

UNIVERSIDAD NACIONAL

Campus Omar Dengo

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE QUÍMICA

PRODUCCIÓN DE UN BIOCOMPUESTO A BASE DE ALMIDÓN TERMOPLÁSTICO
DE YUCA AMARGA (*MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ) Y NANOCELULOSA
OBTENIDA DE RASTROJO DE PIÑA (*ANANAS COMOSUS*)

Tesis sometida a consideración del Tribunal Examinador de la Escuela de Química, como
requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Química Industrial

Josette Lucía Araya Navarro

Tutor:

Ph.D. Guillermo Jiménez Villalta

Asesores:

M.Sc. Marianelly Esquivel Alfaro

Ph.D. Oscar Rojas Carrillo

Heredia, Costa Rica

Febrero, 2021

"Este trabajo de graduación fue _____ por el Tribunal Examinador de la Escuela de Química de la Universidad Nacional, como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Química Industrial.

Miembros del Tribunal Examinador del Trabajo Final de Graduación:

| | | FIRMA |
|--|----------------------------------|-------|
| Representante del Decano de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y del Director de la Escuela Química | Agregar Nombre | _____ |
| Tutor | Ph.D. Guillermo Jiménez Villalta | _____ |
| Asesora | M.Sc. Marianelly Esquivel Alfaro | _____ |
| Asesor | Ph.D. Oscar Rojas Carrillo | _____ |
| Lector | Ph.D. Diana Paola Navia Porras | _____ |
| Proponente | BQI. Josette Lucía Araya Navarro | _____ |

DEDICATORIA

A mis padres,
por ser los gigantes que me han llevado sobre sus hombros en mi búsqueda por alcanzar
grandes sueños.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se desarrolló dentro del marco de la Actividad Académica de la Escuela de Química de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) denominada “Productos biodegradables a base de yuca para uso potencial como sustituto parcial del plástico” la cual fue financiada por la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTACORI).

También agradezco a las Instituciones adscritas al Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) del gobierno de Costa Rica como lo son la Estación Experimental Los Diamantes del Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA), además del grupo PCI Rojas de San Carlos por brindarnos la yuca como materia prima de esta investigación. Además, a la Piñera Santa Clara por las donaciones de rastrojo de piña utilizado como sustrato celulósico.

De la misma manera, agradezco a los encargados del programa de Ingeniería Agrícola del Tecnológico de Costa Rica (TEC) por su disposición en el uso de la decortadora de piña y a la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Costa Rica (UCR) por la realización de los análisis de dispersión dinámica de la luz de la nanocelulosa. Por otra parte, agradezco al Fondo Para el Fortalecimiento de las Capacidades Estudiantiles en Investigación FOCAES, por la ayuda brindada para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a la Ph. D Diana Paola Navia Porras y al M. Sc Luis Gabriel Poveda Perdomo por su acogida en el grupo de Investigación de Biotecnología del Programa de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad de San Buenaventura, Cali, Colombia. A ellos reconozco su esfuerzo y compromiso por la ciencia, un lazo que unirá siempre nuestra amistad.

Mis más sinceros agradecimientos a mi tutor Guillermo Jiménez y a mis asesores Marianelly Esquivel y Oscar Rojas por su apoyo y confianza durante toda la investigación. Asimismo, agradezco a los colaboradores e investigadores del Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional, en especial a Isabel Carvajal, Ruth Rojas y Ricardo Araya, cuya compañía y amistad siempre fue una motivación para enfrentar los retos de nuestra profesión.

Agradezco a mis padres quienes han sido una bendición en mi vida pues cada éxito cosechado es fruto de su amor y apoyo. Finalmente, agradezco a Dios por iluminar siempre mi camino y darme fortaleza para lograr cada una de mis metas. Sus bendiciones me han permitido vivir con un corazón sorprendido y siempre optimista que se refleja en una frase dicha por una mujer de la ciencia a quien tanto admiro: “Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico; es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas” -Marie Curie

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----|
| DEDICATORIA | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| ÍNDICE DE CUADROS | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xi |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | xiv |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | xv |
| RESUMEN..... | xvi |
| CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1. Justificación y antecedentes..... | 1 |
| CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO | 5 |
| 2.1. Plásticos biobasados como alternativa de los plásticos de un solo uso..... | 5 |
| 2.2. Características del cultivo de yuca en Costa Rica como materia prima para la generación de plásticos biobasados..... | 6 |
| 2.3. Morfología granular y composición polimórfica del almidón..... | 7 |
| 2.3.1. Almidón termoplástico (TPS) | 9 |
| 2.3.2. Cristalinidad y envejecimiento post-proceso | 10 |
| 2.4. Aplicación de fibras naturales en el procesamiento de biopolímeros | 11 |
| 2.4.1. Aprovechamiento del rastrojo de piña como fuente de nanocelulosa | 12 |
| 2.4.2. Composición química de las fibras vegetales | 12 |
| 2.4.2.1. Celulosa..... | 13 |
| 2.4.2.2. Nanocelulosa | 14 |
| 2.5. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales | 16 |
| 2.5.1. Aceite esencial de romero | 17 |
| 2.5.2. Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC) | 18 |
| 2.6. Propiedades clave de los materiales de empaque utilizados como plásticos de un solo uso | 19 |
| CAPÍTULO III. OBJETIVOS | 23 |
| CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA..... | 24 |
| 4.1. Extracción del almidón obtenido de la yuca amarga..... | 24 |

| | | |
|----------|--|----|
| 4.1.1. | Proceso de extracción del almidón a partir de la yuca..... | 24 |
| 4.1.2. | Caracterización del almidón obtenido de la yuca amarga..... | 25 |
| 4.1.2.1. | Microscopía óptica | 25 |
| 4.1.2.2. | Microscopía electrónica de barrido (SEM)..... | 26 |
| 4.1.2.3. | Cuantificación del almidón | 26 |
| 4.1.2.4. | Determinación de la temperatura de gelación del almidón..... | 26 |
| 4.1.2.5. | Determinación del contenido de amilosa | 27 |
| 4.2. | Extracción de la fibra vegetal y caracterización las materias primas relacionadas al rastrojo de la piña | 29 |
| 4.2.1. | Aislamiento de la nanocelulosa cristalina (NCC) obtenida del rastrojo de la piña | 29 |
| 4.2.1.1. | Separación de la celulosa del sustrato entero..... | 29 |
| 4.2.1.2. | Aislamiento de nanocelulosa cristalina (NCC) | 30 |
| 4.2.2. | Caracterización de la nanocelulosa (NCC) | 32 |
| 4.2.2.1. | Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de NCC | 32 |
| 4.2.2.2. | Determinación de tamaño de la NCC por dispersión dinámica de luz (DLS) | 32 |
| 4.2.2.3. | Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) | 33 |
| 4.2.2.4. | Análisis termogravimétrico (TGA) | 33 |
| 4.3. | Extracción y caracterización de aceite esencial de romero (AER) | 34 |
| 4.3.1. | Extracción de aceite esencial de romero (AER)..... | 34 |
| 4.3.2. | Caracterización de los aceites esenciales | 35 |
| 4.3.2.1. | Cromatografía de gases acoplada a masas del AER..... | 36 |
| 4.3.2.2. | Cuantificación de los fenoles totales en los aceites esenciales | 36 |
| 4.4. | Formulación y caracterización de películas termoplásticas..... | 37 |
| 4.4.1. | Composición de las formulaciones de películas termoplásticas | 37 |
| 4.4.1.1. | Preparación de películas de almidón termoplástico (TPS) | 38 |
| 4.4.1.2. | Preparación de películas de TPS/NCC | 38 |
| 4.4.1.3. | Preparación de películas de TPS/AER y TPS/NCC/AER | 39 |
| 4.4.2. | Caracterización de las películas de TPS, TPS/NC, TPS/AER y TPS/NCC/AER..... | 40 |

| | | |
|--|---|----|
| 4.4.2.1. | Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR) | 40 |
| 4.4.2.2. | Análisis termogravimétrico (TGA) | 40 |
| 4.4.2.3. | Calorimetría de barrido diferencial (DSC)..... | 41 |
| 4.4.2.4. | Propiedades mecánicas | 41 |
| 4.4.2.5. | Propiedad de solubilidad en agua | 42 |
| 4.4.2.6. | Permeabilidad y velocidad de transmisión de vapor de agua | 43 |
| 4.4.2.7. | Opacidad | 44 |
| 4.4.2.8. | Determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana del AER..... | 45 |
| 4.4.2.9. | Determinación cualitativa de la concentración mínima inhibitoria (MIC) 45 | |
| 4.4.2.10. | Prueba cualitativa de inhibición de disco..... | 46 |
| CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | | 49 |
| 5.1. | Caracterización del almidón de yuca amarga | 49 |
| 5.1.1. | Estructura granular..... | 49 |
| 5.1.2. | Cuantificación de almidón total y amilosa en el almidón extraído de yuca amarga | 51 |
| 5.1.3. | Determinación de la temperatura de gelación del almidón..... | 53 |
| 5.2. | Caracterización de los materiales obtenidos del rastrojo de piña | 56 |
| 5.2.1. | Caracterización del rastrojo de piña decorticado..... | 56 |
| 5.2.2. | Caracterización de la nanocelulosa..... | 58 |
| 5.2.2.1. | Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)..... | 58 |
| 5.2.2.2. | Determinación de tamaño de las partículas de NCC por DLS y TEM... | 59 |
| 5.2.2.3. | Análisis termogravimétrico (TGA) | 61 |
| 5.3. | Preparación y caracterización del aceite esencial de romero..... | 63 |
| 5.3.1. | Rendimiento de la extracción de aceite esencial de romero | 63 |
| 5.3.2. | Caracterización del aceite esencial de romero | 64 |
| 5.3.2.1. | Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS) | 64 |
| 5.3.2.2. | Cuantificación de fenoles..... | 64 |
| 5.4. | Preparación y caracterización de las películas de almidón termoplástico | 65 |
| 5.4.1. | Resultados cualitativos de las formulaciones de las películas de almidón termoplástico | 65 |

| | | |
|---|--|-----|
| 5.4.2. | Caracterización de las películas de almidón termoplástico..... | 66 |
| 5.4.2.1. | Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)..... | 66 |
| 5.4.2.2. | Análisis termogravimétrico (TGA) | 69 |
| 5.4.2.3. | Calorimetría de barrido diferencial (DSC)..... | 76 |
| 5.4.2.4. | Propiedades mecánicas | 81 |
| 5.4.2.5. | Propiedades de interacción con el agua | 87 |
| 5.4.2.5.1. | Propiedades de solubilidad en agua | 88 |
| 5.4.2.5.2. | Permeabilidad y velocidad de transmisión de vapor de agua..... | 90 |
| 5.4.2.6. | Opacidad | 92 |
| 5.4.2.7. | Determinación de la actividad antimicrobiana del AER..... | 95 |
| 5.4.2.7.1. | Determinación de la concentración mínima inhibitoria | 95 |
| 5.4.2.7.2. | Prueba cualitativa de inhibición de disco | 99 |
| CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | | 105 |
| 6.1. | Conclusiones | 105 |
| 6.2. | Recomendaciones..... | 107 |
| ANEXOS..... | | 126 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|-----|
| Cuadro 1. Propiedades de los materiales de embalaje principales utilizados en la industria plástica..... | 21 |
| Cuadro 2. Composición de las formulaciones elaboradas de TPS, TPS/NCC, TPS/NCC/AER y TPS/AER. | 37 |
| Cuadro 3. Porcentaje de rendimiento de la extracción, porcentaje de humedad y porcentaje de almidón en base seca de la variedad de yuca CM7951-5. | 52 |
| Cuadro 4. Composición física y química del rastrojo de piña decortado en base seca. | 57 |
| Cuadro 5. Transiciones térmicas de las películas de TPS elaboradas con glicerol, NCC y AER en diferentes formulaciones..... | 70 |
| Cuadro 6. Resultados obtenidos para las pruebas relacionadas con la interacción con agua de las películas elaboradas con diferentes formulaciones y componentes. | 88 |
| Cuadro 7. Determinación de la opacidad de las películas de almidón termoplástico elaboradas con diferentes componentes. | 93 |
| Cuadro 8. Componentes químicos volátiles del aceite esencial de romero determinado por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas. | 126 |
| Cuadro 9. Absorbancia de la muestra de AER para la determinación del contenido de fenoles totales (mg AGE/g muestra) del aceite esencial de romero (<i>Romero officinalis</i>) determinada a 760 nm. | 128 |
| Cuadro 10. Resultados obtenidos para la determinación de la solubilidad en agua de las películas elaboradas con diferentes formulaciones y componentes realizada por triplicado. | 129 |
| Cuadro 11. Resultados obtenidos para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua y la velocidad de transmisión de vapor de agua de las películas termoplásticas..... | 130 |

Cuadro 12. Resultados obtenidos para la determinación de las propiedades mecánicas como la resistencia a la tracción, alargamiento a la rotura y módulo elástico de las películas de TPS, TPS/NCC, TPS/NC/AER y TPS/AER. 131

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 2. Estructura química representativa de la celulosa. Adaptado de ref. 39. 2018 Journal of Saudi Chemical Society. | 13 |
| Figura 3. Sistema de hidrodestilación utilizado para la extracción de AER. Fuente propia. | 35 |
| Figura 4. Microscopía óptica a una magnificación de 40X para las muestras a) almidón extraído de la variedad de yuca amarga 7951-5 y b) almidón de papa comercial (Sigma Aldrich). | 50 |
| Figura 5. Microscopía electrónica de barrido SEM realizado a la muestra de almidón extraído de la yuca amarga variedad CM7951-5. | 51 |
| Figura 6. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para las muestras de almidón comercial marca Sigma Aldrich y almidón de yuca variedad CM7951-5. | 55 |
| Figura 7. Espectro FT-IR de la NCC. | 58 |
| Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión de la NCC. a. 6kX y b. 3kX. | 60 |
| Figura 9. Gráfica de tamaño de la nanocelulosa extraída de rastrojo de piña con respecto a la concentración de partículas por mL de muestra analizada por DLS..... | 61 |
| Figura 10. Curva termogravimétrica de % peso y la derivada del cambio en el peso con respecto a la temperatura de la NCC..... | 62 |
| Figura 11. Películas de almidón termoplástico (TPS) elaboradas con almidón de yuca obtenido de la variedad CM7951-5 y porcentajes de glicerol de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 % de glicerol/contenido de almidón. | 66 |
| Figura 12. Espectro infrarrojo de las películas de TPS elaboradas con el almidón extraído de la variedad de yuca CM7951-5..... | 67 |

| | |
|--|----|
| Figura 13. Espectro infrarrojo de las películas de TPS 20 % y TPS/NCC al 5, 10 y 15 %. | 68 |
| Figura 14. Espectro infrarrojo de las películas de TPS 20 % y TPS/NCC 15 % y TPS/AER 0,4 y 0,5 % y TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 %. | 69 |
| Figura 15. a. Termograma y b. curva termogravimétrica de la primera derivada DTGA de gránulos de almidón nativo, TPS 20 y 25 %. | 72 |
| Figura 16. a. Termograma de y b. curva termogravimétrica de la primera derivada de TPS 20 % y TPS/NCC 5, 10 y 15 %. | 73 |
| Figura 17. a. Termograma y b. curva termogravimétrica de la primera derivada de TPS 20 %, TPS/NCC 15 %, TPS/AER 0,4 y 0,5 % y TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 %. | 75 |
| Figura 18. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para las películas de TPS 20 % y TPS 25 %. | 76 |
| Figura 19. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para las películas de TPS y TPS/NCC. | 78 |
| Figura 20. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para las películas de TPS 20 % y TPS/AER 0,4 y 0,5 %. | 80 |
| Figura 21. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para las películas de TPS/NCC 15 % y TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 %. | 80 |
| Figura 22. Resistencia a la tracción (MPa) de las películas de TPS según su composición de TPS, TPS/NCC, TPS/AER y TPS/NCC/AER. | 82 |
| Figura 23. Módulo elástico (MPa) y alargamiento a la rotura (%) para las muestras de TPS 20 % y TPS/NCC 5, 10 y 15 %. | 83 |
| Figura 24. Módulo elástico y alargamiento a la rotura según la composición del biocompuesto elaborado con TPS 20 %, TPS/NCC 15 %, TPS/AER 0,4 y 0,5 % y TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 %. | 86 |

| | |
|---|-----|
| Figura 25. Concentración mínima inhibitoria del AER en las bacterias a. <i>E. coli</i> , b. <i>S. Aureus</i> , c. <i>S. entérica</i> ; en concentraciones (1000, 2000, 3000, 4000) μ L de AER (de izquierda a derecha). | 96 |
| Figura 26. Concentración mínima inhibitoria del AER en los hongos a. <i>A.flavus</i> , b. <i>A.niger</i> , c. <i>F. oxyporum</i> ; en concentraciones (0, 1000, 2000, 3000, 4000) μ L de AER (de izquierda a derecha). | 98 |
| Figura 27. Prueba de inhibición de disco del TPS, TPS/NCC, TPS/NCC/AER y TPS/AER en las bacterias a. <i>E. coli</i> , b. <i>S. Aureus</i> , c. <i>S. entérica</i> | 100 |
| Figura 28. Prueba de inhibición de disco del TPS, TPS/NCC, TPS/NCC/AER y TPS/AER en los hongos a. <i>A. flavus</i> , b. <i>A. niger</i> , c. <i>F. oxysporum</i> | 103 |
| Figura 29. Curva de calibración de amilosa de papa para la determinación del contenido de amilosa en una muestra de almidón de yuca amarga determinada a 622 nm. Título de figura debajo de la misma. | 126 |
| Figura 30. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación del contenido de fenoles totales en una muestra de AER determinada a 780 nm. | 128 |
| Figura 31. Ejemplo de gráficas obtenidas con el equipo donde se determinan las propiedades mecánicas medidas para las películas termoplásticas. | 131 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|-----|
| Anexo 1. Determinación del contenido de amilosa en el almidón de yuca amarga CM7951-5 | 126 |
| Anexo 2. Caracterización por CG-MS y cuantificación de fenoles totales del aceite esencial de romero extraído por hidrodestilación. | 126 |
| Anexo 3. Caracterización de las propiedades de interacción con el agua de las de las películas termoplásticas. | 129 |
| Anexo 6. Propiedades mecánicas como resistencia a la tracción, alargamiento a la rotura y módulo elástico de las películas de TPS, TPS/NCC, TPS/NC/AER y TPS/AER..... | 130 |

LISTA DE ABREVIATURAS

TPS Almidón termoplástico

NCC Nanocelulosa cristalina

AER Aceite esencial de romero

TPS/NCC almidón termoplástico con nanocelulosa cristalina

TPS/AER almidón termoplástico con aceite esencial de romero

TPS/NCC/AER almidón termoplástico con nanocelulosa cristalina y aceite esencial de romero

°C grados centígrados

ATCC American Type Culture Collection

DSC Calorimetría de barrido diferencial

DLS Dispersión dinámica de luz

TGA Análisis termogravimétrico

FTIR Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier

CG-MS Cromatografía de gases acoplada a masas

GP Grado de polimerización

WVP Permeabilidad al vapor de agua

WVTR velocidad de transmisión de vapor de agua

SEM Microscopía electrónica de barrido

TEM Microscopía Electrónica de Transmisión

EM Módulo elástico

TS Resistencia a la tracción

%EB Alargamiento a la rotura

MIC mínima concentración inhibitoria

UFC Unidades formadoras de colonias

AGE Ácido gálico equivalente

MPa Mega Pascales

nm nanómetro

µm micrómetro

ppm partes por millón

RESUMEN

En este estudio se produjo un biocompuesto a base de almidón termoplástico de yuca (*Manihot esculenta Crantz*) y nanocelulosa obtenida de rastrojo de piña (*Ananas comosus*), la elaboración de este bioplástico se presenta como una opción que pretende dar valor agregado a la yuca amarga para la extracción de almidón cuya caracterización morfológica mostró un contenido de amilosa de 20,1 %, almidón total 76,7 % y un porcentaje de rendimiento de extracción del 22 % de gránulos nativos. Además, el almidón mostró una temperatura de gelación de 79 °C.

Por otra parte, el sustrato celulósico obtenido del rastrojo de piña contiene: 28,97 % de extraíbles, 71,96 % de humedad, 1,26 % de ceniza, 2,85 % de lignina, 19,38 % de hemicelulosa y 13,97 % de α -celulosa; con un rendimiento de extracción de 4,95 % NCC extraída del sustrato celulósico cuya morfología presentó un aspecto alargado en forma de varilla al ser analizado por TEM. Además, la extracción condujo a una mezcla de partículas de tamaños entre 400 y 5300 nm, estas últimas consideradas dentro del rango de macropartículas según el análisis por DLS.

Las elaboración de películas de TPS permitió observar una disminución en las propiedades térmicas y mecánicas y un aumento en las interacciones con el agua de 6,34 a 7,34 % en solubilidad y de 0,14 y 0,20 ($\text{g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$) para WVP con respecto al incremento de glicerol ocasionado por el aumento del grupo hidroxilo en la película que aumenta las interacciones por puentes de hidrógeno con el agua.

Además, se investigó el refuerzo de la matriz por medio de la adición de NCC para generar TPS/NCC con concentraciones de 5, 10 y 15 % en peso de NCC cuyas propiedades mecánicas mostraron un aumento gradual en la resistencia a la tracción de hasta 1,795 MPa. Además, la adición de NCC a la matriz termoplástica condujo a una reducción en la interacción de las películas con el agua mostrando una disminución en la solubilidad, WVTR y WVP según el aumento de NCC de 5, 10 y 15 % en el TPS respectivamente, debido a que los nanocristales de celulosa pueden limitar la disponibilidad de los grupos hidroxilo presentes en las macromoléculas del almidón para formar enlaces hidrófilos con agua.

Por otra parte, la adición de AER aumentó las interacciones con el agua debido a que a pesar del carácter hidrofóbico de los aceites esenciales, estos generan una disminución de las interacciones polímero-polímero y polímero – NCC lo que facilita la difusión de moléculas de agua entre las cadenas de polímeros. Por otra parte, el alargamiento a la rotura presentó la tendencia creciente debido a que el AER se comporta como plastificante aumentando la capacidad de estiramiento de la película.

Finalmente, la utilización de AER como agente antimicrobiano dentro de la matriz termoplástica presentó actividad contra las bacterias *E. coli* y *S. Aureus* y los hongos *A. niger* y *A. flavus* y *F. oxysporum* en menor medida, a una concentración mínima inhibitoria de 4000 ppm siendo los resultados más efectivos para las películas de TPS/AER frente a TPS/NCC/AER y al aumentar la concentración a 5000 ppm. La caracterización previa del AER mostró como componentes principales el 1,8-cineol, alcanfor, β -mirceno, α -pineno, canfeno, bornil acetato y β - pineno y con un contenido de fenoles totales de 6,71 mg AGE/g romero, los cuales son responsables de la actividad antimicrobiana detectada en el AER.

Por lo cual, la combinación de elementos como la NCC en polímeros naturales permite obtener biocompuestos con posibles aplicaciones para la sustitución de plásticos de un solo uso y la adición de compuestos antimicrobianos como el AER puede promover una mayor vida útil y promover la inocuidad de los alimentos.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Justificación y antecedentes

Los materiales poliméricos sintéticos han sido utilizados en diferentes aplicaciones que involucran la agricultura, biomedicina, transportes, electrónica, entre otras. Sin embargo, estos se derivan de materias primas obtenidas de recursos no renovables como lo son los hidrocarburos fósiles, ocasionando que la degradación de estos productos requiera extensos periodos de tiempo. ¹ Como resultado de su disposición final, se acumulan y persisten en los vertederos o en el entorno natural, en lugar de descomponerse. ²

La creciente preocupación por los desafíos enfrentados en la eliminación de residuos de plástico a base de materiales no renovables han llevado a los investigadores e industriales a explorar las posibilidades de transformar la biomasa renovable en biopolímeros comercialmente viables y biodegradables, para el desarrollo de bioplásticos.³ Bajo este contexto, para enfrentar la contaminación por plásticos de un solo uso, el Ministerio de Salud de Costa Rica, junto con el Ministerio de Ambiente y Energía así como el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), promueven la *“Estrategia nacional para sustituir el consumo de plásticos de un solo uso por alternativas renovables y compostables 2016-2021”*. Estos han venido estimulando la inversión en proyectos productivos que contribuyan con la sustitución del plástico de un solo uso por alternativas renovables y compostables. ⁴

Una alternativa viable para el desarrollo de plásticos de fuentes renovables son los provenientes de la agroindustria. Ejemplo de ello son las plantas como el maíz, papa o yuca, entre otros; que contienen como componente mayoritario gránulos de almidón los cuales están compuestos por biopolímeros como la amilosa y la amilopectina que pueden ser utilizados para producir bioplásticos. Particularmente, la agroindustria relacionada con la producción de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) podría ser una alternativa de interés debido a que este tubérculo contiene el biopolímero almidón, el cual puede ser utilizado para producir bioplásticos. Además, la yuca ha demostrado tener una excelente adaptación a las condiciones climáticas de Costa Rica; para el año 2018 se reportó un área de 10 636 hectáreas

sembradas de yuca en Costa Rica, con una producción de 159 540 TM, convirtiéndose en la raíz tropical de mayor producción a nivel nacional. ⁵

Específicamente, el aprovechamiento del cultivo de yuca amarga en Costa Rica se encuentra limitado al uso industrial debido a que su contenido de ácido cianogénico le imposibilita ser comercializada como producto de consumo directo, como se realiza con la yuca dulce. Debido a esta situación, surge la necesidad de buscar alternativas que fortalezcan el desarrollo de nuevas fuentes de valor agregado con la generación de actividades productivas más competitivas e innovadoras; diversificando el aprovechamiento de estas variedades de yuca amarga. ⁶

El tratamiento adecuado de la yuca amarga permite la obtención de almidón nativo, el cual puede ser transformado en almidón termoplástico (TPS, por sus siglas en inglés) bajo condiciones de desestructuración y cizallamiento en presencia de plastificantes como agua y/o glicerol, entre otros. ⁷

En comparación con los polímeros termoplásticos comunes, el TPS tiene tres desventajas principales: propiedades mecánicas deficientes, baja estabilidad térmica y alta sensibilidad al agua. ^{8,9} Por esta razón, se han investigado varias soluciones para minimizar o incluso superar estos inconvenientes, entre ellos se encuentra el uso de nanomateriales de origen natural como refuerzos dentro la matriz polimérica de TPS. ¹⁰

Existen estudios basados en almidón de banano reforzado con nanofibras de celulosa aisladas de cáscaras de plátano; ¹¹ también con nanocristales de celulosa para mejorar las propiedades fisicoquímicas del bioplástico. ^{12,13} De esta manera, la nanocelulosa se presenta como uno de los materiales de refuerzo más prometedores para mejorar las propiedades mecánicas y la absorción de humedad del TPS, mejorando la resistencia ¹⁴ debido a la similitud química estructural del polisacárido del relleno nanométrico y la matriz. ¹⁵

La búsqueda del desarrollo sostenible ha motivado esfuerzos para maximizar la eficiencia del uso de materias primas y minimizar la creación de residuos. En este contexto, el uso de residuos de biomasa como materia prima para la producción de energía y materiales ha sido objeto de intensa investigación académica entre los cuales se encuentran el aislamiento y la

caracterización de la nanocelulosa de residuos agrícolas, como el rastrojo de piña ^{16,17} debido a que la utilización de estos residuos agrícolas permite una reducción significativa en el volumen de desechos acumulados en el medio ambiente y otorga un potencial comercial en la extracción de materias primas. ¹⁸

En este sentido, la agroindustria de la piña (*Ananas comosus*) representa el primer lugar de producción del sector agrícola del país. Se reportan 45 000 hectáreas sembradas con este cultivo con más de 3 millones de TM en el año 2018. ⁵ Sin embargo, la alta productividad de este genera altas cantidades de residuos agrícolas entre los que se encuentra el rastrojo de piña, que corresponde al material vegetal de la planta que es eliminado después de cada ciclo productivo. ¹⁹ Estos desechos agrícolas tienen contenidos de celulosa de entre 80-83%. ⁵ Por lo tanto, el aprovechamiento de las fibras de rastrojo de piña para obtener materiales compuestos es una forma de valorizar estos residuos agrícolas.

Por otra parte, otros componentes investigados para mejorar las propiedades del TPS corresponden a los aceites esenciales incorporados como aditivos de carácter hidrofóbico dentro de la matriz termoplástica. ²⁰⁻²², que a su vez corresponden a sustancias activas dentro de las películas biocompuestas. ²³⁻²⁵ Se consideran aditivos que pueden ser utilizados para proteger los alimentos contra la oxidación y el deterioro microbiano. ²⁶ El envasado activo proporciona seguridad microbiana para los consumidores, reduciendo, inhibiendo o retardando el crecimiento de microorganismos para extender la vida útil de los alimentos envasados. ²⁷⁻³¹ A este respecto, se han probado varios aceites esenciales como componentes funcionales para formular películas de almidón con propiedades antimicrobianas. ³²⁻³⁶

Específicamente, el aceite esencial de romero ha presentado resultados satisfactorios demostrando la eficacia antimicrobiana al ser incorporado en las películas de almidón termoplástico de diferentes fuentes vegetales. ^{36,37} Jiang Y. (2011); Castaño P., *et al* (2009) y Montero-Recalde, *et al* (2017) informaron que el aceite de romero mostró actividad antibacteriana contra bacterias grampositivas (*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*), tres bacterias gramnegativas (*Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) y dos hongos (*Candida albicans* y *Aspergillus niger*),

destacándolo como una alternativa para el desarrollo de productos más seguros aceptados por los consumidores que prefieren los ingredientes naturales. ³⁸⁻⁴⁰

El Laboratorio de Polímeros de la Universidad Nacional (POLIUNA) en el pasado ha investigado en el uso de almidón de ñame para la elaboración de adhesivos. ⁴¹ Investigaciones similares han sido reportadas en el país por Rojas, L., 2013 ⁴² en el que se reporta la elaboración de un bioplástico a base de almidón de yuca con posibilidades de poder sustituir al polietileno en la fabricación de bolsas para supermercado. Debido a lo anterior, en este trabajo se planteó la obtención de un biocompuesto a base de almidón termoplástico de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y nanocelulosa obtenida de rastrojo de piña (*Ananas comosus*) como una alternativa de sustitución de los plásticos de un solo uso, y adicionalmente, se analizó el efecto antimicrobiano proporcionado por la adición de aceite esencial de romero en la matriz polimérica.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

En este capítulo se presenta una revisión de la literatura sobre las características del almidón, y del proceso de termoplastificación que se puede llevar a cabo para obtener TPS; también se describen las características de las películas de almidón termoplástico que fundamentan la utilización de nanocelulosa cristalina como potencial refuerzo en la fabricación del biocompuesto TPS/NCC.

Por otra parte, se describen las características de los aceites esenciales y la composición del aceite de romero, que lo hacen un aditivo natural adecuado para el estudio de la actividad antimicrobiana del mismo al incorporarse dentro de la matriz termoplástica en la formulación de empaques activos para alimentos.

2.1. Plásticos biobasados como alternativa de los plásticos de un solo uso

La producción comercial de plásticos comenzó alrededor de la década de 1950⁴³, se estima que se han fabricado 8.300 millones de toneladas métricas a nivel mundial hasta el año 2015.

