	2.67	9	0.30	0.65	0.7457
Cantidad de almidón*[Glice..	1.43	6	0.24	0.53	0.7861
Fuente de almidón*Cantidad..	4.26	18	0.24	0.52	0.9343
Error	21.36	47	0.45		
Total	81.32	95			

C:\Users\Antonio\Desktop\Nydia 2012\ANOVA\Tabla analisis diseño de bloques ma.IDB2: 9/28/2012 - 8:45:24 PM

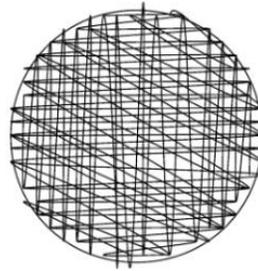
Shapiro-Wilks (modified)

Variable	n	Mean	S.D.	W*	p(one tail)
RES logelong	96	0.00	0.47	0.96	0.0617

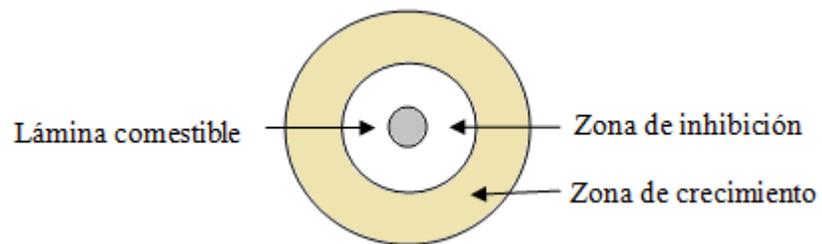


Una vez realizadas las pruebas de cumplimiento de los supuestos, se consideran válidos los resultados del análisis de varianza. Se procedió a evaluar las interacciones de segundo orden, luego las de primer orden y los efectos principales de los factores.

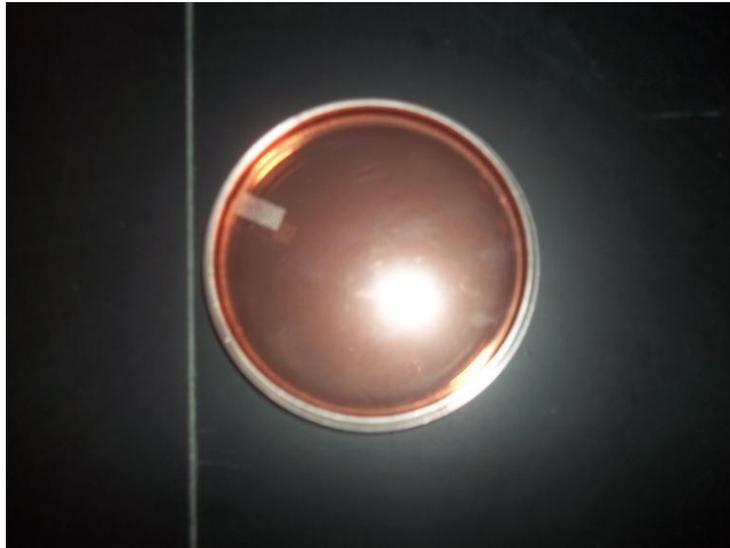
APÉNDICE 2- MÉTODO DE KIRBY-BAUER



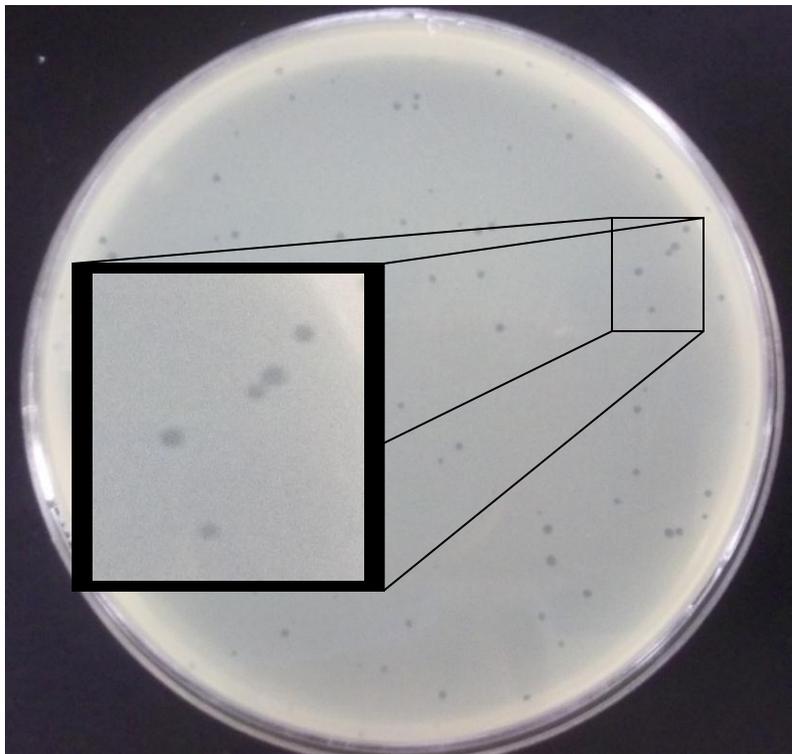
Distribución homogénea del inóculo



APÉNDICE 3- MEDIO “MANNITOL SALT AGAR” Y PLACAS DE LISIS DEL BACTERIÓFAGO 52



“Mannitol Salt Agar” sin inocular con *S. aureus*



Placas de lisis del bacteriófago 52