⁴⁴ Debido sus propiedades intrínsecas, los materiales poliméricos han encontrado una amplia aplicación en la construcción, la electrónica, el diseño automotriz, el sector salud, empaques, pinturas y recubrimientos, adhesivos y producción de energía, entre muchas otras.⁴⁵ De acuerdo con esto, aproximadamente el 4% del combustible fósil extraído anualmente se usa como materia prima para la fabricación de polímeros sintéticos; de los cuales entre un 22 y un 43 % terminan en vertederos y el entorno natural, ⁴⁹ ocasionando una contaminación generalizada debido a que los residuos plásticos derivados de fuentes no renovables pueden demorar más de 500 años en descomponerse, por lo cual se acumulan en el entorno terrestre, en los vertederos y los cuerpos de agua.^{46,47}

Las prácticas inadecuadas de gestión de residuos han provocado una importante contaminación generalizada, lo que disminuye el valor estético y recreativo de la zona, dificultando el desarrollo económico.⁴⁸ Consecuentemente, la creciente tasa de fabricación debido a la alta demanda, la falta de estrategias de mitigación de eliminación de residuos adecuadas y las regulaciones ineficientes hacen que la eliminación de desechos plásticos sea un desafío importante por resolver.⁴⁹ En este sentido, se han discutido varias estrategias para

reducir el impacto medioambiental que ha generado la inadecuada disposición de los residuos plásticos, entre estas iniciativas se encuentran el incentivar la producción de plásticos de base biológica denominados biobasados, con una gama de aplicaciones y un mercado en evolución justificado en la sostenibilidad del medio ambiente.⁵⁰ Bajo este contexto, la Comisión Europea y países como Japón, Corea y Tailandia han iniciado estrategias para promover los plásticos de origen biológico. En 2017, la producción global total de plásticos de origen biológico alcanzó 2,05 millones de TM, y se prevé que crezca un 20 % en los próximos cinco años.⁵⁰

Los plásticos biobasados se encuentran dentro de la categoría de bioplásticos y corresponden a materiales poliméricos que provienen de fuentes renovables, es decir, que son fabricados con materia prima que es renovada en dos o menos ciclos de crecimiento. Sin embargo, los plásticos biobasados no necesariamente son biodegradables o compostables.⁵¹ Por su parte, los bioplásticos corresponden a materiales que tiene las mismas propiedades del plástico convencional, pero se diferencian por tener como materia prima fuentes renovables como la soja, almidón de arroz, maíz, papa o caña de azúcar entre otros. Aunque su fuente es de origen renovable, no necesariamente el bioplástico será biodegradable, aunque sea posible reciclarlo.⁵²

Por su parte, los plásticos biodegradables son plásticos que se descomponen debido a la actividad de los microbios, como las bacterias y las algas. Algunos plásticos biodegradables pueden degradarse y los microorganismos pueden metabolizarlos completamente en dióxido de carbono y agua. En contraparte, los plásticos convencionales a menudo se mezclan con desechos orgánicos y líquidos, lo que hace que sea difícil y poco práctico reciclar el polímero sin costosos procesos de desinfección.⁵³

2.2. Características del cultivo de yuca en Costa Rica como materia prima para la generación de plásticos biobasados

La yuca (*Manihot esculenta* Crantz) es un arbusto leñoso perenne, con raíces tuberosas, de la familia Euphorbiaceae, producida en Costa Rica mayormente en la zona Huetar Norte, especialmente en San Carlos y Los Chiles y en menor cantidad en la región Huetar Caribe,

principalmente en Guácimo y Pococí.⁶ El almidón representa la mayor reserva de polisacáridos presente en tejidos fotosintéticos y se puede encontrar almacenado en semillas, tubérculos, raíces y frutos.⁵⁴ La yuca, al ser un tubérculo, es una fuente primaria de almidón, donde factores como la genética de los cultivos, el año y la temporada de siembra, así como la forma de extracción del almidón (fresco o seco) pueden influir en la composición química del mismo.⁵⁵

Como parte de la investigación, se empleó yuca amarga para la extracción del almidón debido a que su aprovechamiento se encuentra limitado al uso industrial, considerando que la yuca dulce puede ser comercializada como producto de consumo directo, lo que le permite tener mayor incidencia en el mercado. La razón principal del uso diferenciado de los tipos de yuca reside en que las especies de yuca amarga tienen un alto contenido de linamarina, un glucósido cianogénico que se encuentra en la vacuola de la planta.⁵⁶

Los glucósidos cianogénicos son un grupo de compuestos secundarios de las plantas que contienen nitrilo, los cuales a su vez liberan cianuro de hidrógeno cuando se mastican o se digieren debido a que se conduce a la hidrólisis de las sustancias; esta se lleva a cabo por la enzima linamarasa, produciendo azúcares y una cianhidrina que se descompone espontáneamente a ácido cianhídrico y una cetona o aldehído.⁵⁷

El cianuro es uno de los venenos más potentes y de acción rápida conocidos. Los cianuros inhiben los procesos oxidativos de las células, lo que hace que mueran muy rápidamente. Es por esta razón que, para consumo humano o animal, el glucósido cianogénico en tubérculos debe ser inferior a 40 mg/kg de masa fresca de tubérculos. Un contenido de mayor a lo dispuesto puede causar amargor en el tubérculo y aquellos que lo consumen pueden ser envenenados e incluso pueden morir.⁵⁶ Es por esto que los glucósidos cianogénicos juegan un papel fundamental en la organización del sistema de defensa química en las plantas al interactuar con insectos y otros depredadores.⁵⁷

2.3. Morfología granular y composición polimórfica del almidón

El almidón es un polisacárido que consiste en unidades de D-glucosa, denominadas glucopiranosas y tiene dos biomacromoléculas principales, la amilosa y la amilopectina

(Figura 1). La amilosa es un carbohidrato que tradicionalmente se considera lineal, aunque presenta escasas ramificaciones; además, la molécula de amilosa está basada en enlaces α (1-4); conformadas de 200 a 20 000 moléculas de glucosa con un peso molecular de 10^5 - 10^6 g/mol con un grado de polimerización (GP) de 600.⁵⁸

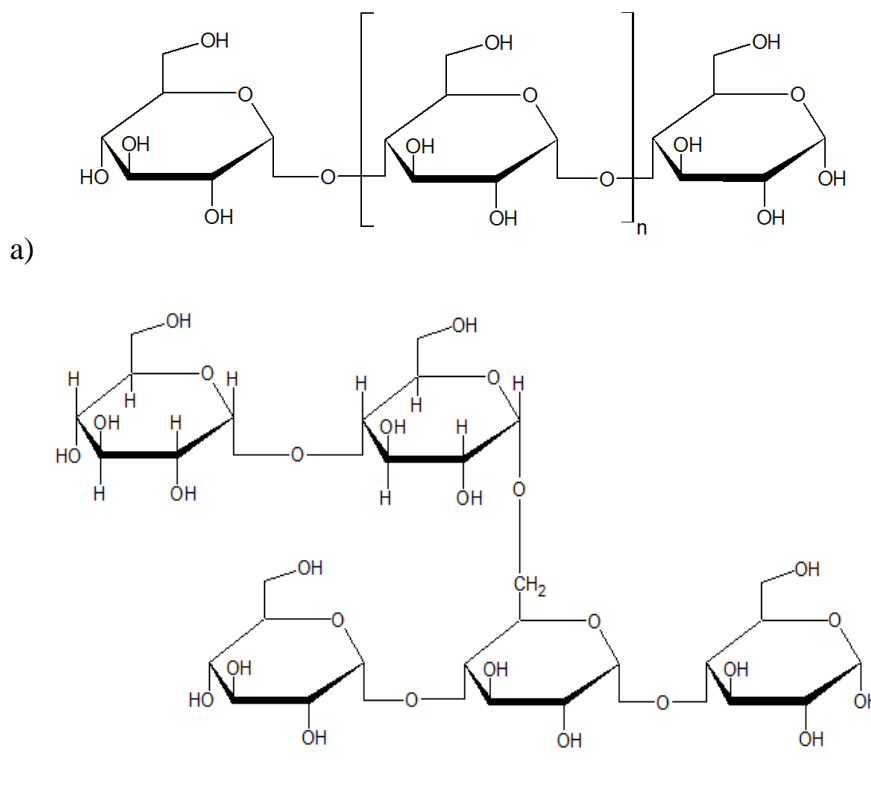


Figura 1. Estructura química de la amilosa (a) y la amilopectina (b) presente en el almidón. Adaptado de ref. 11. 2013 Progress in Polymer Science.

Por su parte, la amilopectina se encuentra en las capas exteriores del gránulo de almidón y es uno de los polímeros naturales más grandes en la Tierra, conteniendo entre 10 000 y 2 000 000 de unidades de glucosa, con un alto peso molecular de 10^7 - 10^9 g/mol. La amilopectina se compone alrededor del 95% en enlaces α (1-4) y alrededor del 5 % en enlaces α (1-6), que constituyen puntos de ramificación localizados cada 22-70 unidades de glucosa y con grupos sustituyentes que poseen un grado de polimerización (GP) de aproximadamente 15, que son principalmente responsables de la cristalinidad de los materiales.⁵⁹

El almidón se produce en los amiloplastos como gránulos semicristalinos con distinto tamaño, morfología y con diferente proporción de amilosa y amilopectina, específicos para cada especie de planta y diversas condiciones agroambientales. Sin embargo, las estructuras internas de los gránulos tienen una arquitectura notablemente similar, que consiste en anillos de crecimiento, bloques y lamelas cristalinas y regiones amorfas.⁵⁹

El gránulo de almidón muestra birrefringencia bajo luz polarizada de un microscopio óptico, con lo que es posible detectar la presencia de una estructura cristalina mediante un patrón característico llamado cruz de Malta, que extiende los brazos desde el origen del crecimiento del gránulo, denominado hilio. Este patrón de birrefringencia muestra que una gran parte de estas, están dispuestas de forma radial y sugiere un alto grado de orden dentro de los gránulos.

⁶⁰ La amilopectina es el componente dominante asociado con la región cristalina, debido a que esta se organiza en grupos cristalinos de doble hélice que conforman las láminas cristalinas. Por su parte, la amilosa posee un alto grado de polimerización que propicia una amplia longitud de la cadena, la cual tiende a enredarse con la amilopectina dando origen a la región amorfa de la estructura.⁶¹

Los compuestos menores que no contienen carbohidratos en los gránulos de almidón contribuyen a lo sumo a solo un pequeño porcentaje en peso.⁶² Las proteínas en los gránulos están relacionadas principalmente con la biosíntesis del almidón. Algunas proteínas solo se asocian de forma suelta con los gránulos, mientras que otras están firmemente unidas dentro de los gránulos, especialmente la proteína almidón sintasa I (GBSSI), necesaria para la síntesis de amilosa.⁶³

Los lípidos son raros en muchos almidones de raíces y tubérculos, pero son más abundantes en cereales en forma de ácidos grasos libres donde forman complejos de inclusión con amilosa. En muchos almidones de raíces y tubérculos, especialmente la papa, el fosfato no está asociado con lípidos, sin embargo, se une covalentemente a la amilopectina.^{63,64}

2.3.1. Almidón termoplástico (TPS)

Cuando los gránulos de almidón nativos se calientan en agua, absorben la misma y se hinchan. Algunos componentes del almidón, principalmente la amilosa, se filtra de los

gránulos y se solubiliza, haciendo que la naturaleza semicristalina del almidón y su arquitectura tridimensional se interrumpen gradualmente, lo que resulta en una transición de fase de la estructura granular ordenada a un estado desordenado en el agua, lo cual se conoce como gelación o desestructuración.⁶⁵ Las fuerzas de cizallamiento pueden desgarrar físicamente los gránulos de almidón, lo que permite una transferencia más rápida de agua hacia las moléculas interiores.⁶⁶ El almidón granular nativo se convierte así en un estado fundido y forma una masa amorfa continua que ya no muestra difracción, el cual se conoce como almidón plastificado o almidón termoplástico.¹⁰

La adición de plastificantes propicia el espaciado entre las moléculas de amilosa y amilopectina, reduciendo las interacciones y permitiendo la transición de la fase ordenada en los gránulos nativos de almidón a la fase desordenada en el material termoplástico. Los plastificantes deben tener bajas viscosidades con la finalidad de disminuir la viscosidad de la masa fundida y que el polímero tenga una mayor movilidad y el producto final sea menos quebradizo. Cuanto menor sea la viscosidad, más fácilmente se puede procesar o fabricar el material a temperaturas más bajas. Además, un requisito importante es que el plastificante se mezcle de forma homogénea con el polímero y debe tener un alto punto de ebullición para evitar su evaporación durante el procesamiento posterior y almacenamiento del producto final.⁷ Los plastificantes más comunes, como el glicerol, el glicol o el sorbitol, poseen grupos hidroxilo similares a los que aparecen en el almidón, por lo que son compatibles con los gránulos del mismo.⁶⁰

Por lo tanto, las propiedades del TPS dependen de la fuente del almidón que determina la relación y la proporción de amilosa y amilopectina, a su vez estas características determinan la temperatura de producción de almidón y del contenido de agua, así como de la cantidad y el tipo de plastificantes.⁶¹

2.3.2. Cristalinidad y envejecimiento post-proceso

Inmediatamente después del procesamiento, el TPS muestra un comportamiento estructural opuesto con respecto a la morfología granular. En el termoplástico, el almidón muestra una baja cantidad de cristalinidad residual originada por la amilosa que es en gran parte responsable del endurecimiento inicial del gel y la amilopectina formará parte del

componente amorfo. Sin embargo, después del enfriamiento, el almidón gelatinizado y el agua experimentan interacciones moleculares mediante enlaces de hidrógeno que conducen a un reordenamiento de las cadenas de almidón, dando como resultado la recristalización parcial de las moléculas. La recristalización lenta de la amilosa y la amilopectina provoca la expulsión de las moléculas de agua u otros disolventes utilizados. A esta cristalización de almidón gelatinizado desde un estado amorfo se le conoce como retrogradación.⁶⁷ Este se considera uno de los principales problemas del material amiláceo en el almacenamiento.⁶⁴

La tasa de cristalización de TPS durante el almacenamiento se ve afectada sustancialmente por el contenido de plastificante debido a que este impide que las cadenas que ahora están desordenadas, se agrupen en forma ordenada y formen zonas cristalinas. El uso de agua como plastificante propicia que las tasas de cristalización aumenten con el crecimiento del contenido de agua debido a que esta se evapora en el secado y migra fuera de la matriz polimérica permitiendo que las cadenas se reagrupen ordenadamente. A diferencia del agua, el glicerol dura más tiempo en migrar fuera de la matriz y al mismo tiempo retiene agua consigo por medio de interacciones tipo puente de hidrógeno, lo cual reduce las tasas de cristalización.⁶⁸

2.4. Aplicación de fibras naturales en el procesamiento de biopolímeros

Frente a los polímeros tradicionales derivados del petróleo, el almidón termoplástico presenta desventajas tales como su solubilidad en agua, interacción de la matriz con la humedad ambiental, envejecimiento rápido debido a la retrogradación y pobres propiedades mecánicas, lo cual limita algunas de sus posibles aplicaciones tales como la utilización como material de empaque. Una de las soluciones más relevantes para estos problemas es el uso de materiales compuestos constituidos por una matriz y un refuerzo.⁶⁹

Los constituyentes de los materiales compuestos tienen propiedades mecánicas significativamente diferentes, que permanecen separadas y distintas dentro de la estructura terminada. Los refuerzos imparten propiedades físicas especiales para mejorar las propiedades de la matriz. Este sinergismo produce propiedades en los materiales compuestos que no se presentan en los materiales naturales por separado.⁷⁰

Dentro de los refuerzos naturales que pueden ser utilizados para mejorar las características físicas del TPS se encuentra la celulosa, debido a ventajas tales como su abundante disponibilidad en la biomasa terrestre; además es biodegradable, renovable y exhibe buenas propiedades mecánicas.⁶⁹

2.4.1. Aprovechamiento del rastrojo de piña como fuente de nanocelulosa

La piña (*Ananas comosus*) forma parte de la familia de las bromeliáceas, hecho que ubica sus cultivos en las áreas de clima tropical como Costa Rica.²⁰ La piña es un cultivo perenne, por lo que se pueden obtener dos cosechas en 27 meses. Una vez transcurrido este período debe eliminarse la biomasa, conocida como rastrojo y preparar el suelo para iniciar un nuevo ciclo de producción. A nivel nacional, alrededor de 13 millones de toneladas métricas de rastrojo anualmente se transforma en desecho.¹⁹ El manejo convencional para la eliminación del rastrojo incluye la aplicación de herbicida como desecante de la planta, quema en algunos casos y la corta e incorporación a residuos sólidos.^{71,72}

Como resultado del manejo inadecuado de los desechos del cultivo, se produce la proliferación de la mosca de los establos, ya que el proceso de descomposición de la materia orgánica favorece que el ciclo biológico de la mosca se complete. Este insecto afecta directamente al ganado provocándole estrés al animal, bajando su producción de leche y carne. Las lesiones causadas por el insecto constituyen un medio ideal para el ingreso de virus, parásitos y bacterias, entre otros. La situación de contagio de enfermedades es la misma para cualquier mamífero incluyendo personas.^{71,72}

En esta investigación se pretende utilizar rastrojo de piña como un residuo valorizable para la obtención de nanocelulosa. Al proporcionar una alternativa de uso, se disminuyen los problemas de disposición del rastrojo, con la consecuente disminución del impacto ecológico de la producción agrícola de piña.

2.4.2. Composición química de las fibras vegetales

Las fibras naturales se componen de una pared celular que es una membrana heterogénea que consiste de microfibrillas de celulosa enrolladas helicoidalmente que actúan como el componente de refuerzo y proporcionan cristalinidad y fuerza a la célula; estas microfibrillas

están unidas por una matriz de lignina amorfa que actúa como una fase hecha de polímero fenólico y ocupa el espacio vacío entre celulosa, hemicelulosa y los compuestos de pectina.

73

La hemicelulosa se comporta como aglutinante de la fibra de celulosa y la lignina, formando un sistema compuesto de fibras reforzadas. La hemicelulosa es una estructura de carbohidratos complejos compuesta por varios azúcares de cinco y seis átomos de carbono tales como xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa y manosa.⁶⁹ Finalmente, la pectina actúa como un agente de unión para la interacción de la pared celular primaria con las paredes adyacentes de otras células vegetales.⁷⁴ Las condiciones climáticas, la edad y el proceso de digestión influyen en la estructura de las fibras y en su composición química.⁷⁰

2.4.2.1. Celulosa

La glucosa es la hexosa más típica y se representa mediante la fórmula $C_6H_{12}O_6$. Sin embargo, la forma en que se enlazan las moléculas de glucosa puede generar varios isómeros distintos como alfa glucosa y beta glucosa. Este tipo de estructuras poseen propiedades completamente diferentes; ejemplo de ello se muestra en los enlaces glucosídicos alfa que se combinan para generar almidón, mientras que los enlaces glucosídicos beta forman la celulosa.⁷⁵ La celulosa está compuesta por subunidades de D-glucosa unidas por enlaces β -(1,4) de manera lineal. La unidad de repetición es un dímero de glucosa, conocido como celobiosa (Figura 2).

La celulosa posee un grado de polimerización que va desde 10 000 a 20 000, siendo uno de los polímeros naturales más importantes producidos en la biosfera, y se considera el polímero renovable más abundante en la Tierra.⁷⁴

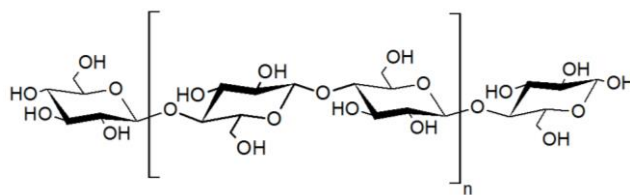


Figura 2. Estructura química representativa de la celulosa. Adaptado de ref. 39. 2018

En general, la celulosa es una sustancia fibrosa, dura e insoluble en agua que desempeña un papel esencial en el mantenimiento de la estructura de las paredes celulares de las plantas. En la naturaleza, la celulosa no se produce como una molécula individual aislada, sino que se encuentra como conjuntos de fibras formadoras de cadenas de celulosa individuales. La jerarquía morfológica está definida por fibrillas elementales, que se agrupan en unidades más grandes llamadas microfibrillas, que a su vez se ensamblan en fibras. Dentro de las fibrillas de celulosa hay regiones en las que las cadenas de celulosa están dispuestas en una estructura altamente ordenada (cristales) y regiones desordenadas (amorfas). Estas regiones no poseen fronteras bien definidas, pero parece existir una transición de una zona ordenada de las cadenas de celulosa a un estado desordenado o amorfo, en la cual estas cadenas presentan una orientación menor.⁷³

La región cristalina se debe a la unión de moléculas por puentes de hidrógeno, dando a la fibra resultante buena resistencia e insolubilidad en la mayoría de los disolventes; estas interacciones también evitan que la celulosa funda, es decir, no es termoplástica.⁷⁴ En las regiones menos ordenadas, las cadenas están más separadas y disponibles para formar enlaces de hidrógeno con otras moléculas, como el agua. Es por esta razón que la mayoría de las estructuras de celulosa pueden absorber grandes cantidades de agua haciéndolas higroscópicas. Por lo tanto, la celulosa se hincha pero no se disuelve en agua.⁶⁹

2.4.2.2. Nanocelulosa

La nanocelulosa es obtenida a partir de fuentes celulósicas renovables, que se utiliza para aumentar las propiedades mecánicas y mejorar la estabilidad térmica de los compuestos poliméricos, debido a que la nanocelulosa posee una estructura morfológica más uniforme que en la biomasa lignocelulósica, tiene un gran potencial como refuerzo en la fabricación de nanocompuestos. La calidad de la nanocelulosa, así como el rendimiento, dependerían de la fuente de biomasa lignocelulósica y el método de extracción.⁷⁶

La celulosa en la biomasa lignocelulósica se puede desintegrar en materiales de dimensión nanométrica mediante el uso de métodos apropiados. La extracción de nanocelulosa de la biomasa celulósica incluye dos pasos principales denominados pretratamiento y blanqueamiento. El objetivo principal del pretratamiento es eliminar cierta cantidad de

lignina, hemicelulosa, cera y aceites que cubren la superficie externa de la pared celular de la fibra. El tratamiento con álcali despolimeriza la estructura de celulosa nativa, desfibrila las microfibrillas de celulosa externas y expone cristales de longitud corta. Por su parte, el blanqueamiento es requerido para eliminar completamente el material cementante de la fibra.

77

Utilizando diferentes métodos, se pueden aislar dos tipos de nanocelulosa a partir de celulosa vegetal, denominados celulosa nanocristalina (NCC, por sus siglas en inglés) y celulosa nanofibrilada (NFC, por sus siglas en inglés).⁷⁸

El principal método para aislar NCC de las fibras de celulosa se basa en el tratamiento químico mediante hidrólisis ácida suave. El ácido se puede infiltrar fácilmente dentro de las regiones amorfas de la celulosa y hace que se hidrolice, mientras que las regiones cristalinas se pueden mantener debido a su mayor resistencia al ataque ácido. Por lo tanto, después del tratamiento con ácido, se producen nanocristales similares a varillas.⁷⁸

Los nanocristales de celulosa presentan diferentes dominios cristalinos de las fibras celulósicas denominados bigotes, nanofibras o cristales de celulosa, aislados mediante diferentes condiciones de hidrólisis ácida, y se denominan de esta manera debido a sus características físicas de rigidez, grosor y longitud.⁷⁶ Los cristales son de interés principalmente por sus propiedades físicas y mecánicas, que incluyen alta rigidez, resistencia y relación de aspecto. Estas propiedades hacen que los NCC sean una excelente opción para usar como refuerzo en varios nanocompuestos de polímeros.

El ácido sulfúrico y el ácido clorhídrico se usan ampliamente para aislar NCC, los mismos reaccionan con el grupo hidroxilo de la superficie, introduciendo grupos de sulfato con carga negativa en la superficie del NCC. Estos grupos inducen fuerzas de repulsión y promueven la dispersión de NCC en el agua. Las dimensiones de los NCC varían de 10 a 50 nm de ancho y de 100 a 500 nm de longitud, además tienen una relación de aspecto de entre 10 y 67 según los materiales de partida y las condiciones de hidrólisis.⁷⁸

Por otra parte, la estructura de NFC se compone de las partes amorfas y cristalinas de la fibra de celulosa original, que se puede aislar del algodón, la madera y las plantas mediante

tratamiento mecánico. Las fibras poseen una alta relación de aspecto de aproximadamente 100, con una longitud de unos pocos micrómetros y un ancho de 2-60 nm. Sin embargo, debido al fuerte enlace de hidrógeno entre las nanofibras, la fibrilación mecánica requiere mucho tiempo y energía, lo cual es una gran barrera para aplicaciones comerciales.⁷⁸

2.5. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales

Las nuevas formas de proteger los alimentos contra factores internos y externos y de prolongar la vida útil de los alimentos han alentado a la industria alimentaria a desarrollar nuevos conceptos de envasado, entre ellos se encuentra el envasado activo en el cual las sustancias responsables de la función activa del empaque se pueden incorporar directamente en el material de empaque e interactuar con la superficie de los alimentos, absorbiendo o liberando compuestos desde/hacia el alimento y al exterior. Esto permite extender la vida útil de los productos alimenticios, mantener o mejorar las propiedades de los alimentos envasados y monitorear ciertas condiciones del ambiente en el cual los alimentos están expuestos. Además de la protección extendida de los productos alimenticios, estos paquetes pueden fabricarse con materiales biobasados y/o biodegradables.³⁷

El envasado activo comprende empaques antimicrobianos activos. Estos paquetes están formados por una matriz polimérica que contiene los aditivos como aceites esenciales que protegen los alimentos contra los patógenos alimentarios.³¹ Por otra parte, debido a las demandas de los consumidores en la actualidad, existe una tendencia a buscar aditivos naturales debido a que han sido considerados como aditivos alimentarios generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Drogas y Alimentos;⁸² mientras que los aditivos sintéticos se han asociado con efectos secundarios negativos para la salud humana.⁸³

En este sentido, estos nuevos materiales de envasado activos se pueden aplicar a los alimentos como recubrimientos o películas, razón por la cual se han investigado fuentes alternativas de antimicrobianos, como extractos y aceites esenciales derivados de plantas, como canela (*Cinnamomum zeylanicum Blume*), romero (*Rosmarinus officinalis L.*) y orégano (*Origanum*

vulgare L.), aceite de naranja, entre otros; que se han incorporado con éxito en matrices poliméricas presentando actividad antibacteriana y/o antifúngica.^{34,35,84,85}

2.5.1. Aceite esencial de romero

Los aceites esenciales son líquidos producidos naturalmente como metabolitos secundarios por una especie de planta específica y han sido utilizados desde la antigüedad como aromatizante y en la medicina tradicional ancestral. El aceite esencial puede ser extraído de diferentes partes de plantas como las flores, brotes, semillas, hojas, tallos y corteza.⁸⁶⁻⁸⁸ Además, están compuestos principalmente por terpenoides, compuestos fenólicos y aromáticos. Sin embargo, la composición y las propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales están muy influenciadas por la especie, parte de las plantas utilizadas, origen geográfico, tiempo de cosecha, etapa de desarrollo, edad de las plantas y método de extracción. Estos son los factores que determinan la función biológica de estos aditivos naturales de naturaleza hidrófoba.^{84,89}

Específicamente el aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis L.*) es una planta aromática perteneciente a la familia Lamiaceae. Es una hierba leñosa y perenne con hojas fragantes, perennes, con forma de aguja y flores blancas, rosadas, moradas o azules. El romero se ha utilizado durante miles de años para propuestas culinarias y medicinales, debido a sus propiedades aromáticas y beneficios para la salud.⁹⁰

Las actividades biológicas de esta planta están relacionadas principalmente con los componentes fenólicos y volátiles como el carnosol, el ácido carnósico y el ácido rosmarínico presentes en el extracto de romero y α -pineno, (-) acetato de boro, alcanfor y eucaliptol presentes en el aceite esencial de esta planta.⁹¹ Los componentes menores pueden tener una influencia potencial en la actividad biológica debido a la posibilidad de un efecto sinérgico entre sus componentes. En cuanto a los componentes asociados a la actividad antimicrobiana se encuentran los compuestos volátiles 1,8-cineol, alcanfor, eugenol y α -pineno, y el compuesto fenólico del ácido carnósico.⁹²

Las plantas aromáticas son ricas en aceites volátiles, que dan aromas agradables. Los compuestos aromatizantes importantes en el romero son hidrocarburos monoterpenos,

monoterpenos oxigenados, hidrocarburos sesquiterpénicos, sesquiterpenos oxigenados, ésteres, cetonas, fenol, alcohol y otros.⁹³

Los estudios han señalado la variabilidad del perfil de composición y el rendimiento del aceite debido a la influencia de factores como los procesos de extracción, las especies, la parte de la planta utilizada, el origen geográfico, el momento de la cosecha, etapa de desarrollo de la planta y edad.⁹⁴ Además de esto, la composición del romero puede verse influenciada por el tipo de almacenamiento (fresco, seco o congelado), el método de secado y el tipo de disolvente utilizado para la extracción.⁹³

2.5.2. Determinación de la mínima concentración inhibitoria (MIC)

Las plantas y otras fuentes naturales pueden proporcionar una amplia gama de compuestos estructuralmente diversos como los extractos vegetales y microbianos, aceites esenciales, metabolitos secundarios puros y nuevas moléculas sintetizadas como posibles agentes antimicrobianos.⁹⁵ En este sentido, es fundamental definir la concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) del agente antimicrobiano en estudio para determinar la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento de microorganismos visibles y con ello definir los posibles usos del agente antimicrobiano.³⁴ De acuerdo con esto, existen una variedad de métodos de laboratorio para evaluar o detectar la actividad antimicrobiana in vitro de un extracto o un compuesto puro. Los métodos más conocidos y básicos son de difusión de discos y métodos de dilución que describen las técnicas de preparación, inoculación, medio de crecimiento y condiciones de incubación adecuadas para cada propósito.⁹⁵

Específicamente los métodos de dilución de agar son los más apropiados para la determinación de los valores de MIC, ya que ofrecen la posibilidad de estimar la concentración del agente antimicrobiano probado en el agar.³⁴

El método de dilución de agar implica la incorporación de concentraciones deseadas variables del agente antimicrobiano en un medio de agar fundido, seguido de la inoculación de un inóculo microbiano definido en la superficie de la placa de agar. El punto final de MIC se registra como la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe

completamente el crecimiento en condiciones de incubación adecuadas. Esta técnica es adecuada para pruebas de susceptibilidad tanto antibacterianas contra bacterias gram positivas y gram negativas como antifúngicas.⁹⁵

2.6. Propiedades clave de los materiales de empaque utilizados como plásticos de un solo uso

Los materiales de embalaje derivados de plásticos son generalmente livianos, fáciles de modelar en diferentes formas y económicos con respecto a metales, madera y textiles. Esta versatilidad es en gran parte responsable de su crecimiento en el uso: la capacidad de adaptar cuidadosamente el rendimiento de un recipiente de plástico a las necesidades del producto, el mercado y las demandas de la cadena de suministro, significa que existe una solución “plástica” para casi todos problemas de embalaje. La mayoría de las soluciones se encuentran entre los polietilenos (LDPE, LLDE, HDPE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC) y polietileno tereftalato (PET).⁷⁹

Las principales industrias dependen de ellos en aspectos relacionados con el empaque de productos y materiales tan variados como partes de automóviles, materiales de ferretería, librería, equipos electrónicos, textiles, artículos para el hogar, alimentos, entre otros que utilizan material plástico denominado “plásticos de un solo uso”, pues estos empaques son retirados para conservar el contenido. Al considerar el rendimiento de los materiales plásticos, las propiedades de mayor interés en las aplicaciones de embalaje y su relevancia en el uso se resumen a continuación.⁷⁹

La determinación de la composición química de un material plástico puede realizarse por Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier y con ello determinar la interacción entre la matriz y sus aditivos, así como la estabilidad química que describe la compatibilidad de un polímero para estar en contacto directo con una variedad de diferentes tipos de productos a empacar.⁷⁹

La resistencia a la tracción y el alargamiento son probablemente de mayor relevancia práctica. En lo que respecta a las películas y laminados, estas deben resistir la tensión de pasar a través de una estación de formación sin estirarse ni romperse, y las bolsas deben

resistir la fuerza del peso del producto al caer en su lugar sin distorsión. Para el envasado por estirado de tarimas, se requiere una película con alto alargamiento, siendo el material más utilizado el polietileno lineal de baja densidad. La resistencia a la tracción es una propiedad direccional y las especificaciones indicarán los valores en la dirección transversal y de la máquina. Las propiedades de alargamiento a la rotura también influyen en la flexibilidad del material desgarrado durante la formación de la máquina como en la manipulación posterior. En general, los plásticos tienen una buena resistencia a la rotura, en comparación, por ejemplo, con el papel.⁷⁹

Otras propiedades importantes son la temperatura de transición vítrea (T_g) y la temperatura de fusión (T_m) de los plásticos, donde, la T_g es el punto en el que el material cambia de un estado vítreo a un estado gomoso y se produce en las regiones amorfas de un polímero, mientras que la T_m es la temperatura a la que se funden las regiones cristalinas de un polímero y, por tanto, siempre es superior a T_g . Por lo que, los polímeros totalmente amorfos (por ejemplo, poliestireno) no tienen temperatura de fusión y los termoestables no tienen temperatura de transición vítrea (debido a su alto grado de reticulación). Para la determinación de la T_m se utiliza la caracterización por medio de la calorimetría de barrido diferencial.⁷⁹

Las propiedades de barrera contra la humedad de los plásticos determinan su idoneidad para proporcionar la vida útil requerida del producto. Los datos que se muestran en el cuadro 1 corresponden a la compilación de propiedades de los materiales de embalaje principales utilizados en la industria plástica presentes en las investigaciones realizadas por Mangaraj S., *et al.*; 2009⁸⁰ y Keller P. y Kouzes R., 2017⁸¹ que pueden usarse como un punto de partida para seleccionar qué plásticos pueden ser adecuados con respecto a la temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión, densidad, propiedades mecánicas y de barrera.⁷⁹

Cuadro 1. Propiedades de los materiales de embalaje principales utilizados en la industria plástica.

| Propiedades | Polietileno | | | Poli propileno | Cloruro de polivinilo | Polietileno tereftalato (PET) | |
|--|-------------|-------------|-----------|----------------|-----------------------|-------------------------------|-----------|
| | LDPE | LLDPE | HDPE | PP | PVC | Desorientada | Orientada |
| Tg (°C) | -120 | -120 | -120 | -10 | 75–105 | 73–80 | 73–80 |
| Tm (°C) | 105–115 | 122–124 | 128–138 | 160–175 | 212 | 245–265 | 245–265 |
| Densidad (g/cm³) | 0.915–0.940 | 0.915–0.935 | 0.94–0.97 | 0.89–0.91 | 1.35–1.41 | 1.29–1.40 | 1.40 |
| Modulo elástico (GPa) | 0.2–0.5 | - | 0.6–1.1 | 1.1–1.5 | 4.1 | 2.8–4.1 | - |
| Resistencia a la tracción (Mpa) | 8–31 | 20–45 | 17–45 | 31–43 | 10–55 | 48–72 | 220–270 |
| Elongación (%) | 100–965 | 350–850 | 10–1200 | 500–650 | 14–450 | 30–3,000 | 70–110 |
| WVTR | 375–500 | 375–500 | 125 | 100–300 | 700-750 | 390–510 | 440 |
| WVTR* | 15-25 | 15-25 | 5-12 | 3-7 | 20-30 | 16-20 | 16-20 |
| WVP | 0.112 | 0.112 | 0.0148 | 0.0575 | 0.451 | 0.213 | 0.213 |

Tg: temperatura de transición vítrea (° C) ⁸⁰

Tm: temperatura de fusión (° C) ⁸⁰

WVTR: tasa de transmisión de vapor de agua a 37,8 ° C y 90% de HR (gµm/m²día) ⁸⁰

WVTR* = Velocidad de transmisión de vapor de agua para película de 25 µ de película en g/m²h; condiciones de prueba 38 ° C, 90% de humedad relativa (conversión de unidades, fuente propia).

WVP= Permeabilidad de vapor de agua en g·mm·m⁻²·d⁻¹ a 1 atm. ⁸¹

Las propiedades ópticas como la transparencia y el brillo influyen principalmente en la estética del envase. Si el producto tiene una apariencia atractiva y es estable a la exposición a la luz, entonces puede ser deseable un paquete muy transparente. Los polímeros totalmente amorfos son transparentes; a medida que aumenta el grado de cristalinidad, la transparencia disminuye y los materiales se vuelven opacos.

Con respecto a la industria alimentaria y farmacéutica, los polímeros utilizados en empaque requieren el análisis de la actividad antimicrobiana para garantizar la salubridad y preservación del producto contenido en el empaque. Las secciones 2.12 y 2.14 detallan los fundamentos que sustentan este requerimiento en los materiales de envasado.

CAPÍTULO III. OBJETIVOS

Objetivo general

Producir un biocompuesto a base de almidón termoplástico de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y nanocelulosa obtenida de rastrojo de piña (*Ananas comosus*) como una alternativa para la sustitución de plásticos de un solo uso.

Objetivos específicos

- i. Obtener almidón a partir de yuca amarga (*Manihot esculenta* Crantz) y nanocelulosa a partir de rastrojo de piña (*Ananas comosus*).
- ii. Elaborar un biocompuesto a base de almidón de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) y de nanocelulosa obtenida del rastrojo de piña (*Ananas comosus*).
- iii. Evaluar la funcionabilidad del biocompuesto mediante análisis térmicos, ensayos mecánicos y morfológicos para la sustitución de plásticos de un solo uso.

CAPÍTULO IV. METODOLOGÍA

La variedad de yuca amarga utilizada en esta investigación fue suministrada por la Estación Experimental los Diamantes localizada en Guápiles, la cual está adscrita al Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA) perteneciente al Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y el grupo PCI Rojas en San Carlos. Por otra parte, el rastrojo de piña utilizado fue donado por la empresa piñera Santa Clara ubicada en la provincia de Heredia, específicamente en la zona de Sarapiquí. En cuanto al romero utilizado, este fue obtenido en el Valle del Cauca, Cali, Colombia.

En este trabajo se elaboraron materiales termoplásticos a partir de almidón TPS y de manera comparativa se elaboraron biocompuestos de TPS/NCC utilizando nanocelulosa cristalina como refuerzo de la matriz. Además, se evaluó el efecto antimicrobiano de la adición de aceite esencial de romero a la matriz polimérica tanto de TPS como de TPS/NCC. Para todas las formulaciones se utilizaron glicerol y agua como agentes plastificantes. Para cada uno de los materiales elaborados se evaluaron las propiedades físicas, térmicas y mecánicas.

Para la selección de las materias primas, yuca, rastrojo de piña y romero, se realizó un muestreo no probabilístico de tipo casual, en el que el procedimiento de selección desconoce la probabilidad que tienen los elementos de la población para integrar la muestra y la selección de los mismos es arbitraria, es decir, sin un juicio o criterio preestablecido.

4.1. Extracción del almidón obtenido de la yuca amarga

4.1.1. Proceso de extracción del almidón a partir de la yuca

Para la extracción del almidón se siguió el procedimiento descrito por Cortés: ⁹⁶

Equipos y materiales:

- Cuchillo.
- Licuadora industrial Waring modelo LB20 EG/ES.
- Tamices de 80 y 100 MESH.
- Tamizador W. S. Tyler Incorporated, Tipo Sieve Shaver, Modelo RX-86.
- Recipientes cilíndricos plásticos con tapa.

- Estufa de convección forzada ESCO modelo OFA-110-8.
- Bandejas de acero inoxidable.

Procedimiento:

Se utilizaron 5 kg de raíces frescas e íntegras de yuca, lavadas, peladas y cortadas en cubos de 5 centímetros aproximadamente. Se homogenizaron en una licuadora industrial con agua potable en una proporción tubérculo y agua de 2 a 1, por 3 minutos hasta obtener una pasta homogénea; esta se hizo pasar por un tamiz 80 MESH con lavados consecutivos de agua. El filtrado que contenía el almidón se recolectó en recipientes plásticos y se almacenó a 8 °C por 24 horas para sedimentación del almidón. Posteriormente se decantó el líquido sobrenadante y se efectuaron 5 lavados con agua al sólido obtenido, dejando reposar en refrigeración 24 horas entre cada lavado. Esto se hace con el fin de eliminar posibles impurezas que hubiesen atravesado la malla. Se realizó una última decantación colocando el almidón en bandejas y se procedió a secar en un horno entre 50 °C y 60 °C, hasta que alcanzó un porcentaje de humedad alrededor del 12 %. Una vez seco el almidón, se tamizó en un MESH 100 para obtener un tamaño de partícula menor a 0,150 mm.⁹⁶ Para determinar el porcentaje de rendimiento en la obtención de almidón a partir de yuca se utiliza la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento de extracción de almidón} = \frac{mf}{mi} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:

mi= masa inicial de yuca pelada en base seca.

mf= masa almidón obtenida en base seca.

4.1.2. Caracterización del almidón obtenido de la yuca amarga

4.1.2.1. Microscopía óptica

Se realizaron estudios de microscopía óptica en el Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica. El análisis pretendía comprobar

la extracción de los gránulos de almidón de yuca y realizar una comparación de los mismos con el almidón comercial de papa.

Equipos y materiales:

- Almidón extraído de yuca CM7951-5.
- Almidón comercial de papa Sigma Aldrich.
- Microscopio óptico invertido Olympus IX51 acoplado a una cámara Olympus DP71.

Procedimiento:

Se realizó una dispersión manual de la muestra de almidón en agua, luego se colocó en un portaobjetos y se observó a un aumento de 40 x.

4.1.2.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los gránulos de almidón nativo fueron analizados por microscopía electrónica de barrido (SEM) en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

Equipos:

- Microscopio Electrónico de Barrido (FE-SEM) con EDS, marca TESCAN modelo MIRA 3 LMU.

4.1.2.3. Cuantificación del almidón

La cuantificación del almidón total para la muestra de almidón de yuca de la variedad 7951-5 y almidón comercial de papa fue realizada en el Centro Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CITA) de la Universidad de Costa Rica (UCR) mediante la utilización de un kit enzimático comercial.

4.1.2.4. Determinación de la temperatura de gelación del almidón

Para la determinación de la temperatura de gelación del almidón se siguió el método descrito por Sandí: ⁴¹

Equipos, materiales y reactivos:

- Almidón comercial de papa Sigma Aldrich.
- Balanza analítica Mettler, AE200.
- Micropipeta de 1 – 10 μL .
- Cápsulas de aluminio de DSC.
- Analizador DSC Perkin Elmer Modelo: Pyris DSC-6.
- Nitrógeno gaseoso grado industrial PRAXAIR.

Procedimiento:

Se midieron 3 mg del almidón en forma de polvo fino y se colocaron en una cápsula de aluminio para ser analizados por DSC y se le adicionaron 9 μL de agua destilada. La cápsula se selló y se dejó reposar durante un día. Luego se procedió a introducir la cápsula en el DSC y se hizo un barrido de temperatura desde 25 °C a 170 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min en una atmósfera inerte utilizando un flujo de nitrógeno de 20 mL/min. Finalmente se reportó la temperatura inicial (T_0), temperatura máxima (T_M) (temperatura de gelación) y la temperatura final (T_f), así como la entalpía de gelación (ΔH).

4.1.2.5. Determinación del contenido de amilosa

Para la determinación del contenido de amilosa en el almidón se siguió el método descrito por Cortés: ⁹⁶

Equipos, materiales y reactivos:

- Espectrofotómetro UV-VIS THERMO SCIENTIFIC Evolution™ 201/220.
- Balanza analítica Mettler, AE200.
- Agitador-calentador Thermo Scientific, Cimarec SP131325.
- Micropipeta de 1 – 1000 μL .
- Baño de cobre.
- Beakers, 25 mL.
- Pastilla magnética.

- Balón aforado, 50 mL y 100 mL.
- Hidróxido de sodio (NaOH), Fisher Scientific.
- Ácido clorhídrico (HCl), Sigma Aldrich.
- Tartrato de hidrógeno y potasio, Sigma Aldrich.
- Yodo (I₂) sólido, Sigma Aldrich.
- Yoduro de potasio (KI), Sigma Aldrich.

Procedimiento:

Se prepararon 100 mL de disolución de yodo-yoduro (reactivo de Lugol), disolviendo 2,0 g de yoduro de potasio en 50 mL de agua destilada y luego adicionando 0,2 g de yodo; una vez disuelto el yodo se aforó a 100 mL.

Luego se preparó una disolución madre de 0,9 mg/mL tomando una masa de 0,09 g de amilosa y adicionando 1 mL de etanol, 10 mL de agua y 2 mL de hidróxido de sodio al 10 % m/v; la misma se colocó en baño de agua hirviendo con agitación constante. Una vez disuelta la masa medida, se realizó un trasvase cuantitativo a un balón de 100 mL y se aforó con agua destilada.

Posteriormente, se elaboró una curva de calibración utilizando las siguientes disoluciones patrón: (0,2; 0,1; 0,05; 0,025; 0,0125; 0,0050 y 0,0025) mg/mL de amilosa. Para la elaboración de las disoluciones patrón se debe colocar la alícuota correspondiente de la disolución de 0,9 mg/mL de amilosa y adicionando 1 mL de la disolución de yodo – yoduro y completando el aforo con agua destilada. Finalmente, se realizó un barrido en el espectrofotómetro UV-VIS de la disolución con concentración intermedia con el fin de encontrar la longitud de onda de máxima absorción (generalmente se localiza alrededor de 622 nm).

Para la determinación del contenido de amilosa en la muestra se midió 1 mg de la muestra en un beaker y se dispersó en 2 mL de agua destilada. Se adicionó gota a gota 1 mL de NaOH 1 mol/L y se calentó por 3 min en un baño de agua en ebullición. Se enfrió y neutralizó con HCl 1 mol/L y se agregaron de 0,16 g de tartrato de hidrógeno y potasio. Posteriormente se trasvasó cuantitativamente a un balón aforado de 100 mL, se adicionó 1 mL de disolución de yodo-yoduro, se mezcló y se dejó reposar por 20 min. Finalmente, se realiza la determinación

de la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro UV-VIS a longitud de onda de máxima absorción determinada mediante el barrido de la muestra; experimentalmente se realizó a 622 nm.

4.2. Extracción de la fibra vegetal y caracterización las materias primas relacionadas al rastrojo de la piña

El material recolectado se lavó para eliminar la suciedad proveniente del campo, luego se descartó el tallo y la raíz y se procedió a decorticar las hojas húmedas, es decir, a retirar la corteza de la hoja de piña utilizando una decortadora del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC) para obtener la fibra vegetal.

La composición de las hojas del rastrojo de la piña decortizadas fue analizada por el Laboratorio de Química de la Atmósfera (LAQAT) de la Universidad Nacional. Estas mediciones se realizaron de acuerdo a las normas establecidas por la *American Standard Testing Materials* (ASTM) para cada uno de los parámetros analizados tales como porcentaje de humedad ASTM D4442-92,⁹⁷ cenizas ASTM E1755-01,⁹⁸ hemicelulosa y holocelulosa ASTM 1104-56⁹⁹ y α -celulosa ASTM D 1103-60.¹⁰⁰

4.2.1. Aislamiento de la nanocelulosa cristalina (NCC) obtenida del rastrojo de la piña

4.2.1.1. Separación de la celulosa del sustrato entero

Para la separación de la celulosa de los demás componentes del sustrato se siguió el procedimiento descrito por Mohamad Haafiz:¹⁰¹

Equipos, materiales y reactivos:

- Agitador-calentador Thermo Scientific, Cimarec SP131325.
- Agitador de vidrio.
- Balanza analítica Mettler, AE200.
- Beakers, 1L.
- Bomba de vacío KNF Neuberger Laboport.
- Embudo Büchner.

- Hidróxido de sodio (NaOH) en gránulo, Fisher Scientific.
- Hipoclorito de sodio (NaClO), Sigma Aldrich.
- Kitasato, 500 mL.
- Papel filtro Sartorius Stedim, grado 1288 FT-3-206-125, cualitativo.
- Papel pH 0 ~ 14.
- Pastilla magnética.
- Termómetro, $\Theta_{\text{máx}}$: 150 °C.

Procedimiento:

Se midió la masa de 400 g del material decorticado, se trató con 1 litro de disolución de hidróxido de sodio (NaOH) al 2 % m/v a 80 °C por 4 h con agitación mecánica constante. Luego se filtró con agua destilada hasta que la muestra fue neutralizada, se blanqueó con 1L de hipoclorito de sodio (NaClO) al 3 % m/v durante 4 h a temperatura ambiente y agitación constante y se llevó a pH neutro. Finalmente, se adicionaron 2 gotas de cloroformo para evitar el crecimiento bacteriano y se almacena el material sólido en refrigeración a aproximadamente 10 °C.

4.2.1.2. Aislamiento de nanocelulosa cristalina (NCC)

Se siguió el procedimiento descrito por Santos para el aislamiento de la nanocelulosa cristalina:¹⁸

Equipos, materiales y reactivos:

- Ácido sulfúrico (H₂SO₄), Sigma Aldrich.
- Agitador-calentador Thermo Scientific, Cimarec SP131325.
- Agitador de vidrio.
- Balanza analítica Mettler, AE200.
- Balón de tres bocas, 500 mL.
- Baño de cobre.
- Beakers, 1L.

- Bomba de vacío KNF Neuberger Laboport.
- Desecador de vidrio.
- Embudo Buchner.
- Kitasato, 500 mL.
- Papel filtro Sartorius Stedim, grado 1288 FT-3-206-125, cualitativo.
- Papel pH 0 ~ 14.
- Pastilla magnética.
- Termómetro, $\Theta_{\text{máx}}$: 150 °C.
- Sonicador Misonix Touch-Screen Sonicator S-4000.
- Centrífuga, Eppendorf 5804-R.
- Membranas de diálisis Standard® RC

Procedimiento:

Una vez completada la separación de la celulosa del sustrato entero, el material se utilizó para la extracción de nanocelulosa por hidrólisis ácida.

La hidrólisis se realizó a 45 °C durante 2 horas bajo agitación vigorosa y constante. Para cada gramo de celulosa tratada se utilizaron 20 mL de H₂SO₄ al 64% (p/p) (9,17 mol/L). Inmediatamente después de la hidrólisis, la suspensión se diluyó 10 veces con agua fría para detener la reacción de hidrólisis, luego se centrifugó dos veces durante 10 minutos a 7000 rpm para eliminar el exceso de ácido. Posteriormente se llevó a cabo la diálisis durante 4 días donde el precipitado se suspendió en agua para eliminar los grupos de sulfato no reactivos, sales y azúcares solubles, hasta que se alcance el pH neutro. Finalmente, la suspensión resultante del proceso de diálisis se sometió a ultrasonificación durante 10 minutos y se almacenó en refrigeración a 4 °C agregando 3 gotas de cloroformo en la suspensión para evitar cualquier crecimiento bacteriano.

$$\% \text{ Rendimiento de nanocelulosa} = \frac{mf}{mi} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

mi = masa inicial de rastrojo de piña base seca.

mf = masa de nanocelulosa obtenida en base seca.

4.2.2. Caracterización de la nanocelulosa (NCC)

Para caracterizar la nanocelulosa obtenida se analizaron las propiedades térmicas por TGA, las propiedades estructurales por medio de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier, al igual que el tamaño y concentración utilizando los ensayos de microscopía electrónica de transmisión y dispersión dinámica de la luz.

4.2.2.1. Microscopía electrónica de transmisión (TEM) de NCC

Los cristales de nanocelulosa obtenidos fueron analizados por microscopía electrónica de transmisión (TEM por sus siglas en inglés) en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

Equipos:

- Microscopio Electrónico de Transmisión JEM 2100.

4.2.2.2. Determinación de tamaño de la NCC por dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño de partícula de la nanocelulosa se determinó la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés) utilizando un analizador de tamaño de partículas Zetasizer ultra Malvern Panalytical de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad de Costa Rica (UCR) siguiendo el procedimiento descrito por Wulandari W.T, *et al.* 2016.

102

Equipos y materiales:

- Nanocelulosa de consistencia conocida.
- Analizador de tamaño de partículas Zetasizer ultra Malvern Panalytical.

Procedimiento:

La nanocelulosa se diluyó con agua destilada hasta una concentración aproximada de 0,1 g/L y se insertó en la cubeta. Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente con un rango de medición de 0 nm hasta 8000 nm.

4.2.2.3. Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)

Para determinar los grupos funcionales presentes en la NCC, se realizó la caracterización con FT-IR según los parámetros establecidos por Santos: ¹⁸

Equipos y materiales:

- Nanocelulosa cristalina de rastrojo de piña en polvo.
- FT-IR marca Thermoscientific Nicolet IS-50 con accesorio de reflectancia total atenuada ATR (por sus siglas en inglés).

Procedimiento:

Se realizaron espectros infrarrojos a la NCC en un intervalo de número de onda de 500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . Las muestras fueron analizadas utilizando la reflectancia total atenuada (ATR) con cristal de diamante a una resolución es de 4 cm^{-1} , 32 barridos.

4.2.2.4. Análisis termogravimétrico (TGA)

Para determinar la estabilidad térmica del material se realizó un análisis termogravimétrico a la NCC según los parámetros establecidos por Mohamad Haafiz: ¹⁰¹

Equipos y materiales:

- Nanocelulosa cristalina de rastrojo de piña en polvo.
- TGA modelo Q500 (TA Instruments).

Procedimiento:

Las muestras se calentaron de temperatura ambiente hasta 800 °C con una rampa de calentamiento de 20 °C/min y flujo de nitrógeno de 40 mL/min.

4.3. Extracción y caracterización de aceite esencial de romero (AER)

4.3.1. Extracción de aceite esencial de romero (AER)

El aceite esencial se extrajo por el método de hidrodestilación ¹⁰³

Equipo y materiales:

- Romero (*Romero officinalis*).
- Balones de fondo plano 5 L.
- Condensadores.
- Plantillas calefactoras de agitación IKA C-MAG.
- Balanza granataria digital Kern 440.

Procedimiento:

Las hojas y tallos delgados de la planta se colocaron en agua destilada (relación m/v = 1/12) y se extrajo el AER en un sistema de hidrodestilación mostrado en la figura 3 con el cuál se extrajo el aceite de romero paulatinamente durante 3 horas a 100 °C. El aceite esencial obtenido se almacenó en refrigeración a 10 °C.

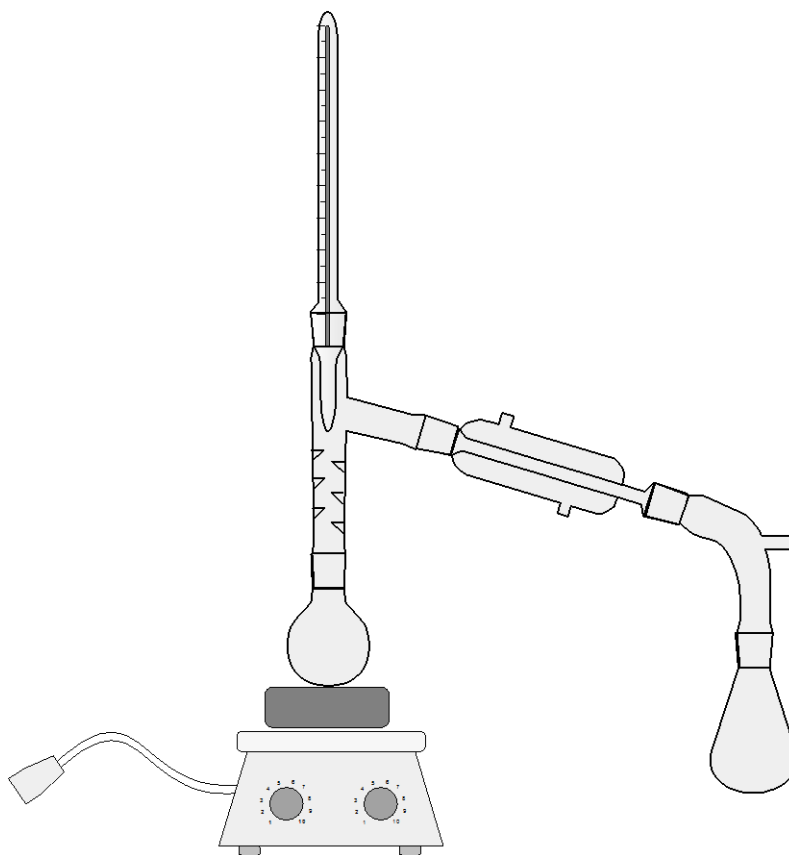


Figura 3. Sistema de hidroddestilación utilizado para la extracción de AER. Fuente propia.

El rendimiento de la extracción se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Rendimiento de extracción del AER} = \frac{V_{\text{AER}}}{M_{\text{RS}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

V_{AER} = volumen de aceite esencial de romero obtenido.

M_{RS} = masa inicial de planta de romero seca.

4.3.2. Caracterización de los aceites esenciales

Para la caracterización del AER obtenido se llevaron a cabo análisis de cromatografía de gases acoplado a masas y la cuantificación de los fenoles totales presentes.

4.3.2.1. Cromatografía de gases acoplada a masas del AER

El análisis de los componentes presentes en el AER extraído fue realizado mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas del Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

4.3.2.2. Cuantificación de los fenoles totales en los aceites esenciales

El ensayo de contenido de fenoles totales se realizó de acuerdo con Erkan et al. (2008).¹⁰⁴

Equipo y materiales:

- Micropipeta Thermo Scientific.
- Reactivo Folin – Ciocalten Sigma Aldrich.
- Carbonato de Sodio (Na_2CO_3) Merck pureza $\geq 99.9\%$.
- Espectrofotómetro (Thermo Electron Corporation GENESYS 10 UV).

Procedimiento:

Se mezcló una alícuota de 0,1 mL de A.E se mezclaron con 0,5 mL de etanol y se prepararon diluciones al 100, 50, 25 y 12,5 % utilizando agua para el aforo de cada muestra. Posteriormente se tomó una alícuota de 0,1 mL de cada dilución y se trató con 0,250 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) preparado en relación 1:1 reactivo-agua destilada. Después de dejar reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 1,25 mL de una solución acuosa de carbonato de sodio al 20 % m/v. Las soluciones se mantuvieron protegidas de la luz durante dos horas. Después de este tiempo, la absorbancia se midió en un espectrofotómetro a 760 nm utilizando un blanco de etanol preparado bajo el mismo tratamiento descrito previamente. La cuantificación se realizó sobre la base de la curva estándar de ácido gálico y los resultados se expresaron en gramos de equivalentes de ácido gálico (AGE) por gramo de muestra (mg AGE g^{-1} de muestra). Los análisis se realizaron por triplicado.

4.4. Formulación y caracterización de películas termoplásticas

4.4.1. Composición de las formulaciones de películas termoplásticas

Las películas se produjeron por el método de *casting*, es decir, evaporación del solvente a temperatura y humedad controladas. La preparación de películas de almidón termoplástico (TPS por sus siglas en inglés) se realizó según la compilación de métodos y formulaciones establecidos por Luchese y López.^{22,105} La composición de todas las formulaciones elaboradas se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Composición de las formulaciones elaboradas de TPS, TPS/NCC, TPS/NCC/AER y TPS/AER.

| Película | Almidón (gramos almidón/100 gramos de disolución) | Glicerol (% glicerol/gramos almidón) | NCC (% NCC/gramos almidón) | AER (%AER/Disolución) | Tween 80 (% Tween 80/%AER) |
|-------------------|---|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| TPS 20 % | 4 | 20 | N/A | N/A | N/A |
| TPS 25 % | 4 | 25 | N/A | N/A | N/A |
| TPS/NCC 5 % | 4 | 20 | 5 | N/A | N/A |
| TPS/NCC 10 % | 4 | 20 | 10 | N/A | N/A |
| TPS/NCC 15 % | 4 | 20 | 15 | N/A | N/A |
| TPS/NCC/AER 0,4 % | 4 | 20 | 15 | 0,4 | 50 |
| TPS/NCC/AER 0,5 % | 4 | 20 | 15 | 0,5 | 50 |
| TPS/AER 0,4% | 4 | 20 | N/A | 0,4 | 50 |
| TPS/AER 0,5% | 4 | 20 | N/A | 0,5 | 50 |

N/A: No Aplica.

Equipos, materiales y reactivos:

- Agitador-calentador Thermo Scientific, Cimarec SP131325.
- Balanza analítica Mettler, AE200.
- Desecador de vidrio.
- Termómetro, $\Theta_{\text{máx}}$: 150 °C.
- Baño de ultrasonido Branson 2510.
- Micrómetro digital Mitutoyo.
- Estufa de convección forzada ESCO modelo OFA-110-8.
- Tween 80 CRODA Americas Inc.
- Homogeneizador Ultra Turrax T-25 D.

4.4.1.1. Preparación de películas de almidón termoplástico (TPS)

La formulación de las películas de TPS se obtuvo adicionando 4 g de almidón/100 g de disolución y (5, 10, 15, 20, 25 y 30) % de glicerol respecto a la masa de almidón, completando con agua para obtener 100 gramos de disolución. Los componentes de esta matriz se mezclaron por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se continuó con agitación magnética a 90 °C hasta alcanzar la temperatura de gelación, una vez alcanzada la misma, se colocó la mezcla en una plantilla con agitación sin calentamiento durante 15 minutos con el fin de garantizar la homogeneidad de la mezcla y disminuir la temperatura del TPS.

La disolución se enfrió en un baño de ultrasonido a temperatura ambiente en el modo de desgasificar durante 10 minutos con el fin de eliminar burbujas. Seguidamente se depositaron 0,25 g/cm² de la disolución en cada una de las cajas Petri y se dejó secar en una estufa de aire forzado por 4 horas a 40 °C. El grosor de las películas se mantuvo constante al controlar la masa de la disolución en el área de la placa. Finalmente, se almacenan las películas a una temperatura de $21 \pm 0,5$ °C y una humedad de $55 \% \pm 5 \% \text{ HR}$ para su análisis 15 días después de su procesamiento.

4.4.1.2. Preparación de películas de TPS/NCC

Para preparar las películas de TPS/NCC se utilizó una solución filmogénica con 4 % m/v de almidón en agua destilada y un 20 % m/m de glicerol basado en el contenido de almidón.

Primero, se mezclaron los componentes de la matriz de TPS por 10 minutos a temperatura ambiente, luego se continúa con agitación magnética y calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 90 °C para gelatinizar el almidón. Una vez alcanzada esta temperatura se adicionaron (5, 10 y 15) % en peso de nanocelulosa extraída de la celulosa obtenida del rastrojo de piña. Luego, se colocaron en agitación sin calentamiento durante 15 minutos con el fin de garantizar la homogeneidad de la mezcla y disminuir la temperatura del TPS/NCC. Posteriormente, se procedió a enfriar la disolución en un baño de ultrasonido a temperatura ambiente en el modo de desgasificar durante 10 minutos para garantizar la eliminación de las burbujas. Finalmente se colocaron 0,25 g/cm² en cada una de las placas Petri a una temperatura de 21 ± 0,5 °C y una humedad de 55 % ± 5 % HR para su análisis 15 días después de su procesamiento.

4.4.1.3. Preparación de películas de TPS/AER y TPS/NCC/AER

Las películas se prepararon según el método descrito por L. de Souza *et al*, 2013¹⁰⁶ con algunas modificaciones. La solución filmogénica se preparó con un 4 % m/v de almidón en agua destilada y un 20 % m/m de glicerol/almidón y 15 % m/v de NCC.

Para preparar las películas, primero se mezclaron los componentes de la matriz de TPS por 10 minutos a temperatura ambiente, luego, se continuó con agitación magnética con calentamiento hasta alcanzar una temperatura de 90 °C para gelatinizar el almidón. Una vez alcanzada esta temperatura se adicionó la nanocelulosa cristalina en un 15 % en peso (en caso de que la formulación contenga NCC); se mantuvo la agitación sin calentamiento hasta que la temperatura descendió a 40 °C; en este momento se adicionó el Tween en una proporción del 50 % con respecto al volumen de AER adicionado. Inmediatamente después, se adicionó el aceite esencial de romero (0,4 y 0,5) % v/v y se homogeneizó la solución en un homogeneizador a 1000 rpm durante 2 min. Posteriormente, se procedió a enfriar la disolución en un baño de ultrasonido durante 1 hora para garantizar la eliminación de las burbujas. Finalmente se colocaron 0,25 g/cm² en cada una de las placas Petri a una temperatura de 21 ± 0,5 °C y una humedad de 55 % ± 5 % HR para su análisis 15 días después de su procesamiento.

4.4.2. Caracterización de las películas de TPS, TPS/NC, TPS/AER y TPS/NCC/AER

Las diferentes formulaciones de películas termoplásticas elaboradas con almidón de yuca amarga fueron caracterizadas mediante la determinación la composición química como el FT-IR, análisis de propiedades térmicas como el TGA y DS; además se realizaron pruebas mecánicas para la determinación de la resistencia, rigidez y capacidad de estiramiento. Asimismo, se evaluaron las propiedades de interacción con el agua como lo son la solubilidad en agua y la permeación y velocidad de transmisión de vapor de agua. Por otra parte, se evaluó la opacidad y la actividad antimicrobiana de las películas de TPS/AER y TPS/NCC/AER al realizar una comparación con su análoga formulada sin AER.

4.4.2.1. Espectroscopía de infrarrojo (FT-IR)

Para determinar los grupos funcionales se caracterizaron las películas de TPS, TPS/NCC, TPS/AER y TPS/NCC/AER con FT-IR según los parámetros establecidos por Ghanbari: ¹⁰⁷

Equipos:

- FT-IR marca Thermoscientific Nicolet iS-50 con accesorio de reflectancia total atenuada ATR (por sus siglas en inglés).

Procedimiento:

Se llevaron a cabo espectros infrarrojos a cada una de las películas elaboradas realizando un barrido en un intervalo de número de onda 500 cm^{-1} a 4000 cm^{-1} . Las muestras fueron analizadas utilizando la reflectancia total atenuada (ATR) con cristal de diamante a una resolución es de 4cm^{-1} , 32 barridos.

4.4.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

Para determinar la estabilidad térmica de las películas de TPS y TPS/NC se realizaron análisis termogravimétricos a todas las composiciones del termoplástico elaborado según los parámetros establecidos por Ghanbari: ¹⁰⁷

Equipos:

- TGA modelo Q500 (TA Instruments).

Procedimiento:

Las muestras se trataron térmicamente hasta 800 °C con una rampa de calentamiento de 20 °C/min y flujo de nitrógeno de 40 mL/min. El análisis se llevó a cabo 15 días después de la elaboración de las películas termoplásticas las cuales permanecieron a una temperatura de $21,0 \pm 0,5$ °C y una humedad de $55 \% \pm 5 \%$ HR.

4.4.2.3. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

El comportamiento de las transiciones térmicas de películas de TPS, TPS/NCC, TPS/AER Y TPS/NCC/AER fueron analizados según los parámetros establecidos por Savadekar: ⁹

Equipos, materiales y reactivos:

- Analizador DSC Perkin Elmer Modelo: Pyris DSC-6.

Procedimiento:

La prueba se realizó utilizando el equipo DSC Perkin Elmer modelo Pyris DSC-6 con atmósfera inerte de nitrógeno. Se midieron las muestras en cápsulas de aluminio, donde se colocó una masa entre 6-10 mg y se sellaron herméticamente. Todas las mediciones se realizaron en el rango de 30 °C a 300 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min bajo una atmósfera de gas nitrógeno con un caudal de 20 mL/min. El análisis se llevó a cabo 15 días después de la elaboración de las películas termoplásticas las cuales permanecieron a una temperatura de $21,0 \pm 0,5$ °C y una humedad de $55 \% \pm 5 \%$ HR.

4.4.2.4. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de los compuestos como módulo elástico en tensión, porcentaje de deformación y la resistencia a la tracción se determinaron mediante el ensayo de tracción de acuerdo con la norma ASTM D882: ¹⁰⁸

Equipos y materiales:

- Micrómetro Mitutoyo, CD-6B.

- Máquina universal de ensayos Instron 3365.

Procedimiento:

Se colocaron piezas rectangulares (50 mm x 10 mm) de las películas, con una velocidad de cruceta de 10 mm/min y una celda de carga de 1 kN. El ensayo se llevó a cabo 15 días después de la elaboración de las películas a una temperatura de $21 \pm 0,5$ °C y una humedad de 70 % ± 5 % HR. Se tomaron datos reproducibles de cinco especímenes de cada composición y los resultados se presentaron como promedio para las muestras analizadas.

4.4.2.5. Propiedad de solubilidad en agua

La solubilidad en agua de las películas se determinó por el grado de pérdida de masa de las muestras después de la inmersión en agua destilada siguiendo el procedimiento descrito por Ma:¹³

Equipos y materiales:

- Estufa de convección forzada ESCO modelo OFA-110-8.
- Cápsulas de aluminio de 5 cm de diámetro y 7 cm de alto.
- Agitador orbital (*orbital shaker*) marca MRC, modelo TOS-6048-2/5D.
- Balanza analítica Mettler AE200.

Procedimiento:

El análisis se llevó a cabo 15 días después de la elaboración de las películas termoplásticas las cuales permanecieron a una temperatura de 21 °C y una humedad de 55 ± 5 % HR. Antes de los experimentos de inmersión, se realizó por triplicado el secado a 105 °C durante 24 h de cada una de las películas elaboradas (aproximadamente muestras de 40 mm x 20 mm de diámetro); una vez secas, se midió una masa entre 100 y 150 mg de la película seca como masa inicial (W_0). La muestra se sumergió en 30 mL de agua destilada y se sometió a agitación durante 24 h a 90 rpm en un agitador orbital. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras se recuperaron y se sometieron nuevamente al secado a 105 °C durante 24 h para determinar la masa de materia seca no disuelta en el agua (W_t). La solubilidad de la película en agua se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Solubilidad en agua} = \frac{(W_0 - W_t)}{W_0} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde:

W_0 = masa de la muestra seca antes de la inmersión.

W_t = masa de la materia insoluble después de la inmersión.

4.4.2.6. Permeabilidad y velocidad de transmisión de vapor de agua

La velocidad de transmisión de vapor de agua se determinó gravimétricamente siguiendo el método E96-16 (ASTM, 2016) con algunas de las modificaciones realizadas por Babae: ¹⁴

Equipos y materiales:

- Balanza analítica Mettler AE200.
- Gel de sílice.
- Celdas circulares de permeación de aluminio.

Procedimiento:

Las muestras se acondicionaron en una cámara ambiental a 25 °C y 50 ± 5 % de humedad relativa (HR), usando una mezcla de glicerina/agua apropiada.

Se adicionaron 5 g de gel de sílice (0% HR) a la celda circular de permeación de aluminio y se fijó en ella la muestra de película con un diámetro de 5,5 mm. La celda se almacenó en un desecador de vidrio que contenía solución salina saturada de cloruro de sodio (70 ± 2 % HR) a 21 ± 5 % ° C y se realizaron mediciones cada hora durante 10 horas para cada repetición; el análisis se realizó por triplicado. El aumento de la masa de la celda de permeación se trazó en función del tiempo y la pendiente de cada línea se calculó por regresión lineal. La velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR, por sus siglas en inglés) y la permeabilidad al vapor de agua (WVP, por sus siglas en inglés) se calculó utilizando las siguientes ecuaciones:

$$WVTR = \frac{\left(\frac{G}{t}\right)}{A} = \frac{\text{pendiente}}{\text{área}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde

G = cambio de masa (g).

t = tiempo (h).

A = el área expuesta a la transferencia de humedad (m²).

G/t = la pendiente obtenida de una gráfica de ganancia de masa vs. tiempo.

$$WVP = \frac{WVTR}{P(R_1 - R_2)} \cdot X \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde

X = espesor de la película (m)

P = presión de vapor de saturación del agua a 25 °C (Pa)

R₁ = humedad relativa en el desecador (70% RH)

R₂ = humedad relativa en trazas (0% RH)

4.4.2.7. Opacidad

La opacidad se determinó siguiendo la metodología descrita por Daudt, R. M., et al., 2016.

109

Equipos:

- Colorímetro (Konica Minolta, Japón) de la Universidad de San Buenaventura USB, Cali, Colombia.

Procedimiento:

La prueba de opacidad se desarrolló utilizando un colorímetro. Se cortaron muestras de 20 mm x 100 mm de las películas elaboradas y se colocaron bajo la abertura de medición del equipo. La opacidad se calculó determinando la relación entre el patrón negro (Opb) y el patrón blanco (Opw) como referencias. Los datos fueron procesados por el software Spectra

Magic NX donde se determinó el promedio de cinco mediciones de cada película en posiciones aleatorias.

4.4.2.8. Determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana del AER

Se determinó cualitativamente la concentración mínima inhibitoria (MIC por sus siglas en inglés) del AER sobre hongos y bacterias con la finalidad de establecer la concentración que se utilizó en la formulación de películas de TPS/AER y TPS/NCC/AER para observar el efecto antimicrobiano del AER sobre la matriz termoplástica.

Los cultivos microbianos se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) de la Universidad de San Buenaventura, Cali, Colombia donde se llevaron a cabo los análisis descritos a continuación en las secciones 2.8.9.1 y 2.8.9.2. Las bacterias evaluadas fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 55804 de tipo grampositiva, y dos bacterias gramnegativas, *Salmonella entérica* ATCC 53648 y *Escherichia coli* ATCC 11775. Por otra parte, se utilizaron tres cepas de hongos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Fusarium oxysporum*. Para el análisis microbiológico se utilizó agar Mueller Hinton (MH) (Oxoid®) y agar dextrosa de papa (PDA) para el análisis antifúngico. Los cultivos bacterianos y los hongos se preactivaron y se incubaron a 37 °C y 25 °C respectivamente.

4.4.2.9. Determinación cualitativa de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

La concentración mínima inhibitoria se estableció por medio del método de dilución de agar, el cual determina la susceptibilidad antimicrobiana contra bacterias y hongos.³⁴

Equipos, materiales y reactivos:

- Placas Petri descartables.
- Agar Müller Hinton (MH) (Oxoid®).
- Agar dextrosa de papa (PDA).
- Micropipeta Thermo Scientific.
- Asas de inoculación de vidrio.
- Cultivos bacterianos (*S. aureus*, *S.entérica* y *E. coli*).

- Cultivos fúngicos (*A. niger*, *A. flavus* y *F. oxyporum*).
- Hemocitómetro o cámara de Neubauer Boeco de 0,0025 mm².
- Microscopio óptico Meiji Techno modelo MX9300.

Procedimiento:

El procedimiento de dilución de agar se lleva a cabo mediante inoculación en placas de agar que contienen el compuesto de prueba a concentraciones de 0, 1000, 2000, 3000 y 4000 ppm de AER a cada disco (por duplicado, por bacteria u hongo). El agente antimicrobiano inhibe el crecimiento del microorganismo de prueba, difundiendo en el agar; los resultados se expresan midiendo los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento (Balouiri, Sadiki e Ibsouda, 2016). Los cultivos bacterianos (*S. aureus*, *S. entérica* y *E. coli*) y fúngicos (*A. niger*, *A. flavus* y *F. oxyporum*) se ajustaron a una concentración $\gg 10^6$ UFC/mL medidos en cámara de Neubauer. El inóculo bacteriano se sembró con asas de vidrio estériles en la superficie de agar Müller Hinton en placas de Petri que contenía el agente antimicrobiano a las concentraciones mencionadas; mientras que los hongos se sembraron utilizando un cortador circular y colocando la muestra en el centro de la placa Petri que contenía el agar PDA con el agente antimicrobiano a las concentraciones mencionadas. Las placas se incubaron a 37 °C para la cuantificación de las colonias bacterianas y a 25 °C para los hongos en la oscuridad durante 72 h para determinar la formación de halos de inhibición de los hongos.³⁷

4.4.2.10. Prueba cualitativa de inhibición de disco

La determinación de la actividad antimicrobiana se realizó por el método de inhibición de disco.¹¹⁰ Para cada una de las formulaciones de almidón termoplástico elaboradas, utilizando diferentes cepas de hongos y bacterias.¹¹¹

Equipos, materiales y reactivos:

- Placas Petri descartables.
- Agar Müller Hinton (MH) (Oxoid®).
- Agar dextrosa de papa (PDA).

- Micropipeta Thermo Scientific.
- Asas de inoculación de vidrio.
- Cultivos bacterianos (*S. aureus*, *S. entérica* y *E. coli*)
- Cultivos fúngicos (*A. niger*, *A. flavus* y *F. oxyporum*)
- Hemocitómetro o cámara de Neubauer Boeco de 0,0025 mm².
- Microscopio óptico Meiji Techno modelo MX9300.

Procedimiento:

Para la determinación de la actividad antibacterial se preparó el agar Müller Hinton y se colocó en placas de Petri. Luego, se inocularon alícuotas de 0,1 mL de las suspensiones celulares de las bacterias (*S. aureus*, *S. entérica* y *E. coli*) que fueron ajustadas a una concentración $>10^6$ UFC/mL por medio de su medición en cámara de Neubauer. Posteriormente, se sembró 0,1 mL del inóculo bacteriano con asas de vidrio estériles en la superficie de agar para difundir su crecimiento. Seguidamente, se colocó un disco de 5 mm de cada una de las películas preparadas para determinar el efecto antimicrobiano por medio de la visualización de halos de inhibición de crecimiento bacteriano alrededor de la película termoplástica 24 horas después de la incubación a 37 °C.

La determinación de la actividad antifúngica requirió la preparación de suspensiones de 0,1 mL de esporas de los hongos (*A. niger*, *A. flavus* y *F. oxyporum*) las cuales fueron elaboradas tomando una sección de hongo esporulado del cultivo fúngico y colocándola en agua destilada, luego se procedió a establecer una concentración $>10^6$ UFC/mL por medio de su medición en cámara de Neubauer. Posteriormente, se colocaron 0,1 mL de la suspensión fúngica en las placas Petri y se dispersaron sobre la superficie de la placa Petri utilizando asas de vidrio estériles. Finalmente, se colocó un disco de 5 mm de cada una de las películas preparadas para determinar el efecto antifúngico por medio de la visualización de halos de inhibición de crecimiento fúngico alrededor de la película termoplástica 24 horas después de la incubación a 25 °C y en la oscuridad.

Para ambos procedimientos de determinación de actividad antimicrobiana se realizó un control para cada bacteria y hongo utilizando el mismo procedimiento, pero sin la adición de

las películas termoplásticas. El análisis se realizó por duplicado para cada una de las películas elaboradas y cada bacteria u hongo analizado.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Caracterización del almidón de yuca amarga

Se analizó el almidón extraído de la variedad de yuca amarga CM7951-5 por el método de microscopía óptica para garantizar la extracción de los gránulos nativos de almidón. Además, se realizó una caracterización química mediante la determinación del contenido total de almidón y amilosa presentes en la muestra. Adicionalmente, se estableció la temperatura de gelación del almidón por la técnica de DSC para determinar la temperatura de procesamiento que sería utilizada para generar las películas de almidón termoplástico. En todos los casos se realizó una comparación con almidón comercial de papa marca Sigma Aldrich.

5.1.1. Estructura granular

Los componentes moleculares amilosa y amilopectina se ensamblan naturalmente en forma de gránulos semicristalinos. Las características morfológicas del almidón de yuca se han descrito como ovalada, truncada y redondeada, al ser observada mediante diversas técnicas microscópicas como microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica. Las propiedades fisicoquímicas de los almidones se ven afectadas por muchos factores como lo son sus fuentes botánicas y el método de extracción de almidón.¹¹² La figura 4 es un ejemplo de la variación en el proceso de extracción y fuente botánica de almidones. Se observaron gránulos redondos para el almidón extraído de la variedad de yuca amarga CM7951-5, mientras que los gránulos de almidón comercial de papa fueron elípticos. Además, se observó que los gránulos nativos tanto almidón de yuca como de papa son individuales, aunque fue posible observar gránulos compuestos que consisten en dos o tres unidades. Otro factor observado bajo el microscopio óptico fue el hilum, es decir, el centro del cual se despenden los anillos de crecimiento característicos de los gránulos nativos de almidón.

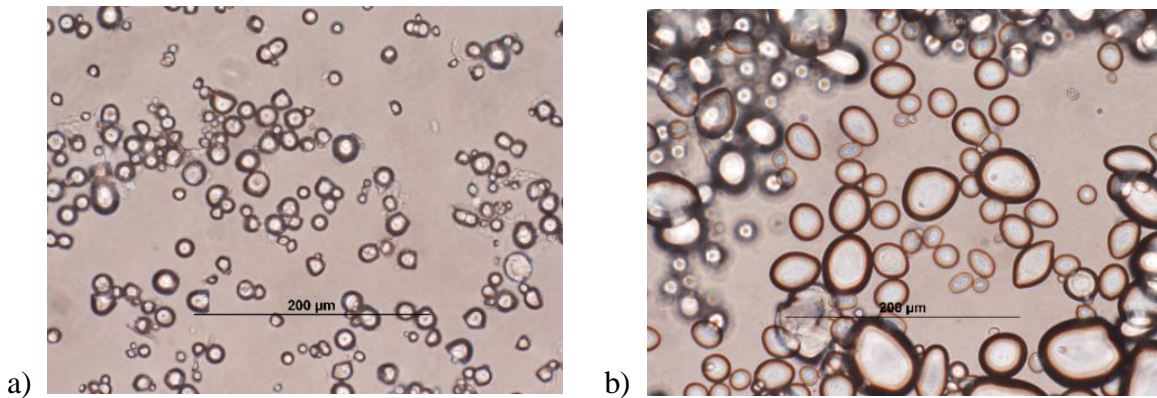


Figura 4. Microscopía óptica a una magnificación de 40X para las muestras a) almidón extraído de la variedad de yuca amarga 7951-5 y b) almidón de papa comercial (Sigma Aldrich).

Resultados similares fueron observados en la investigación realizada por Rocha T.S., *et al.*, 2010¹¹³ los gránulos de almidón de diferentes fuentes mostraron formas y tamaños distintos. Los gránulos de almidón de yuca y zanahoria peruana mostraron formas redondas, mientras que el almidón de camote mostró gránulos con formas redondas y poligonales; los gránulos de almidón de papa varían mucho en tamaño y forma, los más grandes a menudo tienen forma elíptica aplanada y los más pequeños pueden ser perfectamente esféricos.¹¹³ La figura 5 muestra imágenes SEM de los gránulos de almidón. Los gránulos tenían formas esféricas y una superficie lisa con solo algunas irregularidades.

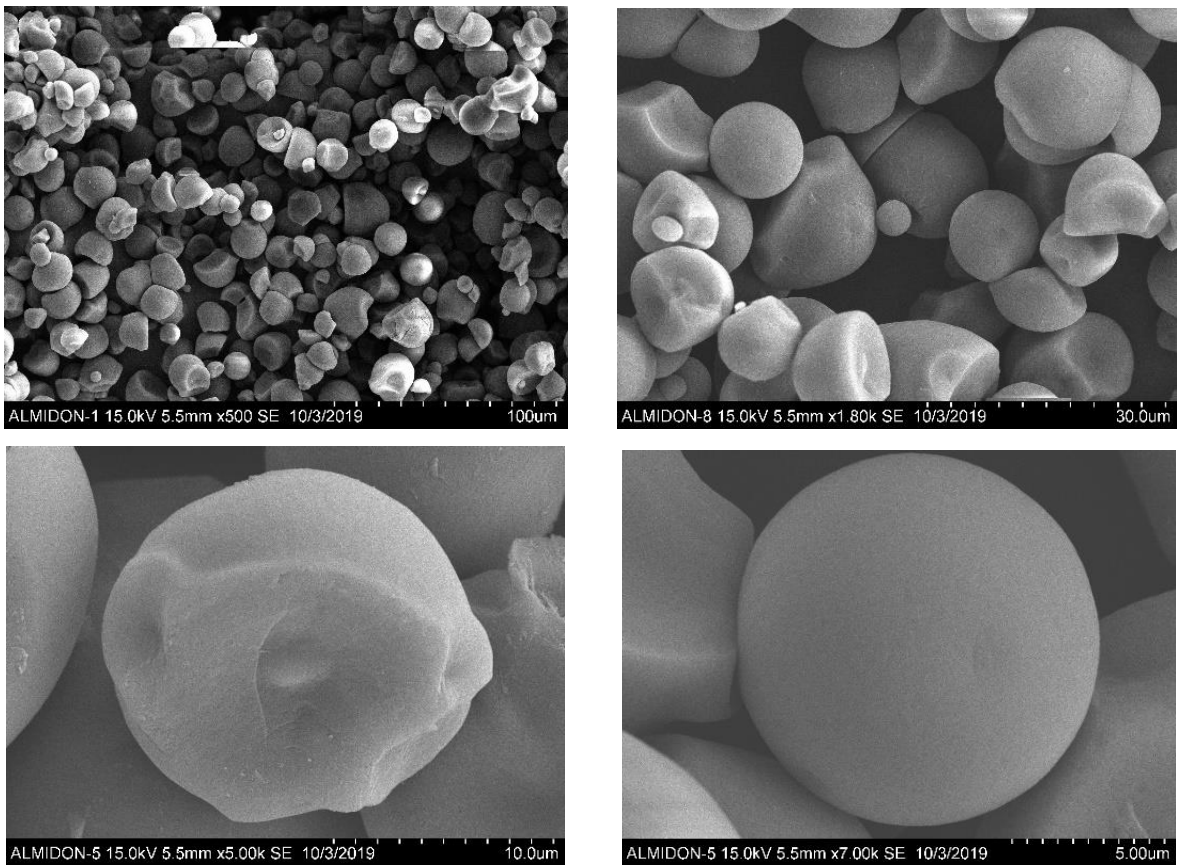


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido SEM realizado a la muestra de almidón extraído de la yuca amarga variedad CM7951-5.

5.1.2. Cuantificación de almidón total y amilosa en el almidón extraído de yuca amarga

Las características físicas y químicas de las plantas varían dentro de la misma especie, ya que éstas dependen del crecimiento, tipo de suelo, la genética, las condiciones climáticas, entre otras. Debido a esto, es importante que estas características sean determinadas para cada estudio realizado de modo que puedan ser comparadas con la literatura y de esta manera sean correlacionadas con las propiedades finales del material termoplástico elaborado.¹¹⁴

En el cuadro 3 se presentan los resultados obtenidos para el proceso de caracterización de almidón extraído de yuca amarga de la variedad CM7951-5. El contenido total de almidón ha sido reportado entre un 70,36 a 89,90 % por Nuwamanya E., *et al.*, 2010¹¹⁴, rango en el

cual se encuentra la muestra analizada con un 76,73 % de almidón total con un 12% de humedad y un rendimiento de extracción de 22 %.

Cuadro 3. Porcentaje de rendimiento de la extracción, porcentaje de humedad y porcentaje de almidón en base seca de la variedad de yuca CM7951-5.

| Parámetro | Almidón variedad CM7951-5 | Almidón comercial de papa |
|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Rendimiento de extracción (%) | 22 | N.A. |
| Humedad (%) | 12,2 | 10,8 |
| Almidón en base seca (%) | 88,2 | 90,1 |
| Almidón total (%) | 76,7 | 82,1 |
| Amilosa (%) | 20,1 | 27,7 |
| Amilopectina (%) | 79,9 | 72,3 |

N.A. (No aplica)

Las condiciones agroambientales en las cuales se desarrolla cada cosecha como lo son la temporada de siembra, el clima, la humedad y la composición química de la tierra, son factores que afectan directamente la genética de los cultivos generando diferencias en la proporción de sus componentes químicos naturales. Además, el tipo de extracción del almidón mediante la utilización de raíces frescas o secas también puede influir en la composición química del almidón. En conclusión, la naturaleza química, incluso del menor constituyente, puede sufrir variaciones según los diversos factores mencionados. ¹¹⁵

Por su parte, el almidón comercial de papa utilizado como estándar contiene 82,06 % de almidón total, este resultado se asocia con las diferencias propias de la fuente vegetal utilizada y las posibles condiciones medioambientales que influyeron en su composición

química. Por lo tanto, conocer el porcentaje total de almidón en la materia prima utilizada es un factor de importante consideración al evaluar las propiedades funcionales del bioplástico elaborado.¹¹⁴

Por otra parte, para la cuantificación del contenido de amilosa en el almidón, existen diversos métodos basados en calorimetría de barrido diferencial (DSC), unión de yodo, cromatografía, etc. Los diferentes métodos pueden dar resultados diferentes para la misma muestra.^{65,116} Por lo tanto, el método específico de medición de amilosa debe tenerse en cuenta al comparar los datos de diferentes estudios.

El cuadro 3 muestra el contenido de amilosa en el almidón extraído de la variedad de yuca CM7951-5, el cual fue de 20,1 %; otros resultados obtenidos por el método de estudio elaborado experimentalmente han sido reportados entre 16,2 % y 19,9% (Rocha T.S., *et al.*, 2010)¹¹³, 19,69 y 26,63 % (Nuwamanya E., *et al.*, 2010)¹¹⁴, 23,3 % (Kittipongpatana y Kittipongpatana, 2015)¹¹⁷. Sin embargo, el resultado experimental difiere con respecto al contenido de amilosa reportado para variedades de almidón de yuca dulce en Costa Rica como los son la variedad Valencia y Brasileña con un 38,1 y 37,0 % respectivamente (Vargas *et al.*, 2012)¹¹⁸; este resultado se asocia con las diferencias propias de la fuente vegetal así como las condiciones medioambientales asociadas a temporada de cultivo y cosecha. Por su parte, para el estándar comercial de papa se obtuvo un resultado de 27,7 % de amilosa, dato que ha sido reportado en diversas investigaciones como 27,1 % (Martínez y Prodolliet, 1996)¹¹⁹ y 29,3 % (Sievert y Holm, 1993)¹²⁰. En conclusión, tanto el rendimiento total del almidón así como la proporción de amilosa/amilopectina presente en los gránulos de almidón varía según el proceso de biosíntesis, las diferentes especies y variedades botánicas, la época de cultivo, la edad de cosecha y los demás factores agroambientales que deben ser considerados como variables que explican la diversidad de resultados presente en múltiples investigaciones.¹¹⁴

5.1.3. Determinación de la temperatura de gelación del almidón

El almidón nativo no se considera un polímero termoplástico debido principalmente a su estructura química y a que su temperatura de transición vítrea (T_g) se ubica por encima de la

temperatura de descomposición. Para transformar el almidón en un material termoplástico, se requiere la ruptura de los gránulos de almidón que constituyen el material. La interrupción granular tiene lugar en la presencia de un plastificante, procesado bajo esfuerzo de cizallamiento y temperatura. En este sentido, el almidón se procesa comúnmente con agua y otros plastificantes, como los polialcoholes debido a que la presencia de plastificantes disminuye los valores de T_g , permitiendo que el almidón sea procesable. ¹²¹

La determinación de la temperatura de gelación es un parámetro fundamental en el procesamiento del almidón para la elaboración de películas de almidón termoplástico (TPS). La temperatura máxima (T_M) obtenida del análisis de calorimetría de barrido diferencial proporciona la temperatura mínima a la cual el gránulo de almidón puede ser desestructurado generando su gelación en presencia de agua, es decir, T_M corresponde a la temperatura de gelación del almidón. Por lo tanto, para la elaboración de películas de almidón termoplástico se deberá utilizar una temperatura entre 5 °C y 10 °C superior a la temperatura de gelación obtenida en los análisis de DSC con la finalidad de realizar un adecuado procesamiento del almidón evitando su degradación. ¹²¹

Los resultados obtenidos para la determinación de la temperatura de gelación se muestran en la figura 6. Para las muestras de almidón extraídas de yuca amarga variedad CM7951-5 la temperatura de gelación fue de 79,06 °C y la entalpia de gelación fue de 180,97 J/g, mientras que otras investigaciones reportan una temperatura de gelación de 72.7 °C (Nguyen Vu. *et al.*, 2016) ¹²². En cuanto al almidón comercial la temperatura de gelación fue de 85,96 °C y la entalpia de gelación fue 296,19 J/g.

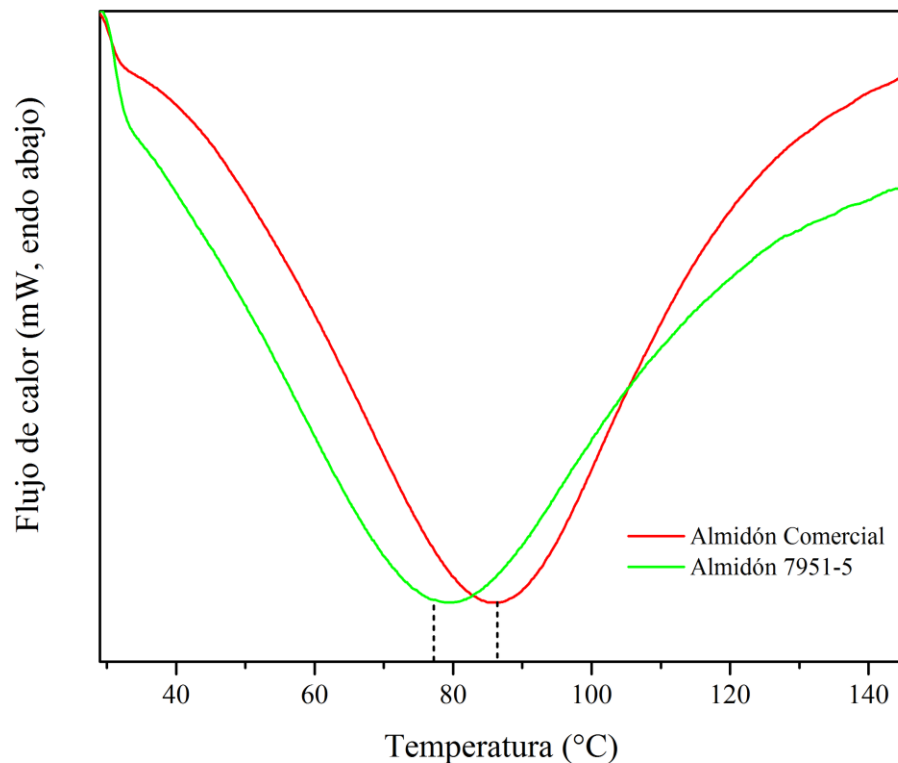


Figura 6. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para las muestras de almidón comercial marca Sigma Aldrich y almidón de yuca variedad CM7951-5.

En este sentido, la entalpía obtenida está relacionada con energía requerida para desestructurar el gránulo de almidón en el proceso de plastificación y a su vez con la composición de este. Con respecto a la composición del almidón, una mayor proporción de amilopectina dentro de los gránulos de almidón genera un ordenamiento superior debido a que esta biomacromolécula conforma la sección cristalina de los gránulos, ocasionando que se requiera una mayor energía para desestructurar los mismos en el proceso de gelación. Sin embargo, al correlacionar la composición de los almidones de yuca y papa se observa que existe una menor proporción de amilopectina en el almidón de papa (72,3 %) que en el de yuca (79,9 %) mientras que se requirió una mayor temperatura de gelación para el almidón de papa. Este resultado se atribuye al tamaño de los gránulos de almidón de papa; por lo que se puede afirmar que a pesar de que existe una menor proporción de amilopectina, el mayor tamaño de las cadenas poliméricas que componen los gránulos de almidón de papa tienen un

requerimiento energético superior frente a los gránulos de almidón de yuca. Estos resultados demuestran que las diferencias de temperatura de gelación entre el almidón obtenido de la variedad de yuca y el almidón comercial de papa se deben a la fuente vegetal de extracción.

122

5.2. Caracterización de los materiales obtenidos del rastrojo de piña

5.2.1. Caracterización del rastrojo de piña decortinado

Experimentalmente se realizó un proceso de decortinado a las hojas de la planta, este procedimiento remueve la corteza de la hoja exponiendo las macrofibras de la planta. Por lo cual, la determinación de la composición física y química del rastrojo de piña permite considerar el impacto del proceso de decortinado en el rendimiento de la extracción de celulosa.

En el cuadro 4 se muestra la composición física y química del rastrojo de piña decortinado. El contenido de extraíbles se determinó como 28,97 %, mientras que otras investigaciones realizadas por Wan Nadirah, 2012 reportan un 6,68 % ¹²³. Por su parte, se determinó un contenido 1,26 % cenizas de la fibra. Los elementos que constituyen las cenizas son Na, K, Ca, Si, Fe, Mg, Mn, Cl, Cr. ¹²⁴ Otras investigaciones realizadas por Moreno G., 2018 ¹²⁵ y Wan Nadirah, 2012 ¹²³ para rastrojo de piña no decortinado han reportado un contenido de 4,5 % y 4.73% de cenizas respectivamente. ¹²⁵ La remoción de la corteza de la hoja por el método de decortinado reduce el residuo inorgánico que queda luego que la biomasa se somete a combustión completa para la determinación de cenizas presentes en la muestra. ¹²⁶

Por otra parte, se cuantificó un 13,97 % de α -celulosa. Sin embargo, estudios similares realizados por Moreno G., 2018 ¹²⁵, Cherian *et al.*, 2010 ¹⁷, Khali *et al.*, 2006 ¹²⁷, Pardo *et al.*, 2014 ¹²⁸ y Wan Nadirah, 2012 ¹²³ reportaron para la fibra de hoja de piña un contenido de α -celulosa 75,5 %, 81,27 %, 73,4 %, 43,53 % y 74,33 % respectivamente. El resultado experimental presenta un bajo contenido de celulosa en la hoja de piña en contraste con varios de los datos reportados en la literatura. Estas diferencias entre estos estudios se pueden deber a las variaciones agroambientales y a genética de la planta. Por otra parte, el contenido de hemicelulosa determinado experimentalmente fue de 19,38 %, este resultado se encuentra

correlacionado con los valores presentados por los estudios mencionados anteriormente Cherian *et al.*, 2010 ¹⁷ obtuvo 12,31% y Khali *et al.*, 2006 ¹²⁷ un 7,1% y Pardo *et al.*, 2014 ¹²⁸ un 21,88 % de hemicelulosas en la fibra.

Cuadro 4. Composición física y química del rastrojo de piña decorticado en base seca.

| Parámetro | Valor (% m/m) |
|--------------------------------|----------------------|
| Humedad* | 71,960 ± 0,003 |
| Cenizas | 1,259 ± 0,005 |
| Extraíbles | 28,9741 ± 0,0002 |
| Celulosa | 13,9747 ± 0,0001 |
| Lignina ácida insoluble | 2,8549 ± 0,0001 |
| Hemicelulosa | 19,3812 ± 0,0003 |

De la misma manera, se determinó el contenido de lignina por medio de la hidrólisis de los carbohidratos presentes y la cuantificación posterior de sus residuos, dando como resultado un 2,85 % de lignina el cual se encuentra por debajo de los valores obtenidos en otros estudios, como el de Moreno G., 2018 ¹²⁵ con un 5,0 % y Cherian *et al.*, 2010 ¹⁷ con un 3,46 % de lignina. El bajo contenido de lignina en la fibra de las hojas de piña decortizadas puede deberse a la eliminación de la corteza de la hoja, con lo cual se facilita su eliminación para la extracción de celulosa mediante procesos alcalinos y de blanqueamiento.¹⁰¹

Con base en estos resultados, se puede apreciar una correlación entre los valores experimentales y los reportados por la literatura, y que, las diferencias encontradas entre dichos valores se justifican según las diferentes fuentes vegetales utilizadas en términos de genética, condiciones climáticas, composición química del suelo, época de cosecha y la utilización de la hoja de la planta con o sin corteza.¹²⁶

5.2.2. Caracterización de la nanocelulosa

El rendimiento de extracción de NCC a partir del sustrato celulósico obtenido del rastrojo de piña decortinado fue de 4,95 % en base seca. La pérdida de masa de celulosa durante el proceso de extracción de NCC puede estar relacionada a factores como la descomposición de las cadenas de celulosa durante el blanqueo, la pérdida de material inherente a diversos procesos de filtración y transferencia de masa, la eliminación de los componentes no celulósicos y principalmente al decortinado previo del rastrojo de piña.¹⁸

Con la finalidad de evaluar las características físicas de la nanocelulosa extraída de rastrojo de piña decortinado, se determinaron los grupos funcionales presentes mediante la técnica de FT-IR y se estableció el tamaño y concentración de la muestra por medio de DLS y TEM. Además, se elucidó el comportamiento térmico de la NCC utilizando un análisis termogravimétrico.

5.2.2.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

El espectro realizado para determinar la naturaleza química de la muestra de NCC extraída fue realizado por la técnica FT-IR y se muestra en la figura 7.

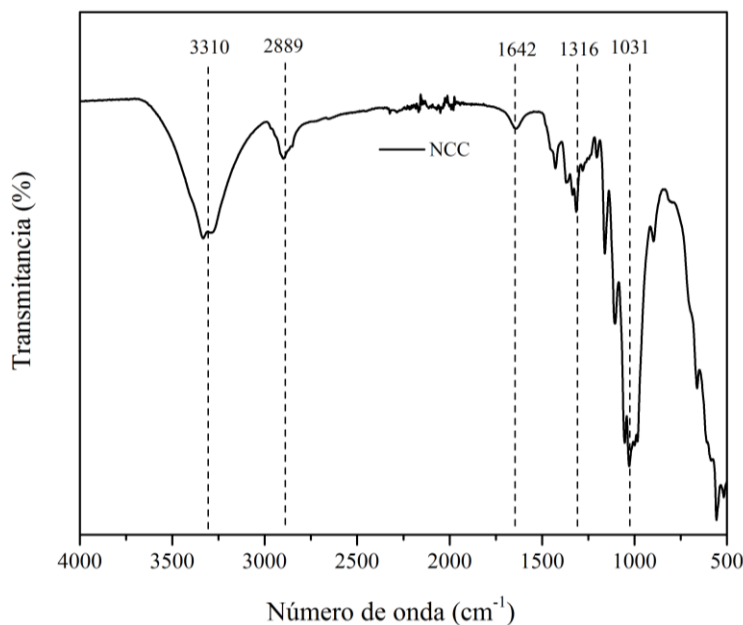


Figura 7. Espectro FT-IR de la NCC.

La muestra presentó dos regiones principales de absorbancia las cuales también han sido reportadas por Haafiz M., *et al.*; 2013¹⁰¹, Cherian B.M., *et al.*; 2010¹⁷ y Santos R., *et al.*; 2013¹⁸. Estas regiones se encuentran a números de onda altos de 3100 cm⁻¹ a 3800 cm⁻¹ y números de onda bajos de 500 cm⁻¹ a 1700 cm⁻¹, respectivamente. En el espectro infrarrojo se observa la amplia banda de absorción ubicada a 3310 cm⁻¹ producto del estiramiento de los grupos -OH, además una absorción a 2889 cm⁻¹ la cual está relacionada con el estiramiento de los grupos C-H presentes en la celulosa. La banda de absorción entre 1642 y 1316 cm⁻¹ está asociada al hidrógeno intermolecular en el carbono 6 del anillo de glucosa. La banda de absorción a 1031 cm⁻¹ corresponde al estiramiento de C-O-C y el pico ensanchado por debajo de 1000 cm⁻¹ está asociado a la vibración anomérica específica para el enlace glicosídico que constituye a la celulosa.^{17,18,101}

De acuerdo con lo anterior, el espectro revela la ausencia de la banda de absorción que corresponde a los grupos éster acetilo o urónico de las hemicelulosas que normalmente aparece en la región 1700-1740 cm⁻¹. Además, no hay picos definidos alrededor de 1500 cm⁻¹, los cuales se asocian al estiramiento del doble enlace C=C de los componentes de la lignina.^{13,18}

5.2.2.2. Determinación de tamaño de las partículas de NCC por DLS y TEM

Por medio de microscopía electrónica de transmisión mostrada en la figura 8, se evaluó la NCC obtenida por hidrólisis ácida de celulosa extraída utilizando rastrojo de piña como sustrato. La acción del ácido sulfúrico sobre la celulosa permitió el aislamiento de partículas de aspecto alargadas en forma de varilla. Sin embargo, como se puede observar en la figura 8 b), se obtuvieron partículas cuyo tamaño se encuentra en el rango de micras; resultado que se encuentra relacionado con una baja eficiencia del método utilizado para extraer las nano partículas.¹²⁹

En este sentido, el TEM se emplea para obtener información sobre la morfología y la calidad de dispersión de la NCC. La morfología de la nanocelulosa depende principalmente de su fuente y de las condiciones del proceso de hidrólisis ácida, como el tipo de ácido, la temperatura y el tiempo. En general, investigadores como Ferreira F.V., *et al.*; 2017⁷⁵ han

determinado que un ácido más fuerte, una temperatura más alta y un tiempo de reacción más largo pueden producir nano partículas más cortas. ⁷⁵

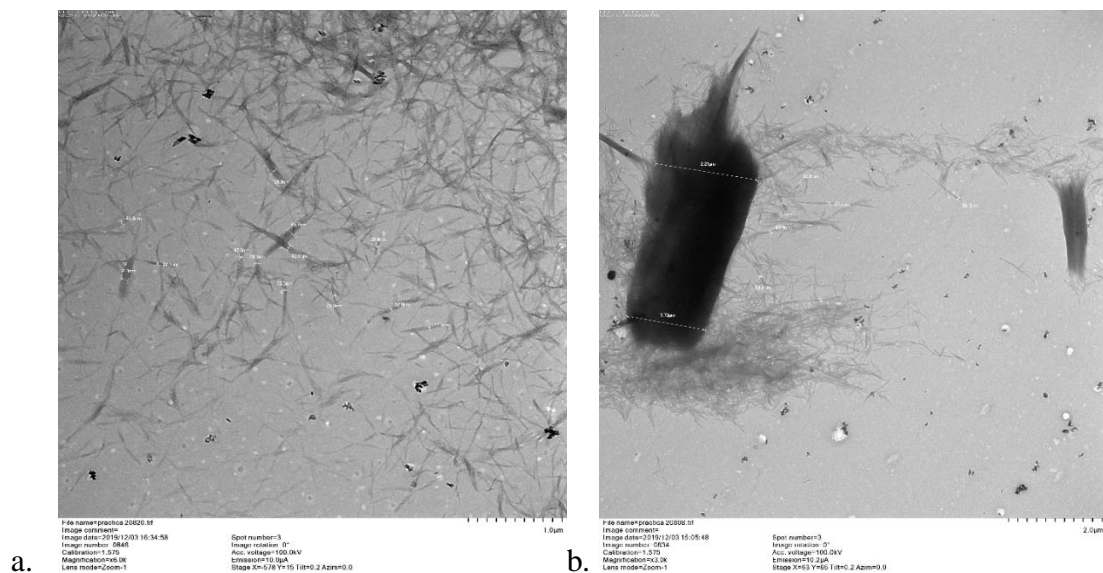


Figura 8. Microscopía electrónica de transmisión de la NCC. a. 6kX y b. 3kX.

Las partículas de celulosa con al menos una dimensión en nanoescala (1–100 nm) se denominan nanocelulosa. Los nanocrisales de NCC fueron producidos por primera vez por Rånby en 1949 usando hidrólisis ácida de fibras de celulosa dispersas en agua. En este método, se usa comúnmente ácido sulfúrico concentrado, que degrada las regiones amorfas de celulosa y deja intactas las cristalinas. Mediante dicho tratamiento, se produce NCC rígidos en forma de barra con grupos sulfato en su superficie. Su morfología generalmente depende de la fuente de celulosa. Comúnmente, se produce NCC con un diámetro de 3–35 nm y una longitud de 200–500 nm. ¹³⁰

El análisis de dispersión dinámica de luz permite establecer la concentración de partículas por mililitro de cada uno de los tamaños presentes en la muestra. Los resultados mostrados en la figura 9 denotan un tamaño de partícula mayoritario entre 401 y 495 nm cuya concentración máxima fue de $1,207 \times 10^7$ partículas por mililitro; además se presentó un segundo grupo de partículas con una longitud entre 702 y 807 nm y una concentración máxima de 1×10^7 partículas por mililitro. Finalmente, hubo un grupo minoritario con tamaños entre 3759 y 5331 nm y una concentración máxima de 1 302 000 partículas por

mililitro.⁷⁵ Estos resultados obtenidos por DLS concuerdan con el análisis de TEM donde se pudo observar que la muestra extraída presenta diversidad de tamaños derivados del proceso de extracción. Para efectos de la presente investigación, se utilizará la mezcla que comprende nano celulosa combinada con micro celulosa; en adelante será denominada NCC, debido a que la optimización del proceso de extracción de esta materia prima no forma parte de los objetivos de alcance de la investigación.

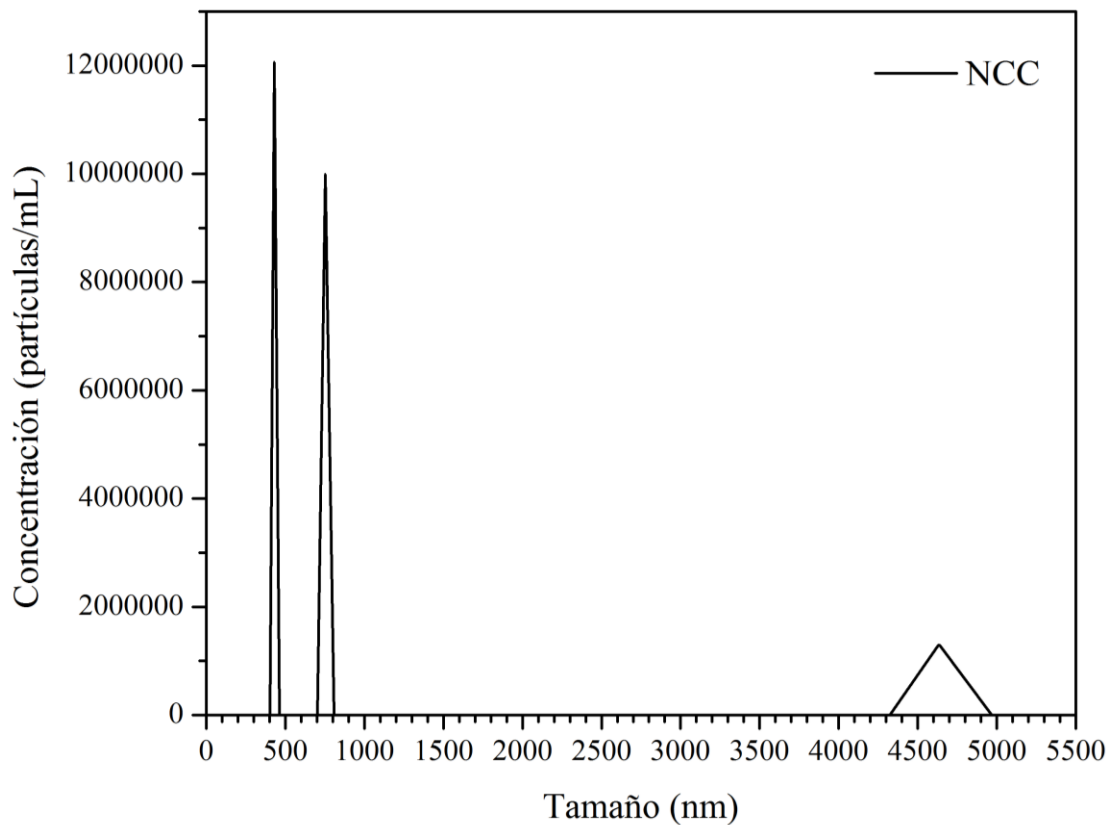


Figura 9. Gráfica de tamaño de la nanocelulosa extraída de rastrojo de piña con respecto a la concentración de partículas por mL de muestra analizada por DLS.

5.2.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las temperaturas de procesamiento típicas para los termoplásticos se elevan por encima de 200 °C, por lo que la estabilidad térmica de estos cristales es un factor clave para que puedan usarse como materiales de refuerzo efectivos en diversas aplicaciones.¹⁸ El resultado termogravimétrico para la muestra de NCC se muestran en la figura 10.

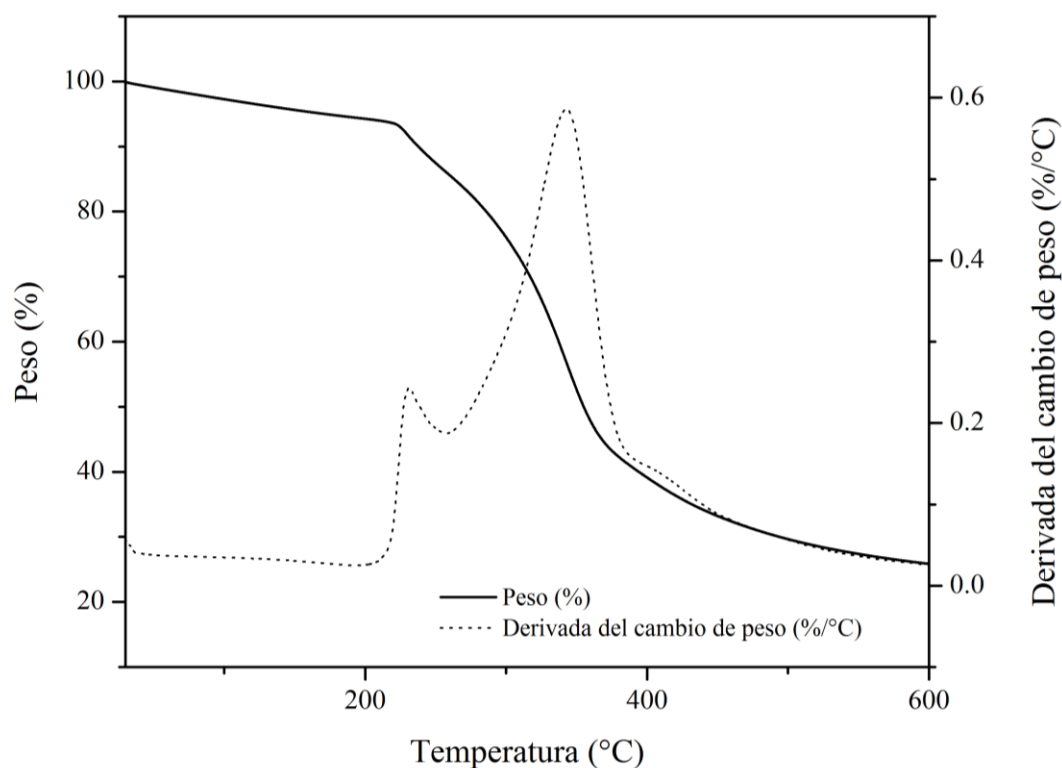


Figura 10. Curva termogravimétrica de % peso y la derivada del cambio en el peso con respecto a la temperatura de la NCC.

El inicio de la degradación térmica de los nanocristales de celulosa obtenidos de rastrojo de piña muestra dos zonas principales de pérdida de peso. A bajas temperaturas se presentó una pérdida de peso preliminar en un intervalo de 20°C a 200 °C como resultado de la evaporación de la humedad ligada a la superficie de las muestras o compuestos de bajo peso molecular correspondientes a la descomposición del enlace glucosídico o degradación de residuos de lignina, para formar residuos carbonosos. Por su parte, la segunda zona de pérdida de peso corresponde al rango de temperatura comprendido entre 235 °C y 400 °C correspondiente a la depolimerización de la celulosa que da lugar a productos volátiles que generan una pérdida de masa del 62 %, siendo este el evento principal de descomposición.

Las investigaciones realizadas por Santos *et al.*, 2013 para la NCC extraída de la misma fuente vegetal, mostraron temperaturas de degradación iniciales de alrededor de 245, 225 y 220 °C para muestras extraídas con ácido sulfúrico utilizando diferentes tiempos de extracción.¹⁸ Con respecto al método de extracción cabe señalar que el tratamiento con ácido

sulfúrico conduce a una disminución notable en la estabilidad térmica de NCC. Esto ocurre porque la incorporación de grupos sulfato en la superficie de la celulosa después de la hidrólisis tiene un efecto catalítico en sus reacciones de degradación térmica.¹⁸

Adicionalmente, investigaciones similares realizadas por Mishra R., *et al.*; 2018⁷⁴ han mencionado que el secado por convección de NCC elimina el agua, lo que conduce gradualmente a la creación de agregados. Como resultado, la NCC seca ofrece el menor nivel de estabilidad térmica en comparación con los cristales suspendidos en agua.⁷⁴ Experimentalmente se utilizará NCC suspendida en agua para la formación de TPS/NCC para disminuir la creación de agregados, proporcionar uniformidad, estabilidad y fácil dispersión en la película.

Con respecto a la curva termogravimétrica de la primera derivada, se evaluó la velocidad de la variación del peso con respecto a la temperatura. La muestra que presentó una temperatura de descomposición máxima de 341 °C, siendo esta la temperatura de descomposición donde existe la mayor pérdida de masa en los materiales. Por otro lado, existe una señal a 230 °C que describe una presunta separación de componentes dentro de la matriz de NCC derivada de residuos de los compuestos extraíbles, hemicelulosa atrapados en los aglomerados y/o la descomposición de grupos sulfato ligados a la superficie que fue modificada químicamente durante la extracción de NCC.⁷⁴

5.3. Preparación y caracterización del aceite esencial de romero

5.3.1. Rendimiento de la extracción de aceite esencial de romero

El proceso de hidrodestilación del AER generó un rendimiento del 2,5 % de extracción a partir del material seco compuesto por hojas y tallos delgados. El rendimiento de extracción por el método de hidrodestilación ha sido reportado como 2,05 % y 1,9 % para investigaciones similares realizadas por Jiang Y., *et al.*; 2011⁴⁰ y Ozcan M. y Chalchat J.; 2008¹³¹, respectivamente.

5.3.2. Caracterización del aceite esencial de romero

El AER se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS) para determinar la composición química de la muestra extraída y se realizó la cuantificación de fenoles totales como parte de la caracterización.

5.3.2.1. Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas (GC-MS)

El AER obtenido por hidrodestilación se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas, el anexo 2 describe los componentes identificados utilizando la metodología descrita. Se identificaron 38 componentes en total de los cuales el 1,8-cineol conocido como eucaliptol (25,23 %), alcanfor (18,39 %), β -mirceno (18,14 %), α -pineno (10,5 %), canfeno (4,16 %), bornil acetato (3,54 %) y β - pineno (3,40 %) representan los componentes principales.

Investigaciones similares realizadas por Jiang Y. *et al.*, 2011 bajo la misma técnica, identificaron un total de 22 componentes donde el 1,8-cineol (26,54 %), α -pineno (20,14 %), alcanfor (12,88 %), canfeno (11,38%) y β -pineno (6,95%) representan los componentes principales.⁴⁰ Además, Jalali-Heravi M. *et al.*, 2011 coinciden en algunos de los componentes mayoritarios determinados experimentalmente como 1,8-cineol (23,47 %), α -pineno (21,74%), berbonona (7,57%), alcanfor (7,21%) y eucaliptol (4,49%).¹³² La fracción volátil de *R. officinalis* difiere para muchos de los quimiotipos con respecto a los compuestos, y su abundancia. Las diferencias observadas probablemente pueden deberse a diferentes factores ambientales y genéticos, diferentes quimiotipos y el estado nutricional de las plantas, así como otros factores que pueden influir en la composición del aceite.¹³¹

5.3.2.2. Cuantificación de fenoles

En este estudio, el contenido fenólico total del extracto de la planta de romero fue de 6,71 mg AGE/g romero; el anexo 3 muestra la curva de calibración de ácido gálico elaborada para determinar los miligramos de AGE presentes en la muestra. Las investigaciones de Proestos C., *et al*; 2013¹³³ mostraron un contenido de fenoles de 8,5 mg AGE/g romero; mientras que Hesenov A., *et al*; 2010¹³⁴ obtuvieron valores de 10 a 36 mg AGE/g Romero al probar diferentes condiciones de almacenamiento.

Por otra parte, las condiciones de almacenamiento estudiadas por Hesenov A., *et al*; 2010¹³⁴ indican que la mayor actividad antioxidante se presenta en refrigeración a una temperatura de 4 °C, en la oscuridad y con un extracto fresco, es decir, que con el aumento en la temperatura, la presencia de luz y el almacenamiento prolongado disminuyen el contenido de fenoles totales con el consecuente descenso en el efecto antioxidante debido a que se genera la destrucción oxidativa del β -caroteno por los productos de la degradación oxidativa del ácido linoleico.¹³⁴

Es importante señalar que existe una correlación positiva entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico total de las plantas. Las plantas que pertenecen a la familia Lamiaceae son muy ricas en compuestos polifenólicos. Las diferencias en la composición de aceite volátil y el contenido total de fenol del romero podrían atribuirse a los efectos climáticos en las plantas que crecen en diferentes hábitats. Además, el tiempo de cosecha y el tipo de destilación influyen en la composición cualitativa del aceite volátil producido y el almacenamiento del mismo.¹³⁵

5.4. Preparación y caracterización de las películas de almidón termoplástico

5.4.1. Resultados cualitativos de las formulaciones de las películas de almidón termoplástico

Las películas de TPS fueron clasificadas mediante la observación, una vez que se encontraron secas para valorar cuales de ellas tenían características idóneas para ser analizadas en los procesos de caracterización funcional, para ello se tomaron las formulaciones uniformes y sin quebraduras. La figura 11 muestra las películas elaboradas para las formulaciones descritas en la sección 2.7.1.

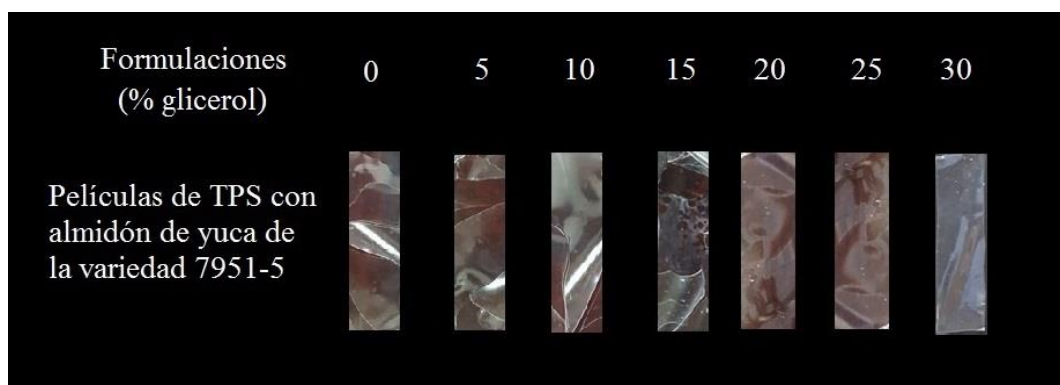


Figura 11. Películas de almidón termoplástico (TPS) elaboradas con almidón de yuca obtenido de la variedad CM7951-5 y porcentajes de glicerol de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 % de glicerol/contenido de almidón.

Como se puede observar en la figura 10, las películas de TPS con porcentajes de glicerol inferiores al 20 % presentaron quebraduras posteriores al secado; en contraste, la película con un contenido de 30 % de glicerol presentó pegajosidad debido a la aparente absorción de agua. Por otra parte, las películas TPS 20 % y TPS 25 % mostraron aparente flexibilidad, mayor resistencia y poca adherencia en un ambiente de humedad y temperatura controlada al 50 % HR y 21 °C respectivamente. Por lo tanto, debido a sus características aparentes, se seleccionaron las formulaciones TPS 20 % y TPS 25 % para realizar su caracterización por métodos térmicos, mecánicos y morfológicos. Posteriormente, con los resultados obtenidos de la caracterización, se determinó la formulación con la que se elaborarían los biocompuestos de TPS/NCC, TPS/AER y TPS/NCC/AER.

5.4.2. Caracterización de las películas de almidón termoplástico

5.4.2.1. Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopia FT-IR se ha utilizado para investigar cambios en la estructura del almidón al ser convertido en películas de TPS en un nivel molecular de corto alcance, e identificar las posibles interacciones entre el almidón, el agente plastificante y materiales adicionales como NCC y AER. Los espectros FTIR de las películas de TPS de almidón extraído de la variedad de yuca CM7951-5, las películas de TPS/NCC elaboradas con NCC extraída del sustrato

celulósico obtenido de rastrojo de piña y las películas de TPS/AER y TPS/NCC/AER se muestran en las figuras 12, 13 y 14 respectivamente.

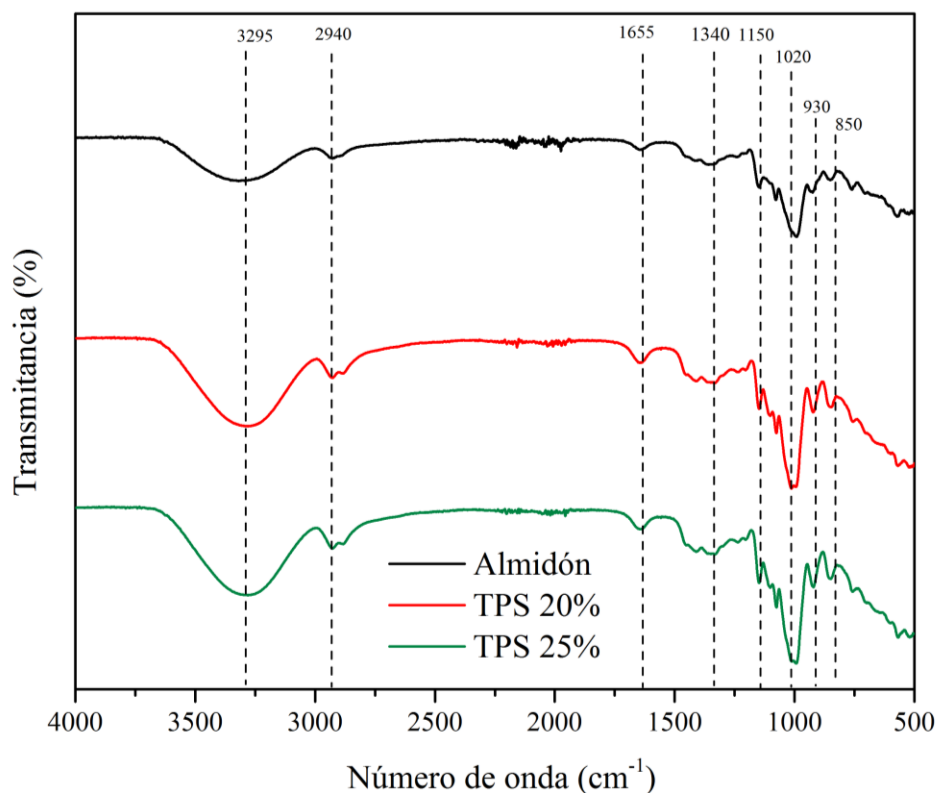


Figura 12. Espectro infrarrojo de las películas de TPS elaboradas con el almidón extraído de la variedad de yuca CM7951-5.

En las figuras 12, 13 y 14 se observan señales de gran similitud como lo son dos picos alrededor de ~ 1020 y 1145 cm^{-1} que representan el estiramiento de unión de C-O-C en el anillo de la unidad de anhidroglucosa. Los picos a $\sim 1645\text{ cm}^{-1}$ y 1330 cm^{-1} corresponden al agua fuertemente ligada en el almidón por enlaces O-H, mientras que el pico a $\sim 2940\text{ cm}^{-1}$ se atribuye a la vibración de estiramiento C-H en el anillo de anhidroglucosa, que se muestra intensificado en los análisis de muestras de TPS que contienen glicerol como plastificante (TPS 20 y 25 %) en contraste con la señal mostrada por los gránulos de almidón nativo en la figura 12. En este aspecto, la muestra de almidón nativo, es decir, no plastificado (línea negra), presenta menor intensidad en la señal del estiramiento de la banda ancha en aproximadamente $\sim 3290\text{ cm}^{-1}$ generado por las vibraciones de los grupos hidroxilo. De

acuerdo con esto se puede decir que las interacciones con el glicerol debidas a la plastificación del TPS se hacen notorias por medio del análisis espectroscópico.

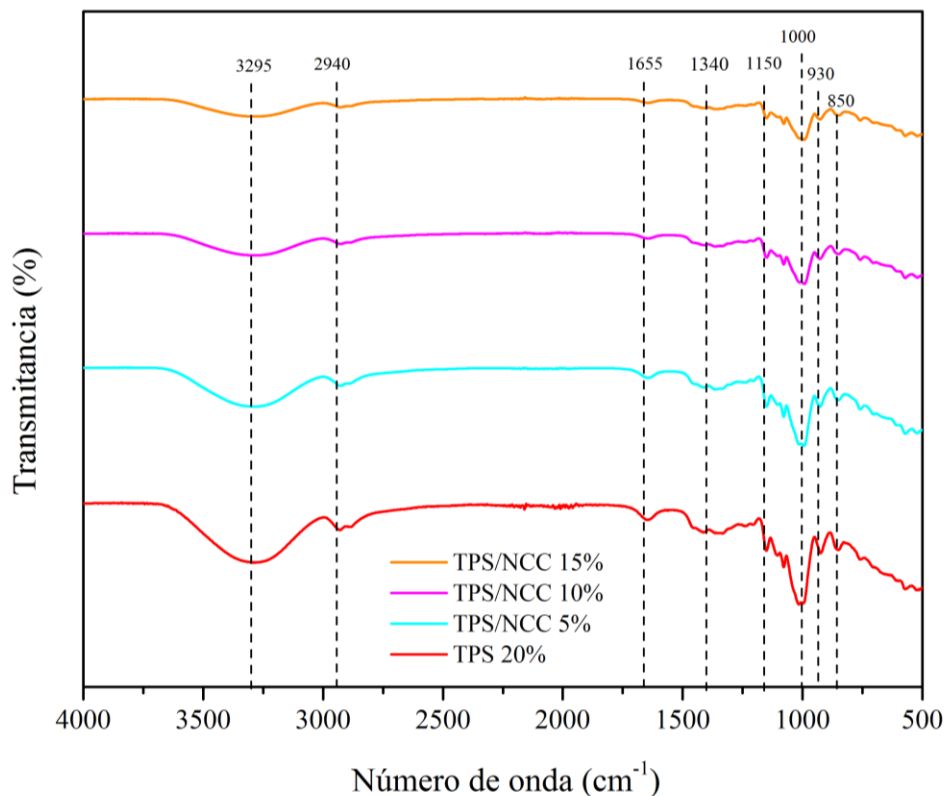


Figura 13. Espectro infrarrojo de las películas de TPS 20 % y TPS/NCC al 5, 10 y 15 %.

Por otra parte, para todas las películas preparadas adicionando NCC, AER o una combinación de ambos componentes, las señales obtenidas por medio del análisis espectroscópico fueron muy similares en cuanto al número de onda; sin embargo, las relaciones de altura de pico en el estiramiento a $\sim 1637\text{ cm}^{-1}$, 1330 cm^{-1} y $\sim 3290\text{ cm}^{-1}$ expresan la cantidad de agua unida en las muestras. Como se puede observar, en todos los casos estas bandas se ampliaron para las muestras que contienen glicerol con respecto a la muestra de almidón nativo, esto debido a una interacción por puente de hidrógeno entre los grupos del glicerol (R-O-R) y almidón (-OH). Sin embargo, se presentó una disminución en la altura de pico a $\sim 3290\text{ cm}^{-1}$ para las muestras que contienen NCC, AER o una combinación de ellos, lo que se podría interpretar como una disminución en la interacción con agua producto de la disminución de absorción

de humedad por parte de las películas formuladas con estos componentes al estar almacenadas a una temperatura de 21 °C y una humedad relativa de 55 % ± 5% HR.

Finalmente, se observaron varias bandas con frecuencias de onda bajas (inferiores a ~850 cm^{-1}) atribuidos a los complejos modos de vibración debido a las vibraciones en el modo esquelético del anillo de glucosa. En las investigaciones de Castillo *et al.*¹³⁶ y Nguyen *et al.*¹²² se obtuvieron resultados similares a este estudio.

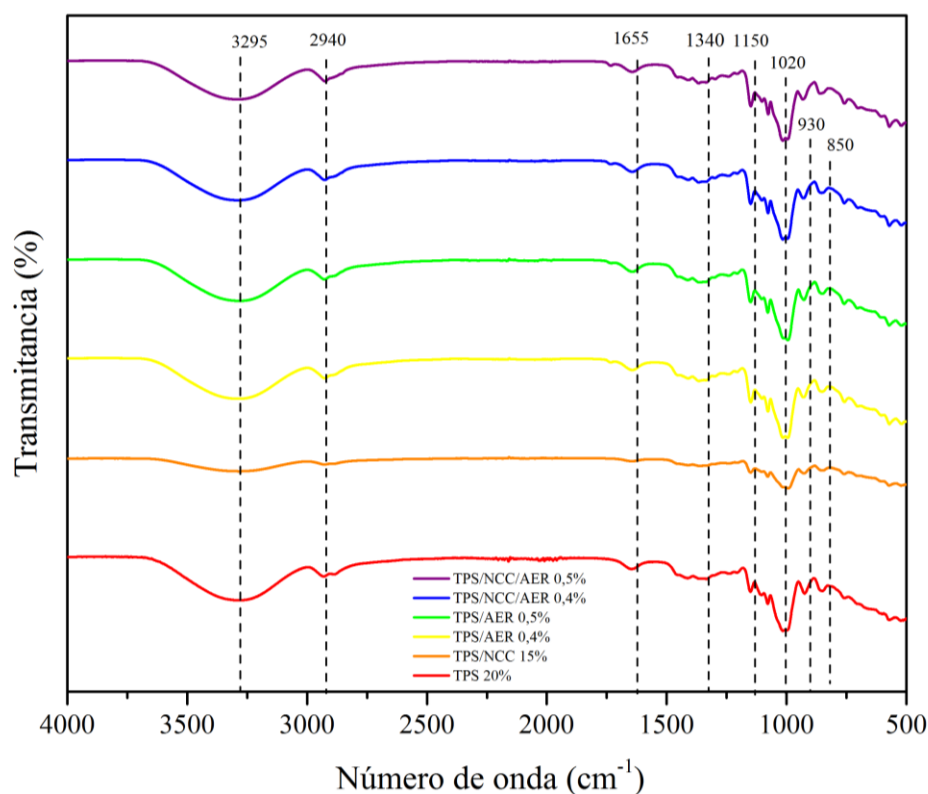


Figura 14. Espectro infrarrojo de las películas de TPS 20 % y TPS/NCC 15 % y TPS/AER 0,4 y 0,5 % y TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 %.

5.4.2.2. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las mediciones termogravimétricas se usaron para evaluar los procesos de degradación de los materiales obtenidos como una función de la temperatura como se muestra en las figuras 15, 16 y 17. Los datos de degradación térmica de los diferentes compósitos se presentan en

el cuadro 5 usando las temperaturas a las que se producen pérdidas de peso al inicio, en la degradación principal, el peso residual a 800 °C y la DTGA de las muestras.

Cuadro 5. Transiciones térmicas de las películas de TPS elaboradas con glicerol, NCC y AER en diferentes formulaciones.

| Muestra | Temperatura de degradación inicial (°C) | Temperatura de degradación final (°C) | % Pérdida de masa en la evaporación inicial | % Pérdida de masa en la degradación principal | % de masa residual a 800 °C | dTGA max (°C) |
|--------------------------|---|---------------------------------------|---|---|-----------------------------|---------------|
| Almidón de yuca CM7951-5 | 320 | 358 | 13,68 | 74,72 | 10,27 | 343 |
| TPS 20 % | 314 | 360 | 11,80 | 76,76 | 11,08 | 345 |
| TPS 25 % | 311 | 361 | 12,47 | 74,88 | 11,92 | 344 |
| TPS/NCC 5 % | 314 | 359 | 14,03 | 75,20 | 4,04 | 344 |
| TPS/NCC 10 % | 315 | 357 | 7,42 | 83,47 | 5,29 | 344 |
| TPS/NCC 15 % | 318 | 360 | 10,31 | 79,83 | 6,08 | 346 |
| TPS/NCC/AER 0.4 % | 308 | 360 | 12,58 | 68,94 | 10,20 | 339 |
| TPS/NCC/AER 0.5 % | 312 | 356 | 10,26 | 74,83 | 10,41 | 339 |
| TPS/AER 0.4 % | 315 | 357 | 9,62 | 78,36 | 9,87 | 339 |
| TPS/AER 0.5 % | 315 | 359 | 12,54 | 76,89 | 7,32 | 344 |

En general, todas las formulaciones presentaron una pérdida de peso inicial, correspondiente a la deshidratación de las muestras, hasta 200 °C y la evaporación de glicerol cuyo punto de ebullición es 182 °C.¹⁰⁵ Según Wilhelm *et al.*, 2003¹³⁷, el alto contenido de humedad (aproximadamente 15%) de este tipo de muestras es el resultado de la fácil difusión de las

moléculas de agua dentro de la matriz, a través de enlaces de hidrógeno con grupos hidroxilo de las unidades de glucosilo. ¹³⁷

Por otra parte, según lo informado por Liu et al. 2013 ¹³⁸ y Perotti et al., 2014 ¹³⁹ el almidón sufre una descomposición térmica alrededor de 200–400 °C la cual se asocia a la depolimerización de los anillos de D-glucosa con la consecuente degradación de la amilosa y la amilopectina. La masa total perdida a 800 ° C fue en promedio de entre 91 y 99 % aproximadamente. Datos presentados por Basiak E., 2017 ¹⁴⁰ para el almidón de yuca confirmaron los resultados obtenidos.

Específicamente, el termograma mostrado en la figura 15 a) muestra el proceso de degradación del TPS con 20 y 25 % de glicerol en comparación con la degradación de los gránulos nativos de almidón extraídos de yuca amarga. Como se aprecia, el evento principal de degradación entre 320 y 358 °C muestra un proceso de degradación más pronunciado para los gránulos de almidón nativos, cuya pérdida de peso corresponde a un 74,72 %, mientras que las películas de TPS 20 y 25 % presentaron un porcentaje de pérdida de peso de 76,76 % y 74,88 % respectivamente. Al analizar la temperatura de inicio de la degradación térmica de los compuestos, la misma se reduce cuando se ha plastificado el almidón nativo; esto se debe a que se requiere una mayor temperatura y energía para desestructurar las regiones cristalinas y amorfas de los gránulos que para degradar el TPS debido a la uniformidad que propicia la plastificación previa del almidón. Por otra parte, con respecto al mayor porcentaje de masa residual de TPS con respecto a los gránulos de almidón, se puede decir que al contener diversos componentes en la formulación se generan diversos residuos no ligados al TPS plastificado. Además, al analizar la gráfica de dTGA, no se observan diferencias significativas entre los datos obtenidos para la temperatura de degradación entre las muestras almidón y TPS 20 y 25 %.

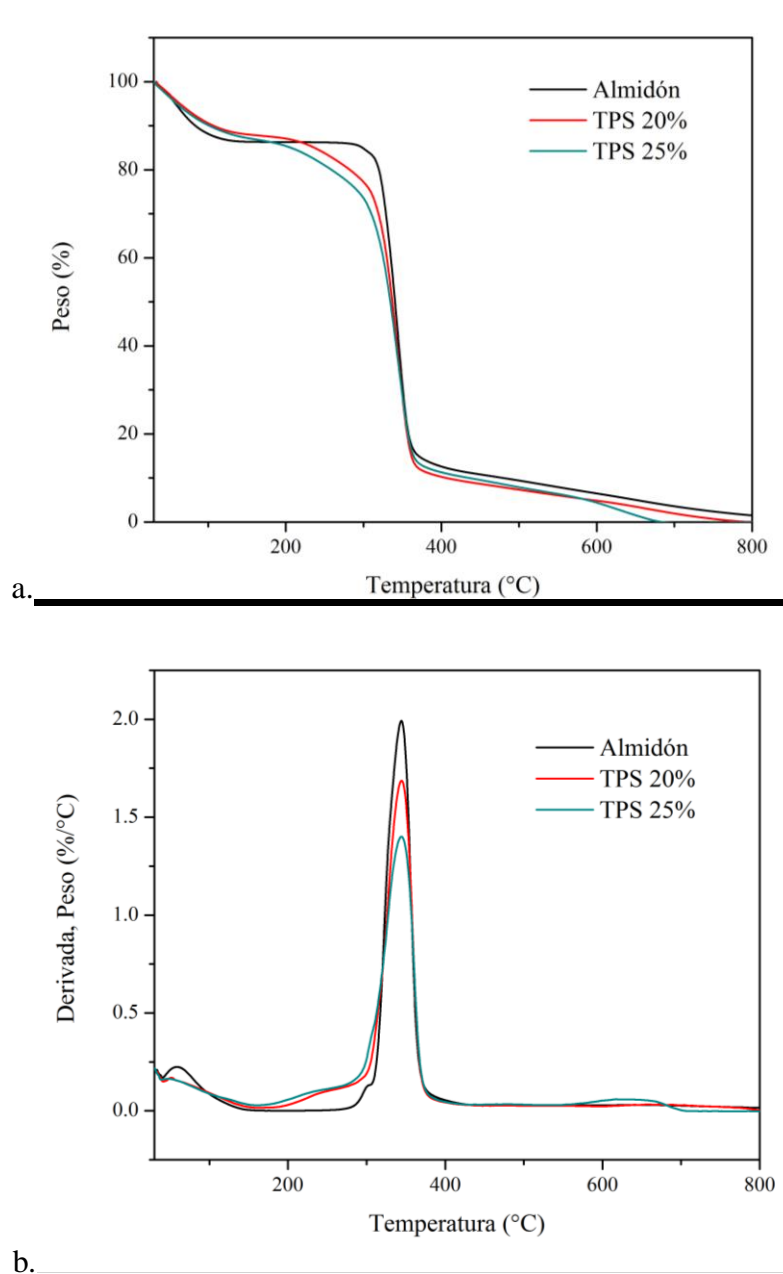
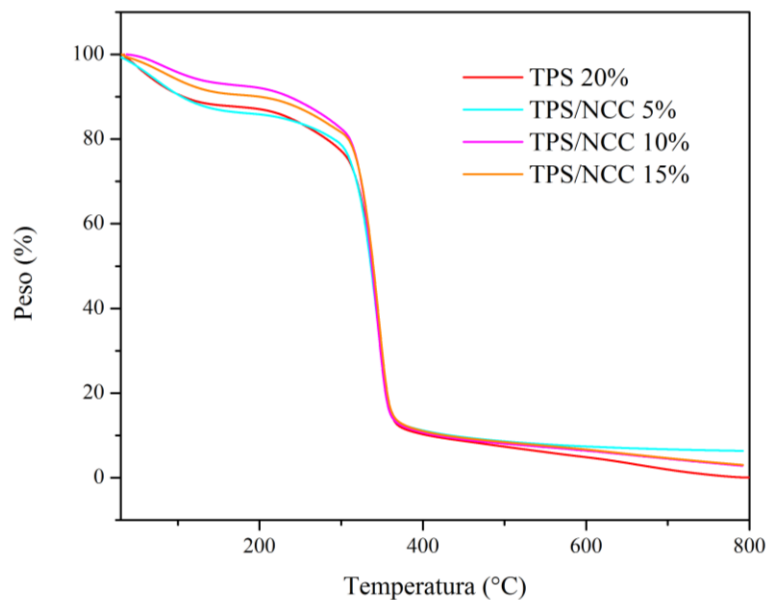


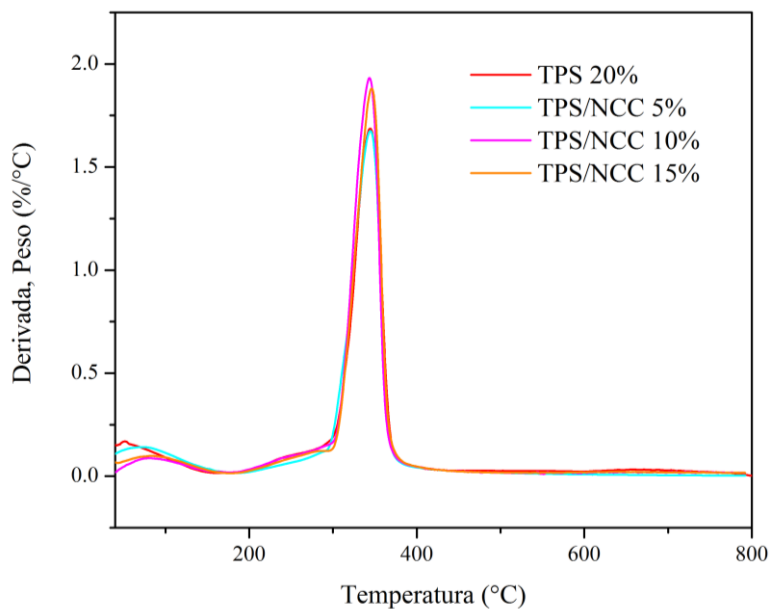
Figura 15. Termograma (a) y curva termogravimétrica de la primera derivada DTGA (b) de gránulos de almidón nativo, TPS 20 y 25 %.

Con respecto a las curvas de la primera derivada (figuras 15, 16 y 17 b) para todas las formulaciones mostraron una tendencia similar con respecto a las etapas de degradación térmica. Un primer evento de pérdida de peso por debajo de los 100 °C se asocia con la evaporación del agua y la evaporación de glicerol que no estaban involucrados en la matriz

de almidón termoplástico. Por otro lado, se observó el evento principal alrededor de 340 y 345 °C, correspondiente a la degradación térmica de los anillos de anhidroglucosa de la amilosa y amilopectina presentes en el almidón.



a.

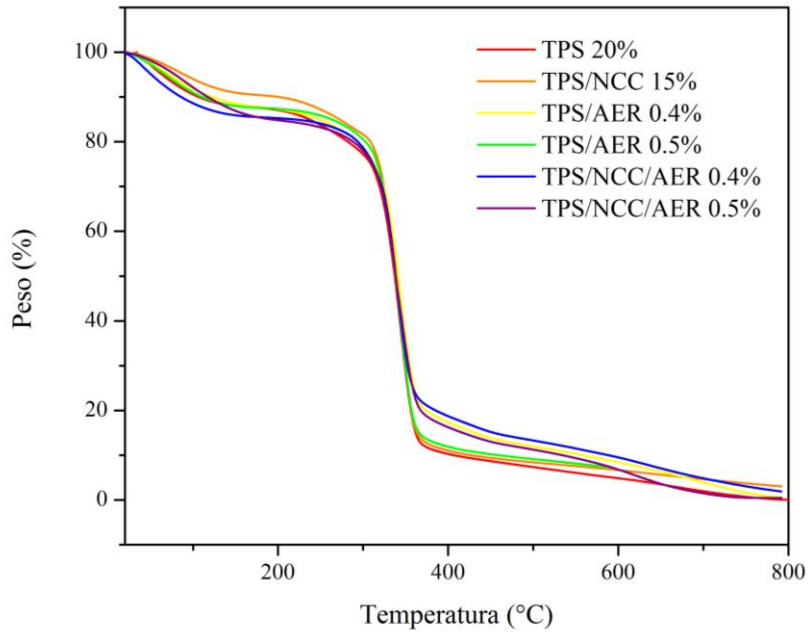


b.

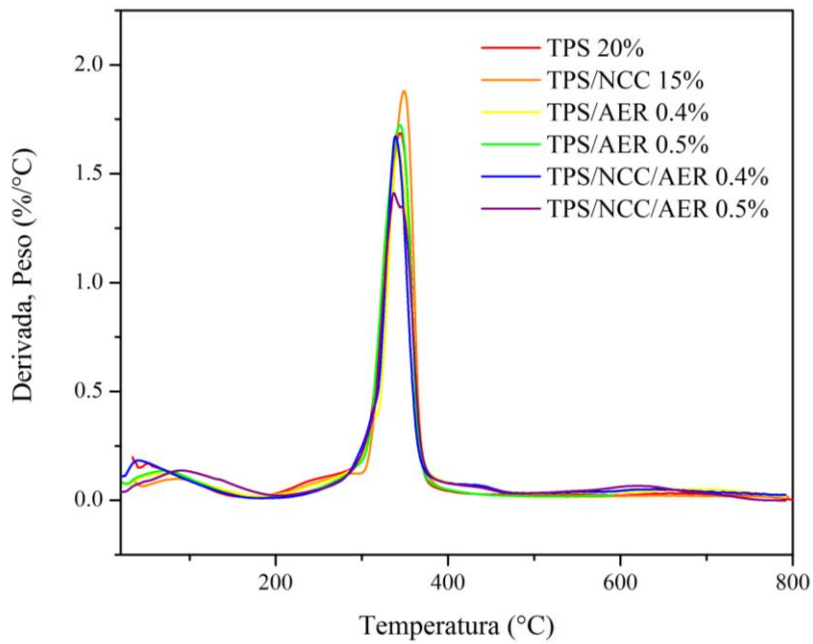
Figura 16. Termograma (a) y curva termogravimétrica de la primera derivada (b) de TPS 20 % y TPS/NCC 5, 10 y 15 %.

En el caso de la figura 16 donde se muestran las propiedades térmicas del TPS/NCC, el primer evento entre 25 y 100 ° C relacionado con la pérdida de humedad absorbida, el segundo entre 100 y 200 ° C está asociado a la descomposición de la fase rica en compuestos volátiles como agua y glicerol y el último, por debajo de 400 ° C se debe a descomposición térmica. Por otra parte, según resultados descritos por González K., *et al.* 2015 mostraron una disminución de la estabilidad de la degradación de los bionanocompuestos que contienen NCC comparados con la película de TPS debido a que los grupos éster de sulfato ácido unidos a la superficie de nanocristales de celulosa durante la extracción de NCC pueden actuar como catalizadores de la descomposición térmica, lo que resulta en una disminución de la temperatura de degradación de los nanocompuestos en comparación con la de la matriz sin relleno. Sin embargo, la proporción de NCC de 5, 10 y 15 % utilizada como refuerzo dentro de la matriz de TPS no proporciona diferencias significativas para afirmar que la cantidad de grupos éster de sulfato ácido propician una disminución de la temperatura de descomposición.¹²

Al mismo tiempo, para el análisis de los biocompuestos elaborados con TPS/AER y TPS/NCC/AER, como se muestra en la figura 17 y 18, el uso de AER dentro de la matriz termoplástica no condujo a una diferencia significativa entre los resultados. No obstante, se esperaba una reducción en la estabilidad térmica de las películas debido a la disminución entre las interacciones polímero – polímero como consecuencia de la presencia del aceite en la formulación. Experimentalmente, no se observaron diferencias significativas entre el TPS sin AER, con lo cual se puede afirmar que la estabilidad térmica de la matriz no se vio afectada por la baja concentración de AER utilizada.¹²



a.



b.

Figura 17. Termograma (a) y curva termogravimétrica de la primera derivada (b) de TPS 20 %, TPS/NCC 15 %, TPS/AER 0,4 y 0,5 % y TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 %.

5.4.2.3. Calorimetría de barrido diferencial (DSC)

El almidón nativo no se considera un polímero termoplástico debido principalmente a su estructura morfológica puesto que al ser evaluada por DSC, su temperatura de transición vítrea (T_g) se ubica por encima de la temperatura de descomposición.¹²¹ Para transformar los gránulos de almidón en un material termoplástico se requiere la ruptura de su conformación semicristalina. La interrupción granular se lleva a cabo en presencia de un plastificante lo cual disminuye los valores de T_g , procesado bajo alta presión de corte y temperatura.¹²¹

Los materiales termoplásticos pueden sufrir un proceso reversible, volviéndose flexibles o moldeables por encima de su temperatura de fusión y sólidos al enfriarse. Por lo tanto, la determinación de los parámetros asociados con esta transición térmica se llevó a cabo para establecer las temperaturas de procesamiento. En este sentido, se realizaron ensayos de DSC para el TPS con 20 y 25 % de glicerol en la formulación como se muestra en la figura 18.

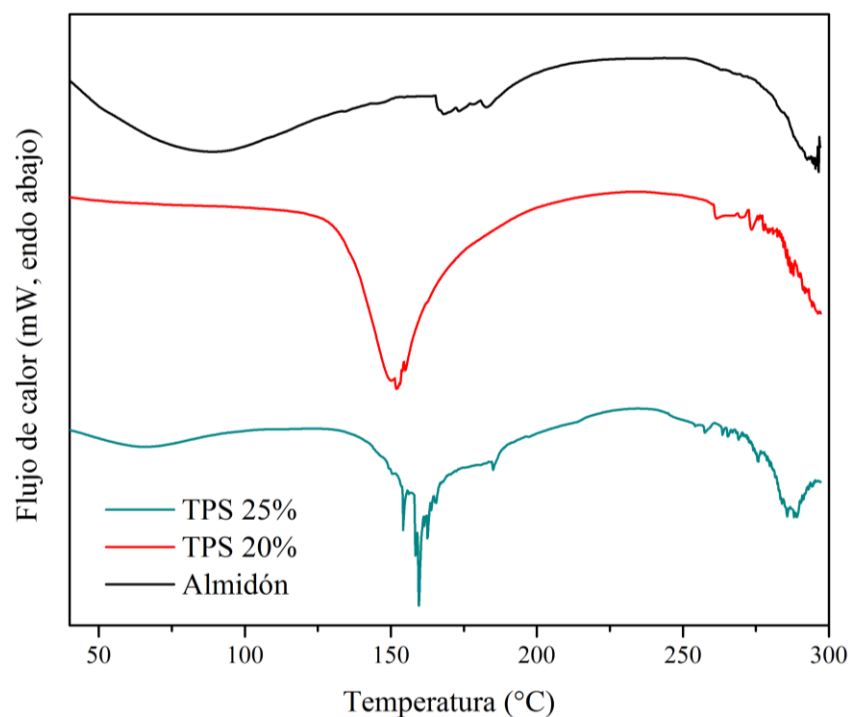


Figura 18. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para el gránulo de almidón nativo y las películas de TPS 20 % y TPS 25 %.

Experimentalmente los gránulos de almidón nativos almacenados con una humedad aproximada del 15 % sufrieron un proceso de deshidratación al alcanzar aproximadamente los 100°C como se observa en la figura 18. Además, con respecto a las formulaciones de TPS se observó una transición primaria endotérmica debida a la fusión de los cristales derivados del proceso de retrogradación que sufre el TPS en los días posteriores a su plastificación, esta temperatura fue de 151,84 y 159,66 °C respectivamente, para muestras acondicionadas a 50 % HR y 21 °C; otras investigaciones han reportado que el almidón plastificado con un contenido de agua menor al 35 % de humedad relativa (HR) no se presenta ningún pico endotérmico en el DSC, lo cual indica un estado amorfo del material. Otras investigaciones realizadas por Angle`s y Dufresne, 2000 ¹⁴¹ mostraron que al aumentar el contenido de humedad para muestras acondicionadas entre 43 % y 58 % HR, aparece un pico endotérmico de 130 °C hasta 155 °C respectivamente, lo cual coincide con los resultados obtenidos.

La temperatura de fusión depende de la proporción de almidón y agua. Con un gran exceso de agua, solo aparece una endoterma en la curva DSC, correspondiente a la temperatura de gelatinización, mientras que con un contenido moderado de agua, solo aparece una endoterma nuevamente pero a una temperatura más alta. Con una concentración de agua intermedia, se observan dos transiciones endotérmicas. Este comportamiento ha sido correlacionado al estudiar el punto de fusión de las fases cristalinas y la cantidad de agua añadida. ⁷⁰

En este sentido, la figura 19 muestra una comparación entre las películas de TPS 20 % y TPS/NCC 5, 10 y 15 % donde la transición primaria del TPS/NCC presenta una separación de picos la cual puede ser ocasionada por la separación de los componentes dentro de la matriz, proporcional al aumento de NCC. Lo anterior se debe a que el agua no se distribuye de manera homogénea en el gránulo y la difusión puede jugar un papel importante en ese proceso. Esta falta de homogeneidad conduce a una fusión parcial, seguida de recristalización y refundición, lo que implica que la termoplastificación se trata de un proceso irreversible.

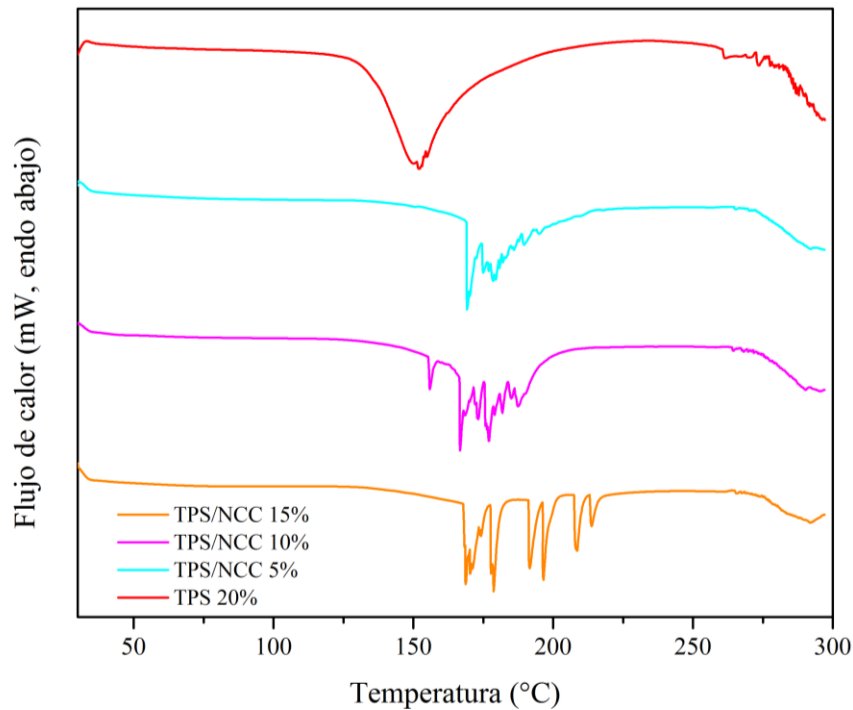


Figura 19. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para las películas de TPS y TPS/NCC.

Además presenta un aumento en la temperatura de transición en el rango entre 150 °C y 220 °C ocasionado por la presencia de NCC dentro de la matriz, cuyas interacciones por puente de hidrógeno con la amilosa y la amilopectina del almidón ocasionan un desplazamiento hacia temperaturas mayores debido a que se requiere una mayor energía para desestructurar el material.¹³

Asímismo, las curvas de DSC correspondientes a las formulaciones con NCC presentan varios picos a diferencia del TPS 20 % analizado. Esta diferencia puede atribuirse a la inadecuada dispersión de componentes dentro de la matriz y a una baja adherencia interfacial del refuerzo, lo cual limita la reorganización de las cadenas moleculares de almidón y el efecto de cristalización de las moléculas de amilopectina. Como resultado, se pueden observar puntos de fusión a diferentes temperaturas alrededor del evento principal.¹³

Para todas las películas elaboradas se muestra una transición primaria atribuida a la fusión de los dominios de amilopectina cristalinos inducidos por el agua debido a que durante el almacenamiento, el almidón gelatinizado puede convertirse de una forma no cristalizada a una forma cristalina. Este evento, conocido como retrogradación, resulta de la re-asociación de la amilopectina en estado amorfo con un bajo grado de ordenamiento en un estado más ordenado.¹⁴¹ Este fenómeno incluye la formación de ordenación de corto alcance de la amilosa y la formación de dobles hélices características de la estructura de la amilopectinas.¹⁴¹

Esta reorganización y cristalización de las moléculas de amilopectina se ve favorecida por el efecto de plastificación inducido por el agua y el glicerol.¹⁴¹ Cuanto mayor sea el contenido de plastificantes, la amilopectina forma hélices dobles intermoleculares. El desplazamiento del pico endotérmico hacia temperaturas más altas cuando el contenido de plastificante aumenta, probablemente se deba a la formación de dominios de cristales más grandes como resultado del aumento de la movilidad de las cadenas amorfas. Además, el aumento de la cristalinidad de la amilopectina disminuye la movilidad de la misma, lo que resulta en un refuerzo de la red por la formación de enlaces y una estabilización del fenómeno de retrogradación.¹⁴¹

Bajo este contexto, el análisis de las transiciones térmicas de las demás formulaciones elaboradas con AER y NCC/AER mostradas en las figuras 20 y 21, permiten observar que el efecto del AER adicionado a la matriz termoplástica de TPS y a la matriz de TPS con NCC, donde tanto el aceite esencial como el surfactante Tween utilizado actúan como plastificantes induciendo un desplazamiento térmico hacia mayores temperaturas.¹³ El Tween 80 o polisorbato 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$) es un aditivo alimentario que por sus características actúa como tensoactivo no iónico, es decir, funciona como surfactante hidrofílico emulsificando el aceite de romero dentro de la matriz acuosa de almidón; lo que a su vez propicia la plastificación al permitir la transición de las secciones cristalinas del almidón a secciones amorfas.¹³

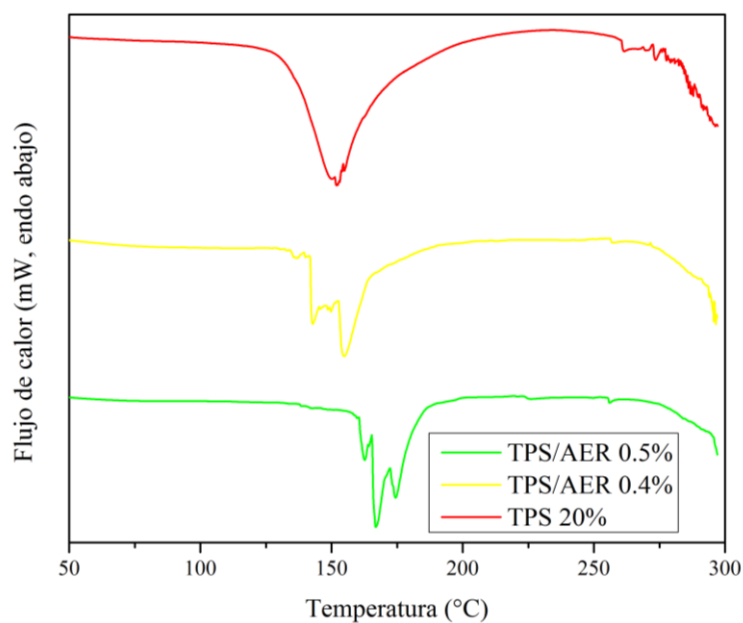


Figura 20. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para las películas de TPS 20 % y TPS/AER 0,4 y 0,5 %.

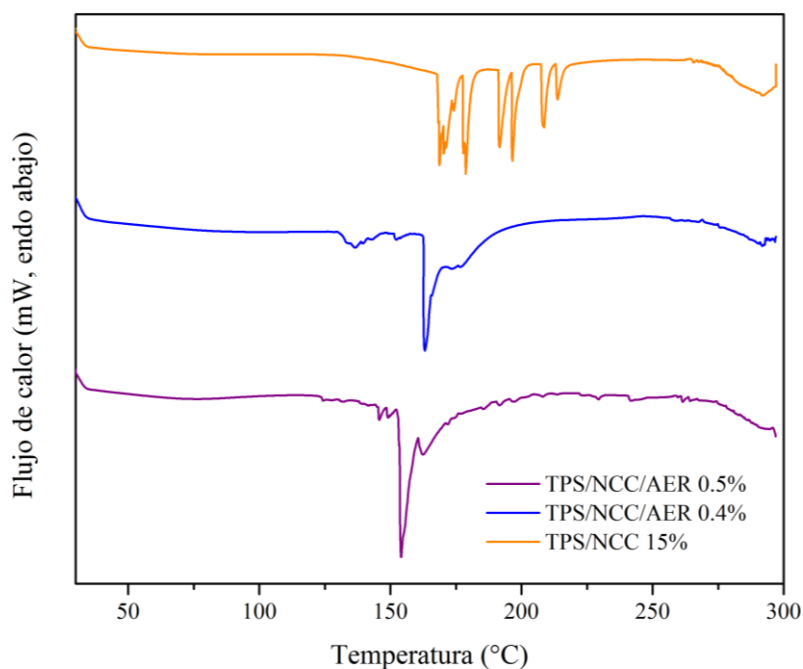


Figura 21. Termograma obtenido a partir de un análisis por DSC para las películas de TPS/NCC 15 % y TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 %.

Además, se observa un efecto reducido en la cantidad de señales presentes al evaluar las películas de TPS/NCC con respecto a las de TPS/NCC/AER, estas últimas presentaron una menor cantidad de señales lo cual puede ser indicativo de que el AER presente no sólo actúan como plastificantes sino que propicia la uniformidad de la muestra al ser expuesta a temperaturas mayores a los 100 °C. ¹³

5.4.2.4. Propiedades mecánicas

Las características mecánicas de las películas son importantes porque están relacionadas con el uso final de estos materiales. Las propiedades mecánicas de las películas se estudian normalmente a través de pruebas de tracción, extendiendo gradualmente la película a una velocidad dada y registrando la resistencia frente al tiempo o la distancia. Los parámetros de tracción más utilizados son el módulo elástico o módulo de Young (EM, por sus siglas en inglés), directamente relacionado con la rigidez de la película, la resistencia a la tracción (TS, por sus siglas en inglés) como una medida de la resistencia de la película y el porcentaje de alargamiento a la rotura (% EB, por sus siglas en inglés) vinculado a la capacidad de estiramiento de la película tras el rompimiento. El estudio de estas propiedades características es importante para determinar el alcance de las aplicaciones que tendrá el material elaborado. ¹⁴² Los resultados de los parámetros de propiedades mecánicas analizados experimentalmente se presentan en el anexo 6, cuadro 12 y las figuras 22 a 24.

Las propiedades mecánicas dependen sustancialmente de la composición de la mezcla de almidón con los aditivos; la figura 22 muestra una representación gráfica de los datos obtenidos para la resistencia a la tracción con respecto a las diferentes composiciones de TPS elaboradas experimentalmente. En general, la resistencia a la tracción se encontró en el rango entre 0,495 y 1,795 MPa. Específicamente, las películas de TPS de 20 % y 25 % de glicerol con respecto al contenido de almidón, mostraron una resistencia a la tracción de 1,263 y 1,569 MPa, un alargamiento a la rotura de 76,77 % y 34,85 % y un módulo de 4,47 y 12,37 MPa.

En este sentido, se observa un aumento en la resistencia a la tracción del TPS con el aumento del contenido de glicerol el cual está respaldado por los datos del módulo de Young; este aumento en TS y EM es típico para materiales flexibles y se encuentra relacionado con el

aumento en el contenido de glicerol utilizado, debido a las interacciones moleculares por puente de hidrógeno que interactúan con las moléculas de amilosa y amilopectina ocasionando una mayor movilidad de las moléculas. ¹⁴³ De acuerdo con estudios realizados por Mali S. *et al.*, 2005 ¹⁴³ donde también se probaron las propiedades mecánicas de las películas de almidón de yuca utilizando 20 y 30 % de glicerol según el contenido de almidón, se obtuvieron valores de TS entre 3 y 8 MPa, valores de % EB entre 40 y 60 % y EM entre 50 y 100 MPa. ¹⁴³

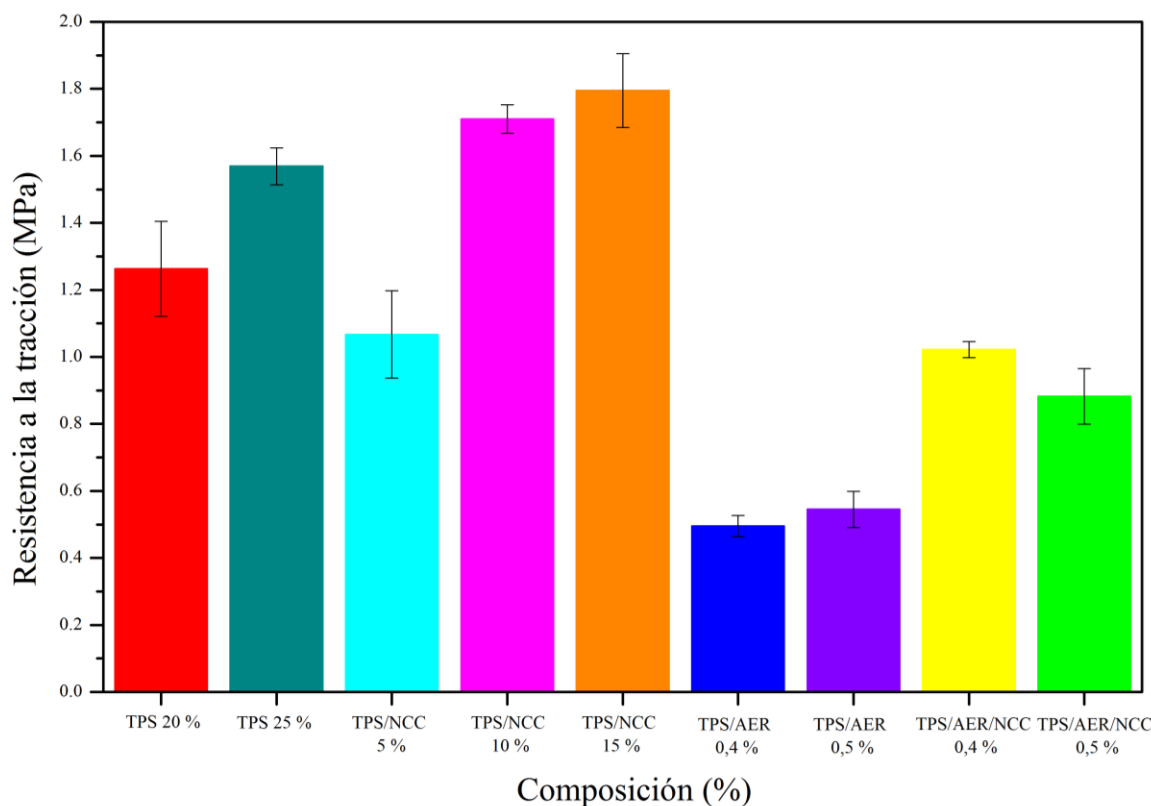


Figura 22. Resistencia a la tracción (MPa) de las películas de TPS según su composición de TPS, TPS/NCC, TPS/AER y TPS/NCC/AER.

En cuanto a los resultados obtenidos para las pruebas mecánicas realizadas para las películas de TPS/NCC, como se puede observar en la figura 22 la resistencia a la tracción aumentó al incrementar el contenido de NCC desde 10 a 15 %, dando valores de 1,71 y 1,80 MPa respectivamente. Los resultados obtenidos por Ma X., *et al.*, 2017 ¹³ mostraron que la resistencia a la tracción aumentó significativamente de 5 a 15 MPa aproximadamente, al

aumentar la concentración de NCC a 0 a 0,3 g/100 mL triplicando así los valores de resistencia. Sin embargo, para el TPS/NCC 5 % el TS fue de 1,07 MPa un resultado de TS menor con respecto a la formulación que contiene únicamente TPS y puede deberse a que la proporción de NCC utilizada no proporciona una mejora en la resistencia a la tracción dentro de la formulación.

La mezcla de almidón/NCC conduce a un incremento discreto de la resistencia a la tracción de las películas de 10 y 15 % de NCC. Estos resultados indicaron la formación de una interacción intermolecular entre el grupo hidroxilo de las moléculas de almidón y el grupo hidroxilo de la NCC, debido a la naturaleza química similar entre la matriz de almidón y el refuerzo de NCC, ambos derivados de unidades de D-glucosa.¹³

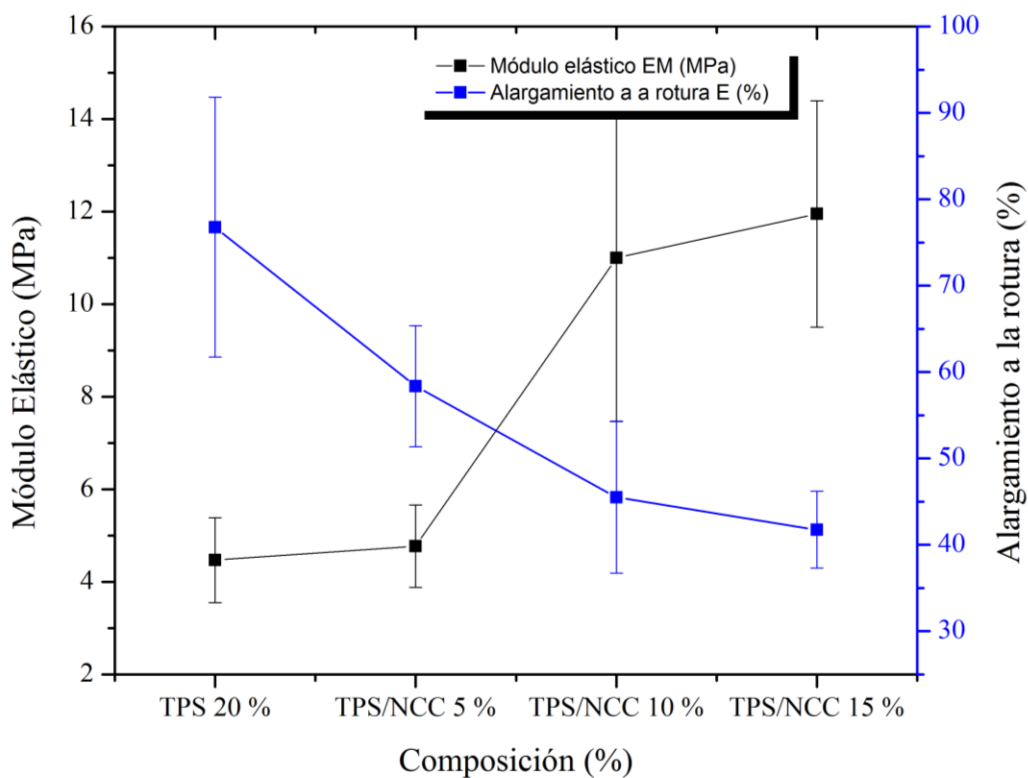


Figura 23. Módulo elástico (MPa) y alargamiento a la rotura (%) para las muestras de TPS 20 % y TPS/NCC 5, 10 y 15 %.

Además, como se puede observar en la figura 23, la representación gráfica de los datos obtenidos para el módulo elástico con respecto al alargamiento a la rotura donde se observa que el módulo elástico presentó valores más altos de módulo para los bionanocompuestos que para el TPS donde el aumento fue proporcional al aumento de NCC en la composición; se obtuvo así una rigidez de 4,47 MPa para el TPS 20 % hasta 11,95 MPa para la formulación de TPS/NCC 15 %; es decir, la combinación de los nanocristales de celulosa dentro de la matriz conduciría a una red de enlace de hidrógeno que aumenta la rigidez del material obtenido.¹²

Además, se detectó el efecto contrario para el alargamiento a la rotura que presentó una tendencia decreciente con niveles crecientes de refuerzos de NCC adicionados a la composición; desde 76,77 % para el TPS 20 % hasta 41,75 % para la formulación de TPS/NCC 15 %. Este resultado podría atribuirse al hecho de que concentraciones suficientemente altas de refuerzos forman una red rígida y continua de refuerzos unidos entre sí por enlaces de hidrógeno, lo que restringiría el estiramiento de la cadena, lo que indica que la NCC podrían reducir de manera más efectiva la fragilidad de las películas a base de almidón de yuca.¹³

En síntesis, la razón principal del aumento la resistencia dentro de las propiedades mecánicas, es la fuerte interacción entre el almidón de yuca y la NCC, que se debe al área de contacto expuesta de los cristales de orden nano y micro que interaccionan por medio de puentes de hidrógeno con el almidón desestructurado. Durante el procesamiento y el secado de las películas, los fuertes enlaces de hidrógeno formados entre los grupos hidroxilo de las cadenas de NCC y los grupos hidroxilo en la cadena de almidón de yuca propician un aumento en la resistencia del termoplástico elaborado.¹³ En comparación con los datos presentes en el cuadro 1 que describen las propiedades de los materiales de embalaje principales utilizados en la industria plástica, se puede decir que, con respecto a la resistencia a la tracción, el TPS/NCC 15 % es similar a los valores más bajos de resistencia del LDPE y PVC. Estos resultados indican que el biocompuesto elaborado podría sustituir algunas aplicaciones relacionadas con estos materiales de empaque tradicionales.

Por otro lado, la adición de AER a las muestras de TPS presentó resultados de resistencia a la tracción que disminuyeron de 1,26 MPa para el TPS 20 % a 0,495 y 0,545 MPa para el TPS/AER 0,4 y 0,5 % respectivamente y de 1,80 para el TPS/NCC 15 % a 1,022 y 0,882 MPa para el TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 % respectivamente. En este sentido, el efecto de la adición de lípidos como lo son los aceites esenciales sobre las propiedades de tracción de las películas elaboradas utilizando la formulación base de TPS 20 % y TPS/NCC 15 % demuestran que existe una correlación entre las características de los aceites y su capacidad para interactuar como plastificantes dentro de la matriz de polisacáridos.⁸⁵

Además, estos datos se encuentran respaldados por los valores de módulo de Young presentes en la figura 24, los cuales decaen con respecto a las formulaciones sin este componente, se observó un módulo de 5,81 y 3,50 para el TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 % respectivamente, mientras que los valores más bajos fueron obtenidos para el TPS/AER 0,4 y 0,5 % con módulos de 2,57 y 2,64 MPa respectivamente; en comparación con sus análogas sin AER, el módulo elástico fue de 4,47 MPa para el TPS 20 % y 11,95 MPa para el TPS/NCC 15 %.

La incorporación de AER en la matriz de la película induce una estructura de película heterogénea. Esto afecta las propiedades de tracción de las películas, dependiendo de las características del lípido agregado. La reducción de la resistencia y la rigidez podrían explicarse principalmente por el reemplazo parcial de interacciones polímero-polímero más fuertes por interacciones de Van der Waals polímero-aceite más débiles en la red de películas las cuales reducen la cohesión de las fuerzas de la red de almidón, reduciendo la resistencia a la tracción de la película y a su vez la rigidez de la matriz disminuye.¹⁴⁴ (Shojaee-Aliabadi et al., 2013).¹⁴²

Así mismo, en cuanto a las películas de TPS/NCC, la reducción observada en las propiedades mecánicas con respecto al TPS/NCC/AER se debe a que las interacciones polímero - refuerzo se ven afectadas por la presencia del aceite esencial debido a la generación de agregados, es decir, que se genera una mayor cantidad de interacciones entre los nanocristales de celulosa que evitan la dispersión adecuada del refuerzo dentro de la matriz y reducen así las propiedades de rigidez y resistencia de la matriz.¹³ El mismo comportamiento se observó en las películas de almidón de yuca donde se estudió el efecto de la adición de Tween como

surfactante; este efecto se debe a que el tensioactivo aumenta el volumen libre en las cadenas de almidón adyacentes generando una estructura más dúctil.¹⁴⁴

Por su parte, la representación gráfica de los datos obtenidos para el módulo elástico con respecto al alargamiento a la rotura mostrados en la figura 24 permite observar que para las películas de TPS/AER 0,4 y 0,5 %, el alargamiento a la rotura fue de 113 y 106 % EB respectivamente; mientras los valores para el TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 % fueron de 65 y 101 % E respectivamente. Por lo cual, la proporción de AER generó un aumento de la capacidad de estiramiento de las películas al compararlas con sus análogas sin AER (77 % EB para el TPS 20 % y 42 % EB TPS/NCC 15 %). De acuerdo con este resultado se puede decir que el AER adicionado tiene un efecto plastificante incluso a pequeñas concentraciones. Esto se explica por el desarrollo de una estructura de película heterogénea derivada de la incorporación de aceite, lo que aumenta la capacidad de estiramiento de la película.¹⁴²

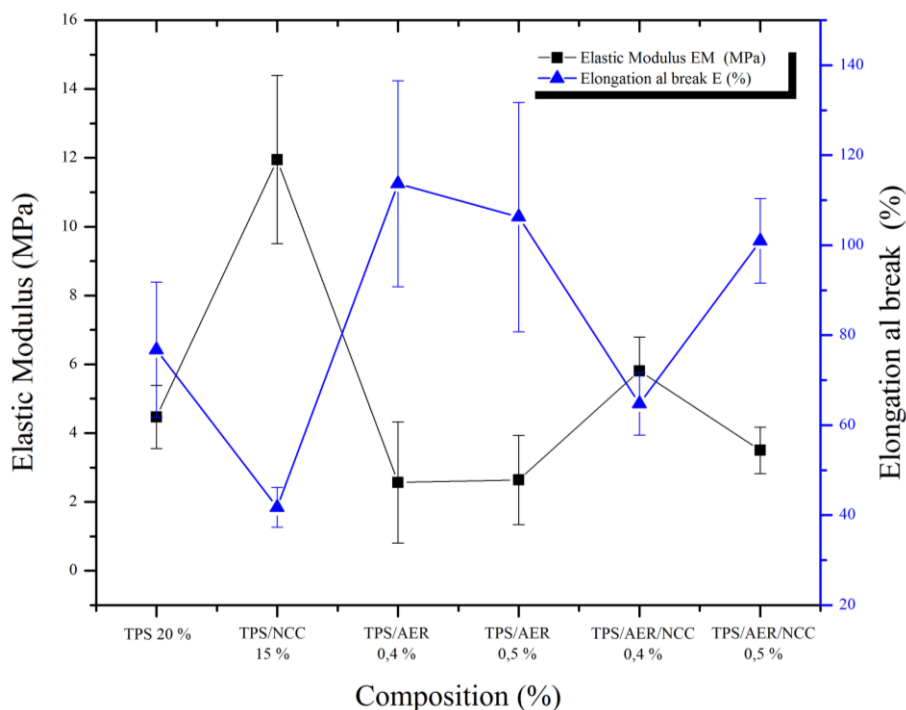


Figura 24. Módulo elástico y alargamiento a la rotura según la composición del biocompuesto elaborado con TPS 20 %, TPS/NCC 15 %, TPS/AER 0,4 y 0,5 % y TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 %.

En conclusión, la resistencia a la tracción, el alargamiento en la rotura y el módulo elástico de las películas termoplásticas están determinadas por una amplia gama de factores, como las características microestructurales del material. Es decir, que las propiedades de tracción de las películas dependen de los constituyentes de las películas y sus proporciones relativas.¹⁴² Experimentalmente, las películas de TPS/NCC presentaron las características más adecuadas en cuanto a propiedades mecánicas para una potencial aplicación en la sustitución de plásticos de un solo uso.

5.4.2.5. Propiedades de interacción con el agua

Las propiedades de interacción con el agua corresponden a la solubilidad, la permeabilidad y velocidad de transmisión de vapor de las películas de almidón termoplástico al interactuar directamente con el agua o por medio de su interacción en ambientes de humedad relativa controlada. Estas propiedades son fundamentales para delimitar la funcionabilidad del material debido a que las aplicaciones potenciales de las películas a base de almidón pueden requerir resistencia y baja interacción con el agua para mejorar la integridad de productos utilizados como materiales de embalaje. Sin embargo, una mayor interacción con agua o fases acuosas puede ser útil para la aplicación de recubrimientos o encapsulación de alimentos.¹⁴⁵ El cuadro 6 muestra los resultados obtenidos para las pruebas relacionadas con la interacción con agua de las películas elaboradas con TPS, TPS/NCC, TPS/NCC/AER y TPS/AER.

Cuadro 6. Resultados obtenidos para las pruebas relacionadas con la interacción con agua de las películas elaboradas con diferentes formulaciones y componentes.

| Película | Solubilidad (%) | Velocidad de transmisión de vapor de agua (g h⁻¹ m⁻²) | Permeabilidad al vapor de agua (g mm h⁻¹ m⁻² kPa⁻¹) |
|--------------------------|------------------------|--|---|
| TPS 20 % | 6,34 ± 0,13 | 2,47 ± 0,05 | 0,144 ± 0,003 |
| TPS 25 % | 7,34 ± 0,12 | 3,37 ± 0,06 | 0,197 ± 0,03 |
| TPS/NCC 5 % | 7,19 ± 0,10 | 2,54 ± 0,04 | 0,148 ± 0,002 |
| TPS/NCC 10 % | 5,44 ± 0,14 | 2,48 ± 0,16 | 0,144 ± 0,010 |
| TPS/NCC 15 % | 4,76 ± 0,10 | 2,07 ± 0,01 | 0,121 ± 0,001 |
| TPS/AER 0.4 % | 8,76 ± 0,13 | 3,36 ± 0,28 | 0,198 ± 0,016 |
| TPS/AER 0.5 % | 6,07 ± 0,11 | 3,08 ± 0,37 | 0,180 ± 0,022 |
| TPS/NCC/AER 0.4 % | 10,45 ± 0,11 | 3,37 ± 0,24 | 0,196 ± 0,014 |
| TPS/NCC/AER 0.5 % | 9,84 ± 0,11 | 2,72 ± 0,31 | 0,158 ± 0,018 |

5.4.2.5.1. Propiedades de solubilidad en agua

La solubilidad en agua es un parámetro clave a determinar para biopolímeros sensibles al agua como el TPS.¹⁴⁰ Como se muestra en el cuadro 6, la solubilidad varió según las diferentes formulaciones y componentes añadidos a la matriz termoplástica. En el caso del TPS en donde se utilizó agua y glicerol como plastificantes, la solubilidad aumentó de 6,34 a 7,34 % al aumentar de 20 a 25 % el contenido de glicerol/g de almidón respectivamente. Las investigaciones realizadas por Chiumarelli M., *et al.*; 2014¹⁴⁶ coinciden en que la solubilidad de las películas biodegradables está influenciada por el tipo y concentración de plastificante. Además, según Müller C., *et al.*; 2008¹⁴⁷ la adición de plastificantes, en

particular de glicerol, tiene una gran influencia en la solubilidad de las películas de almidón, debido a su carácter hidrofílico. El glicerol interactúa con la matriz de la película aumentando el espacio entre las cadenas, facilitando la difusión del agua y, en consecuencia, el aumento de la solubilidad de la película.¹⁴⁷

Por su parte, las películas de TPS/NCC presentaron una disminución desde 7,19; 5,44 y 4,76 % según la adición de 5, 10 y 15 % de NCC en la matriz termoplástica respectivamente, lo cual concuerda con las características propias del NCC que, por su grado de orden molecular la hace menos higroscópica que el almidón debido a que propicia la formación de puentes de hidrógeno entre las biomacromoléculas del almidón y la los nanocristales de celulosa, lo cual disminuye la disponibilidad de los grupos hidroxilo para la formación de enlaces de hidrógeno con el agua, es decir, las interacciones del NCC con el agua provoca que las películas se hinchen, lo cual debilita el material y propicia que parte del material se solubilice en agua.²²

Por otra parte, las películas con aceite esencial, independientemente de la concentración de AER, mostraron una mayor solubilidad que su análoga sin aceite. En general, la solubilidad de las películas depende del tipo y la concentración de los compuestos, así como de sus índices de hidrofilia e hidrofobicidad. Los resultados obtenidos experimentales muestran un aumento en la solubilidad de las películas de TPS/NCC/AER que contienen un 15 % de NCC, donde se muestran valores de 10,45 y 9,84 % de solubilidad para formulaciones con 0,4 y 0,5 % de AER mientras que la película de TPS/NCC sin AER presentó un 4,76 % de solubilidad. Con respecto a las películas de TPS/AER 0,4 y 0,5 % se pudo determinar un porcentaje del 8,76 y 6,07 % de solubilidad, mientras que su análoga sin AER mostró un 6,34 % solubilidad.

El aumento en la solubilidad puede deberse a que a pesar del carácter hidrofóbico de los aceites esenciales, la inserción de este componente dentro de la matriz polimérica genera una composición heterogénea que disminuye las interacciones polímero-polímero y polímero-NCC de las películas, lo cual facilita la inserción de moléculas de agua entre las cadenas de polímeros, aumenta del grosor y las estructuras superficiales irregulares de las películas, aumentando así el área de contacto de la película y el agua. La alta solubilidad puede ser

beneficiosa para la aplicación de las películas en frutas y verduras, para su posterior eliminación.³⁵

Cabe resaltar que las formulaciones TPS/AER Y TPS/NCC/AER con 0,5 % de AER presentaron menores solubilidades que las formulaciones con 0,4 % de AER, lo cual indica que existe una concentración por encima de la cual la adición de AER interacciona de forma tal que disminuye la solubilidad. Aunado a esto, se utilizó una proporción del 50 % de surfactante Tween con respecto al contenido de AER; el cual adiciona parte del carácter hidrofóbico de la formulación empleada. Ambos factores podrían ser los responsables de la disminución de la solubilidad entre el contenido de 0,4 a 0,5 % de AER utilizado.³⁵

En conclusión, la baja solubilidad en agua de las películas a base de almidón está relacionada con los fuertes enlaces intermoleculares entre las cadenas de almidón, que evitan la disociación del polímero. Los valores de solubilidad indican una fuerte interacción entre las cadenas de almidón. La formación de enlaces de hidrógeno entre ellos reduce la interacción entre el agua y la superficie de la película reduciendo así la solubilidad de la matriz polimérica.²²

5.4.2.5.2. Permeabilidad y velocidad de transmisión de vapor de agua

La capacidad de las películas para retrasar la pérdida de humedad del producto es una característica importante que afecta la calidad del producto. La permeabilidad al vapor de agua de las películas se encuentra relacionada a la capacidad de interacción con el agua.¹⁴² Investigaciones realizadas por Navia D., *et al.*; 2019¹⁴⁴ indican que valores bajos de WVP son ideales para aplicaciones de envasado utilizando TPS porque permiten controlar el intercambio de vapor de agua entre el producto y su atmósfera circundante, con la finalidad de preservar la vida útil del producto.¹⁴⁴

El cuadro 6 muestra los rangos experimentales de WVTR entre 2,07 y 3,37 ($\text{g h}^{-1} \text{m}^{-2}$) y de WVP entre 0,121 y 0,198 ($\text{g mm h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{kPa}^{-1}$). Estos valores son más bajos que algunos de los reportados en otros estudios bajo las mismas condiciones de prueba como: 0,15 y 0,42 % Luchese *et al.*, 2017²² y 0,19 % Colivet y Carvalho, 2017¹⁴⁸ para diversas formulaciones de TPS. Las formulaciones TPS 20 % y TPS 25 % presentan una permeabilidad al vapor de

agua (WVP) entre 0,144 y 0,198 ($\text{g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$) respectivamente; además la velocidad de transmisión de vapor de agua fue de 2,47 y 3,37 ($\text{g h}^{-1} \text{ m}^{-2}$) estos resultados confirman que la capacidad de interaccionar con el agua se ve aumentada en las películas de TPS 25 %. Este comportamiento también fue informado por Luchese *et al.*, 2017²² asegurando que el aumento de la concentración de plastificante genera una mayor afinidad por el agua, como consecuencia del carácter polar de la molécula de glicerol y probablemente, al aumentar su relación, estimulará la disponibilidad del grupo hidroxilo para atraer moléculas de agua y por lo tanto, WVP y WVTR aumentarán.²²

En cuanto a la incorporación de NCC en la matriz termoplástica, los resultados para WVP mostraron valores de 0,148; 0,144 y 0,121 ($\text{g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$) para las películas de TPS/NCC 5, 10 y 15 % respectivamente; las cuáles mostraron una WVTR que disminuye de manera lineal con el aumento de NCC de 2,54; 2,48 y 2,07 ($\text{g h}^{-1} \text{ m}^{-2}$); mientras que para la película de TPS 20 % los resultados de WVP y WVTR fueron 0,144 ($\text{g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$) y 2,47($\text{g h}^{-1} \text{ m}^{-2}$) respectivamente; por lo que se puede concluir que la incorporación de NCC al biocompuesto no resultó en una mejora significativa de las propiedades de barrera debido a que la permeabilidad al vapor de agua parece estar gobernada por la fuerte afinidad química del TPS con las moléculas de agua.¹²

En cuanto a las películas con AER en su formulación presentaron valores superiores de permeabilidad al vapor de agua con respecto a sus análogas sin AER. Los valores mostrados de WVP fueron 0,198 y 0,180 ($\text{g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$) para el TPS con un contenido de 0,4 y 0,5 % AER respectivamente, mientras que su análoga sin AER presentó un WVP de 0,144 ($\text{g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}$). Por su parte, las películas de TPS/NCC/AER 0,4 y 0,5 % presentaron valores de 0,196 y 0,158 ($\text{g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$) respectivamente mientras que el TPS/NCC presentó un valor de 0,121 ($\text{g mm h}^{-1} \text{ m}^{-2} \text{ kPa}^{-1}$). Se observa que al aumentar la concentración de aceite de romero en condiciones fijas de almidón, plastificante y surfactante se genera una reducción en los valores de WVP. Según Shen X. *et al.*; 2010¹⁴⁵, la interacción como enlace covalente y enlace de hidrógeno formado entre el almidón y el aceite de romero podría limitar la disponibilidad de grupos hidroxilo para crear enlaces hidrófilos con el agua y, como consecuencia, la hidrofilia y WVP en las películas disminuye.¹⁴⁵

Las formulaciones elaboradas de TPS incorporaron un 50 % de surfactante Tween con respecto a la proporción de AER incorporado. En comparación con las películas de TPS y TPS/NCC, donde no se incorpora ningún tipo de surfactante, en las películas de TPS/AER Y TPS/NCC/AER no se observó un efecto en la reducción de WVP de las películas; por lo que se presume que la adición de AER y surfactante tuvieron un efecto mayoritariamente plastificante bajo las proporciones utilizadas, aumentando el volumen libre entre las cadenas de almidón adyacentes favoreciendo así la penetración del vapor de agua.¹⁴⁹

En términos generales, las películas a base de almidón de yuca tienen propiedades de barrera contra el vapor de agua muy pobres en comparación con los polímeros utilizados tradicionalmente por la industria del empaque; como se muestra en el cuadro 1, las propiedades de los materiales de embalaje como el PP y HDPE presentan valores de WVTR similares a los obtenidos con las formulaciones elaboradas experimentalmente; por lo que su uso debe ser diferenciado y limitado a sus capacidades.²²

5.4.2.6. Opacidad

La opacidad es un atributo de los materiales que tiene un papel relevante en el área del envasado de productos debido a que comercialmente se prefiere un embalaje que permita ver el producto. Los datos experimentales de opacidad se presentan en el cuadro 7. Experimentalmente, la opacidad varió de 16,24 a 17,75 % entre todas las películas elaboradas. Cabe señalar que los valores de opacidad en unidades de 16 % corresponden a las películas de TPS y TPS/AER mientras que los valores de opacidad en unidades del 17 % fueron determinados para las películas de TPS/NCC y TPS/NCC/AER; con lo cual es posible interpretar que el contenido de NCC propicia el aumento en una unidad de la opacidad de la muestra.

Cuadro 7. Determinación de la opacidad de las películas de almidón termoplástico elaboradas con diferentes componentes.

| Película | Opacidad (%) |
|--------------------------|---------------------|
| TPS 20 % | 16,59 ± 0,30 |
| TPS 25 % | 16,61 ± 0,32 |
| TPS/NCC 5 % | 17,65 ± 0,24 |
| TPS/NCC 10 % | 17,70 ± 0,26 |
| TPS/NCC 15 % | 17,75 ± 0,21 |
| TPS/AER 0.4 % | 16,24 ± 0,29 |
| TPS/AER 0.5 % | 16,44 ± 0,30 |
| TPS/NCC/AER 0.4 % | 17,31 ± 0,26 |
| TPS/NCC/AER 0.5 % | 17,45 ± 0,27 |

Cualitativamente se mantuvo la transparencia observada en estas muestras. El ligero aumento de la opacidad en las películas que contienen NCC se puede fundamentar en la formación de una estructura de red densa y continua por la interacción de enlaces de hidrógeno entre la nanocelulosa que, en algunos casos, puede conducir a una aglomeración parcial por enlaces de hidrógeno entre el refuerzo que se dispersó de manera desigual en el sistema a base de almidón.

Otros autores como Navia D., *et al.*; 2019¹⁴⁴ informaron valores de opacidad que van desde 16,4 hasta 16,9 % para películas con una formulación similar en composición donde se utilizó

almidón de yuca, aceite de romero y Tween como surfactante los cuales coinciden con los obtenidos para las películas de TPS/AER 0,4 y 0,5 % que poseen valores de opacidad de 16,24 y 16,44 % de opacidad respectivamente. En el caso de las muestras de TPS/NCC/AER los valores determinados fueron 17,31 y 17,45 % cuyo aumento corresponde a la presencia de NCC en la matriz termoplástica. Sin embargo, otro aspecto a considerar es la proporción de AER y surfactante Tween en la muestra; debido a que, al igual que en las investigaciones de Navia D., *et al.*; 2019¹⁴⁴, se obtuvo un aumento en la opacidad al aumentar la proporción de estos componentes en la muestra manteniendo los demás parámetros constantes en la formulación.

En general, se encontró que la incorporación de AER causó una reducción de la transparencia de la película. La adición de aceites resultó en una disminución de la transmisión de luz, posiblemente debido a la dispersión de la luz en la interfaz de las gotas de AER incrustadas en la matriz de la película. En consecuencia, se observó un aumento en la opacidad de las películas que contienen AER.¹⁴²

Cabe señalar que muchas de las diferencias encontradas entre los parámetros reportados en la literatura y los valores obtenidos experimentalmente pueden deberse a factores como el grosor de la película, debido a que cuanto mayor es el grosor, más opacas aparecen las películas. Además, esta variabilidad podría estar relacionada con la fuente botánica de almidón utilizado para elaborar la matriz polimérica debido a que puede contener otros compuestos como proteínas y lípidos que podrían aumentar la opacidad del material, aunado a esto la proporción de amilosa/amilopectina y las condiciones agroambientales de cosecha son factores que se ven involucrados en la opacidad de acuerdo con Basiak E. *et al.*; 2017.

140

La opacidad es una propiedad importante porque la cantidad de luz que afecta los alimentos y la apariencia de los productos envasados se consideran relevantes para la aceptación del consumidor.³⁵ En este sentido, todas las películas obtenidas en este estudio fueron claras como para ser utilizadas como materiales de embalaje o revestimiento transparentes.

5.4.2.7. Determinación de la actividad antimicrobiana del AER

Se pueden incorporar agentes antimicrobianos en películas de TPS para proporcionar estabilidad microbiológica, ya que las películas se pueden usar como portadores de una variedad de aditivos para extender la vida útil del producto y reducir el riesgo de crecimiento microbiano en las superficies de los alimentos. La adición de agentes antimicrobianos a las películas comestibles ofrece ventajas tales como el uso de pequeñas concentraciones de antimicrobianos las cuales pueden ser determinadas al establecer la mínima concentración inhibitoria requerida para inhibir el crecimiento bacteriano. ⁹²

5.4.2.7.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Los resultados obtenidos para el aceite esencial de romero (*R. officinalis*) según el espectro de acción antimicrobiana planteado experimentalmente de 1000 a 4000 ppm (figura 25) mostraron una disminución a partir de los 3000 ppm en las cepas bacterianas observadas para la bacteria Gram negativa *E. coli*. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Castaño H. *et al*; 2010 ³⁸ y Mathlouthi N. *et al*; 2012 ⁹³ quienes demostraron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *R. officinalis* contra cepas de *E. coli* donde la inhibición del crecimiento bacteriano se alcanzó a una concentración de 4096 y 4400 ppm respectivamente. Por otra parte, el aceite esencial de romero presentó actividad antimicrobiana contra la bacteria Gram positiva *S. aureus* notoria a partir de los 2000 ppm, resultado que coincide con los obtenidos por Castaño H. *et al.*, 2010 ³⁸ con una MIC de 2048 ppm. Sin embargo, no fue posible observar un efecto inhibitorio para la bacteria Gram Negativa *S. entérica* bajo ninguna concentración del espectro de acción antimicrobiana planteado experimentalmente.

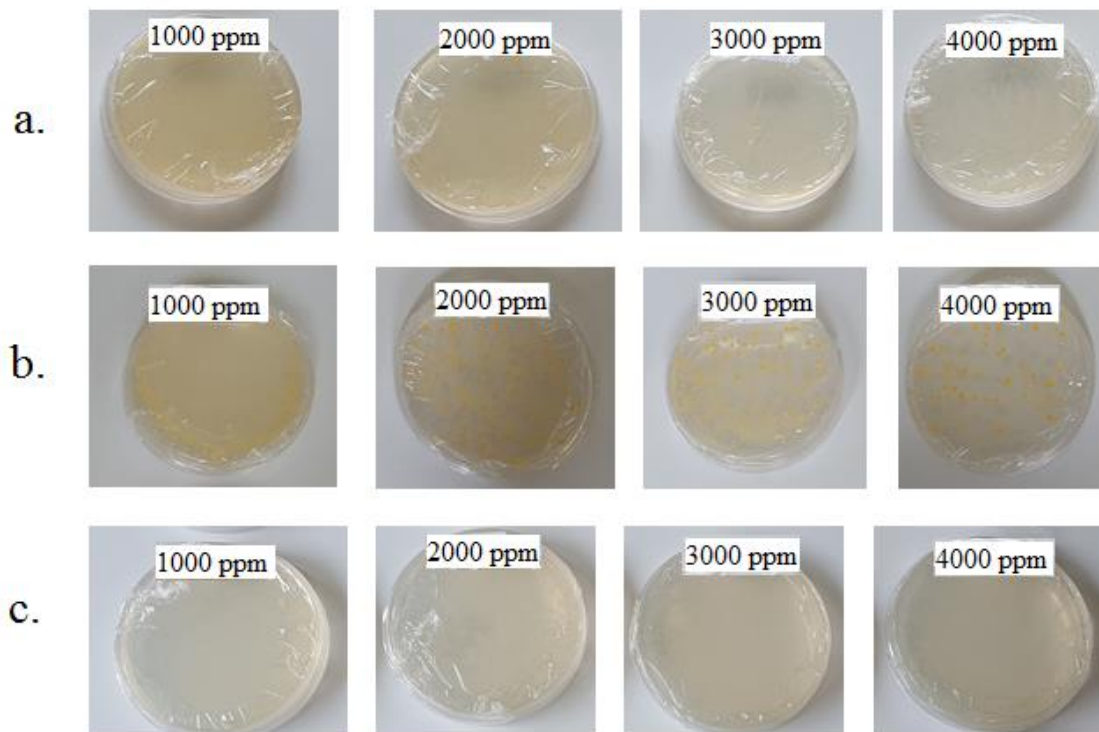


Figura 25. Concentración mínima inhibitoria del AER en las bacterias a. *E. coli*, b. *S. Aureus*, c. *S. entérica*; en concentraciones (1000, 2000, 3000, 4000) μL de AER (de izquierda a derecha).

El espectro de inhibición frente al extracto de AER puede ser explicado por los posibles mecanismos de daño a la membrana celular bacteriana debido al incremento de su permeabilidad y la afectación de su estructura.³⁸ Se considera que el modo de acción antimicrobiano del AER surge principalmente de su potencial hidrofóbico para introducirse en la membrana celular bacteriana, desintegrar las estructuras de la membrana, causar fuga de iones y/o interactuar con sitios intracelulares críticos para las actividades bacterianas. Específicamente, son capaces de inhibir la actividad de la enzima glucosiltransferasa, que es responsable de la adhesión de bacterias a sus sitios.⁹³ Además se ha establecido que la estructura hidrofílica de la pared celular de las bacterias Gram negativas, constituida esencialmente por un lipo-polisacárido, bloquea la penetración de los componentes hidrofóbicos de los aceites y por esta razón, las bacterias Gram-positivas son más sensibles a los efectos de los aceites esenciales.⁹²

Investigaciones realizadas por Klancnik A. *et al.*; 2009¹⁵⁰ demostraron que la bacteria Gram negativa *S. entérica* exhibió una resistencia marcada a las formulaciones de extracto de AER probadas. Debido a que, la membrana externa que rodea la pared celular en bacterias Gram negativas, que restringe la difusión de compuestos a través de su cubierta de lipopolisacárido.

150

La composición química de los aceites esenciales es crítica para sus actividades antibacterianas.³⁸ Se han realizado diversos estudios para determinar si la actividad antibacteriana de los aceites esenciales podría estar relacionada con sus compuestos principales, α -pineno, mirceno, 1,8-cineol, alcanfor y borneol. Además, también se ha informado de otros componentes menores por su actividad antimicrobiana, como β -pineno, limoneno, α -terpino y canfeno.⁹² Esto podría deberse al efecto sinérgico de algunos componentes menores presentes en el aceite. Los componentes menores son críticos para la actividad y pueden tener una influencia potencial.¹⁰⁶

Para ello se ha evaluado la actividad antibacteriana de estos compuestos en las mismas condiciones experimentales. En este sentido, los resultados mostrados por Ojeda-Sana A. *et al.*; 2013⁹² demuestran que el α -pineno fue el único compuesto que fue capaz de inhibir todos los microorganismos probados, entre ellos *S. Aureus* y *E. coli* con valores de MIC que varían de 800 a 8000 ppm. Por otro lado, el alcanfor y el borneol inhibieron solo las bacterias Gram positivas, mientras que el 1,8-cineol fue activo contra las bacterias Gram negativas con valores de MIC de 8000 a 20000 ppm.⁹²

Con respecto a los resultados relacionados con la actividad antifúngica que se muestran en la figura 26, el AER probado en placas de agar de dextrosa de papa exhibió un efecto inhibitorio efectivo contra todos los hongos analizados experimentalmente con un MIC de 4000 ppm para *A. flavus* y *A. niger* y de 3000 ppm para *F. oxyporum*. Estos resultados concuerdan con las investigaciones realizadas por Souza *et al.*, 2013¹⁰⁶ quienes comprobaron la actividad antimicrobiana para los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*.¹⁰⁶ Investigadores como Özcan M. *et al.*, 2008 han estudiado la efectividad del romero en el crecimiento de los hongos concluyendo que las principales sustancias como el timol, el carvacrol y el mentol son las responsables del efecto antifúngico.¹³¹ Por lo tanto, los resultados sugieren el uso

potencial de algunos aceites como conservantes antimicóticos en los alimentos. Aunque los altos niveles de aceites volátiles pueden afectar negativamente las propiedades sensoriales de los alimentos, las concentraciones más bajas pueden ser suficientes para la inocuidad alimentaria en situaciones reales donde la carga microbiana es baja.¹³¹

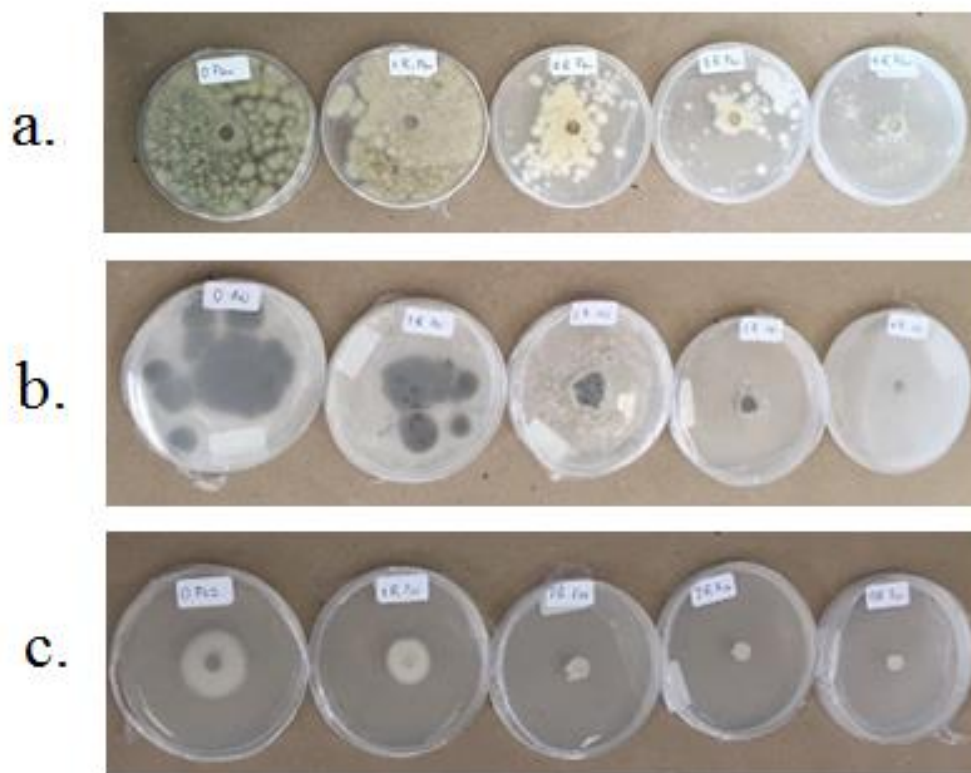


Figura 26. Concentración mínima inhibitoria del AER en los hongos a. *A. flavus*, b. *A. niger*, c. *F. oxysporum*; en concentraciones (0, 1000, 2000, 3000, 4000) μL de AER (de izquierda a derecha).

Las diferencias encontradas con respecto a la susceptibilidad de los microorganismos con respecto a las muestras de prueba podrían atribuirse a la variación en la tasa de penetración de las muestras a través de la pared celular y las estructuras de la membrana celular, así como su respuesta adaptativa y estrategia de supervivencia derivada de su especie.⁴⁰ Además, diversas revisiones de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales han informado una multiplicidad de factores que van desde el cultivo de la planta hasta las variaciones en

las condiciones experimentales para la medición de la actividad antibacteriana, así como las diferencias en la metodología que afectan la diversidad de resultados obtenidos.^{84,92}

5.4.2.7.2. Prueba cualitativa de inhibición de disco

El crecimiento de microorganismos de descomposición y patógenos transmitidos por los alimentos es una de las causas más importantes de degradación de los alimentos. La presencia de microorganismos de descomposición en los alimentos puede acelerar la oxidación de los lípidos y otros procesos de oxidación, o puede producir cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos. Los patógenos transmitidos por los alimentos son directamente responsables de ciertas enfermedades en el organismo humano, o pueden ser indirectamente responsables debido a la producción de toxinas.¹⁴²

La determinación de la actividad antimicrobiana de las películas biocompuestas de TPS elaboradas con diversas proporciones de NCC y AER se estudió contra tres bacterias comunes de intoxicación alimentaria las cuales se resumen en la figura 27 (a. *E.coli*, b. *S. Aureus*, c. *S. entérica*) y tres hongos comunes en el entorno alimenticio figura 28 (a. *A. flavus*, b. *A. niger*, c. *F. oxysporum*). Considerando los caracteres inertes (no antimicrobianos) del almidón y otros componentes presentes en la solución filmogénica, las películas de TPS 20 % de glicerol/contenido de almidón y TPS/NCC 15 % de nanocristales de celulosa, no mostraron ninguna actividad antimicrobiana contra las bacterias y hongos estudiados debido a que el almidón y la nanocelulosa son polisacáridos compuestos por unidades de glucosa las cuales no poseen propiedades antimicrobianas por sí mismas.

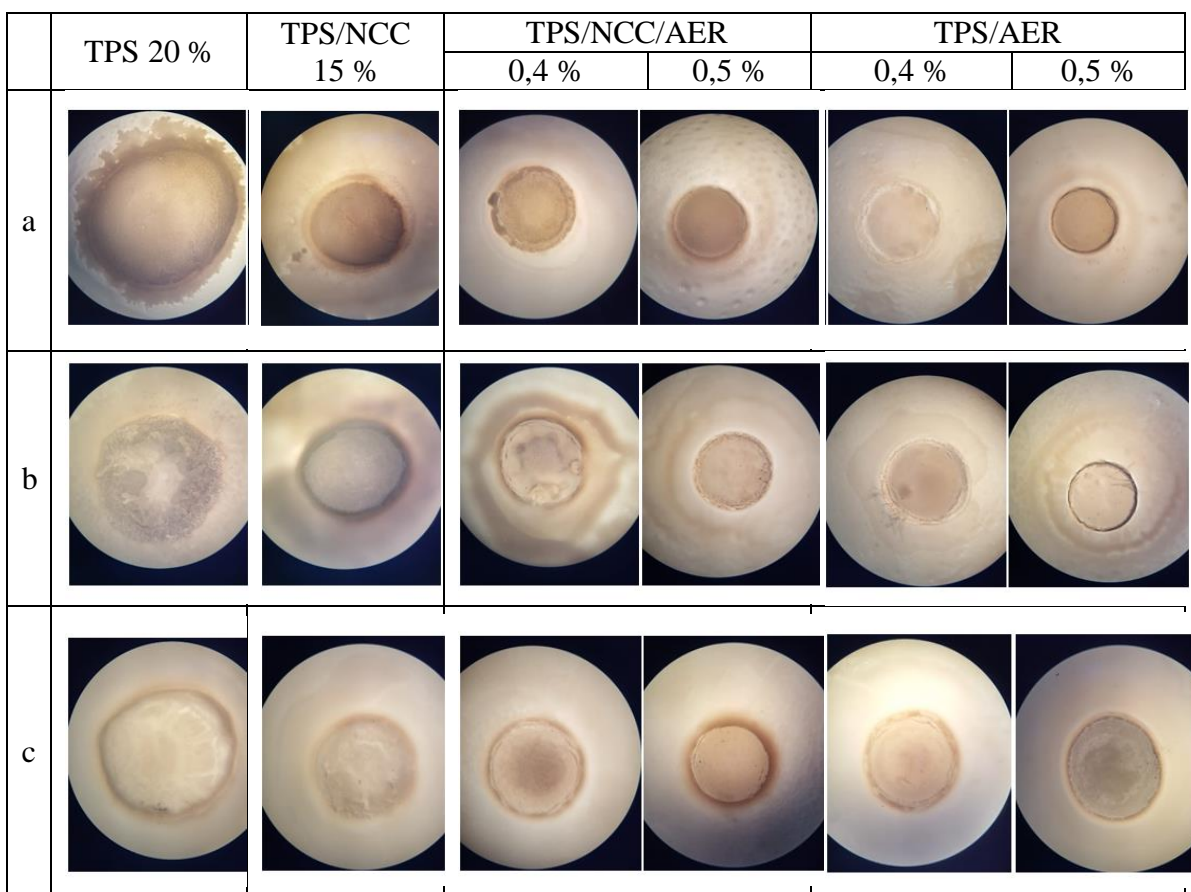


Figura 27. Prueba de inhibición de disco del TPS, TPS/NCC, TPS/NCC/AER y TPS/AER en las bacterias a. *E. coli*, b. *S. Aureus*, c. *S. entérica*.

Por otra parte, la prueba de inhibición de disco para las películas de TPS/NCC/AER de 0,4 y 0,5 % mostraron una zona inhibitoria en ambas formulaciones para la bacteria *E. coli*, mientras que para la bacteria *S. Aureus* se observó un halo de inhibición únicamente en la película de TPS/NCC con un contenido de 0,5 % de AER. Sin embargo, para la bacteria *S. entérica* no fue posible observar ningún efecto inhibitorio por parte del agente antimicrobiano incorporado en la película. En cuanto a los resultados derivados de la prueba de inhibición de disco realizada con hongos para estas formulaciones de TPS/NCC/AER, fue posible observar una disminución en la esporulación del hongo *A. niger*, con un pequeño halo de inhibición alrededor de la película con un contenido de 0,5 % de AER. Para los hongos *A.*

flavus y *F. oxysporum* no fue posible observar una disminución en la esporulación alrededor de los discos de TPS.

Con respecto a las películas de TPS/AER de 0,4 y 0,5 % los resultados permitieron observar halos de inhibición para cada una de las bacterias estudiadas en el orden *E. coli* > *S. entérica* > *S. Aureus* según el diámetro del halo observado en la película con un contenido de 0,5 % de AER. Por su parte, los hongos evaluados para las formulaciones de las películas de TPS/AER presentaron actividad antifúngica principalmente para el hongo *A. niger* para ambas concentraciones de AER utilizadas, siendo más notorio en de 0,5 % de AER. En cuanto al hongo *A. flavus* se presentó una disminución en la esporulación del hongo; sin embargo, no fue posible observar un halo de inhibición definido. Finalmente, para el hongo *F. oxysporum* se identificó un pequeño halo de inhibición alrededor de la película con un contenido de 0,5 % de AER.

Las películas con actividad antibacteriana presentaron una mayor actividad al aumentar la concentración de AER de 0,4 a 0,5 %. Se utilizó la concentración de 0,4 % de AER debido a que esta fue determinada como la mínima concentración inhibitoria y se propuso la utilización de 0,5 % AER para superar la MIC. En este sentido, se determinó que una mayor concentración de AER actúa como plastificante al aumentar la cantidad de grupos hidroxilos disponibles para la formación de enlaces de hidrógeno. Además, estos efectos podrían favorecer la actividad antimicrobiana del AER incorporado y promover una difusión relativamente rápida a la fase de vapor. En general, la incorporación de aceites esenciales en películas comestibles para permitir la aplicación por fase de vapor requiere concentraciones más pequeñas en comparación con las requeridas para la aplicación directa del aceite esencial para inhibir diferentes tipos de microorganismos.³³ Este resultado confirma que el AER puede actuar como un agente antimicrobiano en combinación con una película de TPS o TPS/NCC. La acción inhibitoria dependerá de la mínima concentración inhibitoria del mismo dentro de la película termoplástica para el desarrollo de un material de embalaje activo.

El embalaje antimicrobiano podría reducir las pérdidas de alimentos y aumentar la vida útil de los productos alimenticios de baja humedad. Los aceites esenciales extraídos de plantas son fuentes de compuestos bioactivos como lo son los compuestos fenólicos, estos han sido

reconocidos como agentes antimicrobianos pues afectan a las células microbianas por diversos mecanismos antimicrobianos, que incluyen atacar la bicapa de fosfolípidos de la membrana celular, alterar los sistemas enzimáticos y comprometer el material genético de las bacterias. ¹⁴²

En el caso de las bacterias, estos componentes fenólicos pueden atacar las membranas celulares o interactuar de manera enzimática con la pared celular de las bacterias, lo que en consecuencia aumenta la permeabilidad. Por su parte, el análisis antimicrobiano fue útil para evaluar la inhibición de hongos por compuestos volátiles del AER y comparar las capacidades de diferentes esporas de hongos para colonizar las superficies del biocompuesto elaborado. La exposición a compuestos volátiles de los aceites esenciales da lugar a alteraciones en la morfología de las hifas, que son los filamentos que forman el cuerpo de los hongos, tales modificaciones pueden estar relacionadas con el efecto de los aceites esenciales en las reacciones enzimáticas que regulan la síntesis de la pared. Las propiedades lipofílicas de los componentes del aceite también ayudan en la capacidad del AER para penetrar la membrana plasmática. ³³

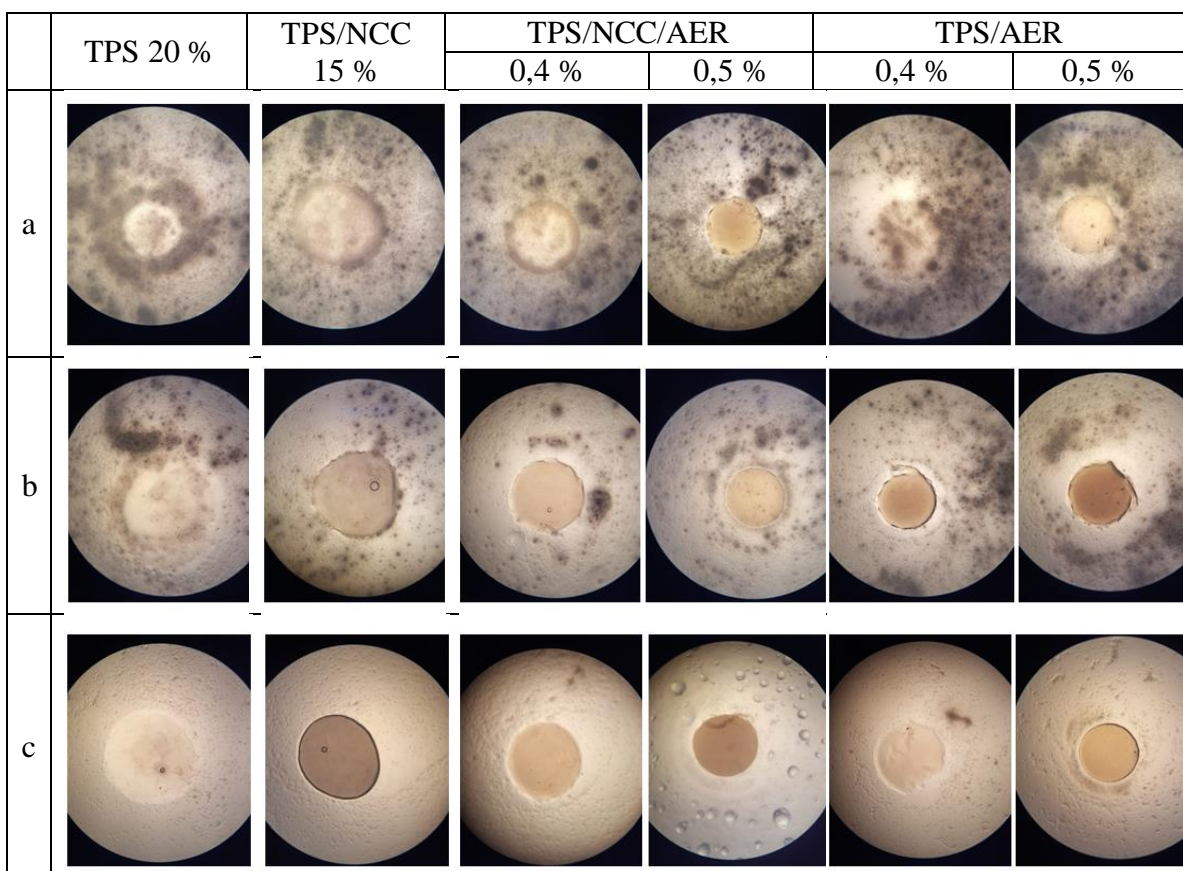


Figura 28. Prueba de inhibición de disco del TPS, TPS/NCC, TPS/NCC/AER y TPS/AER en los hongos a. *A. flavus*, b. *A. niger*, c. *F. oxysporum*.

Dado que el uso de aceites esenciales como conservantes de alimentos está limitado por ser un saborizante fuerte, la inclusión en películas comestibles representa una alternativa interesante dado que la capacidad de liberar estos componentes a través del contacto directo es una característica importante porque, normalmente, la mayor contaminación microbiana ocurre en la superficie. Por lo tanto, las películas antimicrobianas interactuarían dando como resultado una liberación gradual de los compuestos antimicrobianos y garantizan su acción durante un período más largo en comparación con la aplicación directa. Sin embargo, dado que el aceite esencial forma parte de la estructura química de la película e interactúa con el polímero y el plastificante, la difusión de los compuestos antimicrobianos en el producto puede verse reducida.³⁵

La liberación de agentes antimicrobianos de las películas comestibles depende de muchos factores, incluidas las interacciones electrostáticas entre el agente antimicrobiano y las cadenas de polímero, los cambios estructurales inducidos por la presencia del antimicrobiano y las condiciones ambientales. A pesar de esto, se ha afirmado que, en comparación con la aplicación directa, se necesitarían cantidades más pequeñas de agentes antimicrobianos cuando se usan películas comestibles como portadores para lograr una vida útil específica de los alimentos debido a una liberación gradual en las superficies de los alimentos.¹⁴²

Además, la incorporación de aceites esenciales en las películas es un método indirecto de usar este extracto natural en alimentos sin la necesidad de agregarlos como ingrediente, lo que reduce las interferencias sensoriales indeseables; sin embargo, se requiere de estudios de migración de componentes para garantizar la aceptación por parte de los consumidores y la inocuidad alimentaria.³⁵

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

Se obtuvieron gránulos de almidón a partir de yuca amarga cuya caracterización demostró que esta materia prima es adecuada para la formación de almidón termoplástico al ser sometida a procesos de calentamiento y agitación magnética que conducen a la formación de un material termoplástico al combinarse por medio interacciones de puente de hidrógeno con plastificantes como el agua y el glicerol.

Los resultados obtenidos para la extracción de nanocristales de celulosa al ser analizada por FT-IR confirmaron que la reacción de hidrólisis ácida removió componentes como lignina sin afectar la estructura química de los fragmentos celulósicos; al mismo tiempo, se observó mediante SEM que fue posible modificar la morfología del sustrato celulósico para obtener fragmentos en el rango de nano y micrómetros. Se demostró mediante el análisis de TGA que la NCC producida a partir del rastrojo de piña posee una temperatura de degradación mayor a la temperatura de gelación del TPS que se encuentra por debajo de los 100 °C, lo cual le permite tener un potencial de ser un material adecuado para reforzar polímeros.

La yuca amarga, el rastrojo de piña y el romero son fuentes vegetales que pueden ser aprovechadas como materias primas para la extracción de almidón, nanocristales de celulosa y aceite esencial respectivamente; la combinación de estos componentes mediante procesos de termoplastificación conduce a la generación de biocompuestos que pueden ser utilizados en la industria como un recurso de valor agregado para la sustitución de algunos plásticos de un solo uso.

A partir de la caracterización de los biocompuestos elaborados se determinó su funcionalidad. Sus propiedades mecánicas mostraron que la mayor resistencia y rigidez corresponde a las películas de TPS/NCC 15 %, las cuales también presentaron la menor solubilidad, permeación y velocidad de transmisión de vapor de agua. Por su parte, los menores valores de resistencia fueron obtenidos para el TPS/AER donde el aceite actuó como plastificante ocasionando el reemplazo parcial de interacciones polímero-polímero más fuertes por interacciones polímero-aceite más débiles, lo cual condujo además a una mayor interacción

con agua en términos de solubilidad, WVP y WVTR debido a que se facilita la inserción de moléculas de agua entre las cadenas de polímeros.

Además, la adición de AER proporcionó propiedades antimicrobianas contra las bacterias *E.coli* y *S. aureus* y el hongo *A. niger* mayoritariamente, donde también se determinó que a concentraciones más altas el AER incorporado actúa como plastificante; estos efectos podrían favorecer la actividad antimicrobiana del AER incorporado y promover una difusión relativamente rápida a la fase de vapor. Por lo tanto, los resultados de este estudio proporcionan información sobre el desarrollo de nuevas películas biocompuestas para su uso en la industria del empaquetado, que, con la adición de aceites esenciales puede tener un alcance mayor e incursionar en la industria de alimentos para promover una mayor vida útil y garantizar seguridad alimenticia.

6.2. Recomendaciones

La extracción de almidón de fuentes vegetales diversas, así como la utilización de diferentes plastificantes dentro de la matriz permitiría apreciar el impacto de estos factores en las propiedades del TPS y con ello realizar múltiples comparaciones entre las diferentes formulaciones elaboradas.

Investigar otros métodos de extracción de NCC o la variación de los parámetros actuales de trabajo puede conducir a una mejora en el rendimiento y uniformidad de tamaños de partículas.

El estudio de la modificación química de la NCC y del almidón podría conducir a una mejora en las interacciones entre estos componentes y con ello explorar los resultados en cuanto a la interacción con el agua, resistencia mecánica y demás propiedades de los biocompuestos.

La incorporación del aceite esencial dentro de la matriz termoplástica en mayores proporciones permitiría un análisis más profundo con respecto a la capacidad del agente antimicrobiano para combatir bacterias y hongos y con ello ampliar el espectro de posibles aplicaciones del termoplástico obtenido.

La elaboración de películas termoplásticas que involucran la adición de aceite esencial en su formulación requiere la determinación de fenómenos de migración de componentes debido a que la elaboración de envasado activo de alimentos requiere el control de las propiedades organolépticas de los alimentos.

CAPÍTULO VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Wei, R.; Zimmermann, W. Microbial Enzymes for the Recycling of Recalcitrant Petroleum-Based Plastics: How Far Are We? *Microb. Biotechnol.* **2017**, *10* (6), 1308–1322.
- (2) Barnes, D. K. A.; Galgani, F.; Thompson, R. C.; Barlaz, M. Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *364* (1526), 1985–1998.
- (3) Shah, A. A.; Hasan, F.; Hameed, A.; Ahmed, S. Biological Degradation of Plastics: A Comprehensive Review. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26* (3), 246–265.
- (4) Ministerio de Ambiente y Energía (MINAE); Ministerio de Salud (MS); Programa de Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD); Fundación MarViva; Fundación Estados Unidos Costa Rica para la cooperación (CRUSA); Cámara Nacional de Comerciantes Detallistas y Afines. Estrategia Nacional Para Sustituir Consumo de Plásticos de Un Solo Uso Por Alternativas Renovables y Compostables. **2017**.
- (5) Mora, S.; Quiróz, Y. Boletín Estadístico Agropecuario N° 29 SEPSA (Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, Costa Rica). San José, Costa Rica, MAG. **2019**, 1–143.
- (6) Aguilar, E.; Segreda, A.; Saborío, D; Morales, J.; Chacón, M.; Rodríguez, L.; Acuña, P.; Torres, S.; Gómez, Y. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia En Tecnología Agropecuaria INTA. El Cultivo de La Yuca (Manihot Esculenta Crantz). 2016. Pp.59,.
- (7) Ivanič, F.; Jochec-Mošková, D.; Janigová, I.; Chodák, I. Physical Properties of Starch Plasticized by a Mixture of Plasticizers. *Eur. Polym. J.* **2017**, *93* (March), 843–849.
- (8) Teixeira, E. de M.; Pasquini, D.; Curvelo, A. A. S.; Corradini, E.; Belgacem, M. N.; Dufresne, A. Cassava Bagasse Cellulose Nanofibrils Reinforced Thermoplastic Cassava Starch. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *78* (3), 422–431.

- (9) Savadekar, N. R.; Mhaske, S. T. Synthesis of Nano Cellulose Fibers and Effect on Thermoplastics Starch Based Films. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *89* (1), 146–151.
- (10) Xie, F.; Pollet, E.; Halley, P. J.; Avérous, L. Starch-Based Nano-Biocomposites. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38* (10–11), 1590–1628.
- (11) Pelissari, F. M.; Andrade-Mahecha, M. M.; Sobral, P. J. do A.; Menegalli, F. C. Nanocomposites Based on Banana Starch Reinforced with Cellulose Nanofibers Isolated from Banana Peels. *J. Colloid Interface Sci.* **2017**, *505*, 154–167.
- (12) González, K.; Retegi, A.; González, A.; Eceiza, A.; Gabilondo, N. Starch and Cellulose Nanocrystals Together into Thermoplastic Starch Bionanocomposites. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *117*, 83–90.
- (13) Ma, X.; Cheng, Y.; Qin, X.; Guo, T.; Deng, J.; Liu, X. Hydrophilic Modification of Cellulose Nanocrystals Improves the Physicochemical Properties of Cassava Starch-Based Nanocomposite Films. *LWT - Food Sci. Technol.* **2017**, *86*, 318–326.
- (14) Babae, M.; Jonoobi, M.; Hamzeh, Y.; Ashori, A. Biodegradability and Mechanical Properties of Reinforced Starch Nanocomposites Using Cellulose Nanofibers. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *132*, 1–8.
- (15) Hietala, M.; Mathew, A. P.; Oksman, K. Bionanocomposites of Thermoplastic Starch and Cellulose Nanofibers Manufactured Using Twin-Screw Extrusion. *Eur. Polym. J.* **2013**, *49* (4), 950–956.
- (16) Abraham, E.; Deepa, B.; Pothan, L. A.; Jacob, M.; Thomas, S.; Cvelbar, U.; Anandjiwala, R. Extraction of Nanocellulose Fibrils from Lignocellulosic Fibres: A Novel Approach. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86* (4), 1468–1475.
- (17) Cherian, B. M.; Leão, A. L.; de Souza, S. F.; Thomas, S.; Pothan, L. A.; Kottaisamy, M. Isolation of Nanocellulose from Pineapple Leaf Fibres by Steam Explosion. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *81* (3), 720–725.

- (18) Santos, R. M. dos; Flauzino Neto, W. P.; Silvério, H. A.; Martins, D. F.; Dantas, N. O.; Pasquini, D. Cellulose Nanocrystals from Pineapple Leaf, a New Approach for the Reuse of This Agro-Waste. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *50*, 707–714.
- (19) Estadísticas - CANAPEP <https://canapep.com/estadisticas/> (accesado el 20 de marzo del 2017).
- (20) Oriani, V. B.; Molina, G.; Chiumarelli, M.; Pastore, M.; Hubinger, M. D. Properties of Cassava Starch-Based Edible Coating Containing Essential Oils. **2014**, *79* (2), 189–194.
- (21) Khalid, S.; Yu, L.; Feng, M.; Meng, L.; Bai, Y.; Ali, A.; Liu, H.; Chen, L. Development and Characterization of Biodegradable Antimicrobial Packaging Films Based on Polycaprolactone, Starch and Pomegranate Rind Hybrids. *Food Packag. Shelf Life* **2018**, *18* (August), 71–79.
- (22) Luchese, C. L.; Spada, J. C.; Tessaro, I. C. Starch Content Affects Physicochemical Properties of Corn and Cassava Starch-Based Films. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *109* (May), 619–626.
- (23) Sapper, M.; Wilcaso, P.; Santamarina, M. P.; Roselló, J.; Chiralt, A. Antifungal and Functional Properties of Starch-Gellan Films Containing Thyme (*Thymus Zygis*) Essential Oil. *Food Control* **2018**.
- (24) Romani, V. P.; Hernández, C. P.; Martins, V. G. Pink Pepper Phenolic Compounds Incorporation in Starch / Protein Blends and Its Potential to Inhibit Apple Browning. *Food Packag. Shelf Life* **2018**, *15* (February 2017), 151–158.
- (25) Song, X.; Zuo, G.; Chen, F. Effect of Essential Oil and Surfactant on the Physical and Antimicrobial Properties of Corn and Wheat Starch Films Running Title: Starch Based Films Properties Affected by Essential Oil and Surfactant. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**.
- (26) Dannenberg, S.; Funck, G. D.; Eduardo, C.; Marques, J. D. L.; Padilha, W.; Fiorentini,

- Â. M. Essential Oil from Pink Pepper as an Antimicrobial Component in Cellulose Acetate Film: Potential for Application as Active Packaging for Sliced Cheese. *LWT - Food Sci. Technol.* **2017**.
- (27) Moura, M. R. De; Mattoso, L. H. C.; Zucolotto, V. Development of Cellulose-Based Bactericidal Nanocomposites Containing Silver Nanoparticles and Their Use as Active Food Packaging. **2012**, *109*, 520–524.
- (28) Adilah, A. N.; Jamilah, B.; Noranizan, M. A.; Hanani, Z. A. N. Utilization of Mango Peel Extracts on the Biodegradable Fi Lms for Active Packaging. *Food Packag. Shelf Life* **2018**, *16* (May 2017), 1–7.
- (29) Kaushik, A.; Tiwari, S. K. Evaluation of Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of Citrus Limon. **2011**, *13* (13).
- (30) Qin, Y.; Li, W.; Liu, D.; Yuan, M.; Li, L. Development of Active Packaging Film Made from Poly (Lactic Acid) Incorporated Essential Oil. *Prog. Org. Coatings* **2016**.
- (31) Ribeiro-santos, R.; Andrade, M. Application of Encapsulated Essential Oils as Antimicrobial Agents in Food Packaging. *Curr. Opin. Food Sci.* **2017**, *14*, 78–84.
- (32) Acosta, S.; Chiralt, A.; Santamarina, P.; Rosello, J. Food Hydrocolloids Antifungal Fi Lms Based on Starch-Gelatin Blend , Containing Essential Oils. **2016**, *61*.
- (33) Avila-sosa, R.; Palou, E.; Teresa, M.; Munguía, J.; Nevárez-moorillón, G. V.; Rhode, A.; Cruz, N.; López-malo, A. International Journal of Food Microbiology Antifungal Activity by Vapor Contact of Essential Oils Added to Amaranth , Chitosan , or Starch Edible Fi Lms. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153* (1–2), 66–72.
- (34) Souza, A. C.; Goto, G. E. O.; Mainardi, J. A.; Coelho, A. C. V; Tadini, C. C. LWT - Food Science and Technology Cassava Starch Composite Fi Lms Incorporated with Cinnamon Essential Oil : Antimicrobial Activity , Microstructure , Mechanical and Barrier Properties. *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, *54* (2), 346–352.

- (35) Amaral, J.; Dannenberg, S.; Biduski, B.; Lisie, S.; Hüttner, D.; Arocha, M.; Maria, A.; Zavareze, R. Antibacterial Activity , Optical , Mechanical , and Barrier Properties of Corn Starch Fi Lms Containing Orange Essential Oil. *Carbohydr. Polym.* **2019**, 222 (April), 114981.
- (36) Rajaei, A.; Tabatabaei, M.; Mohsenifar, A. International Journal of Biological Macromolecules Physical and Antimicrobial Properties of Starch-Carboxy Methyl Cellulose Fi Lm Containing Rosemary Essential Oils Encapsulated in Chitosan Nanogel. **2018**, 112, 148–155.
- (37) Ribeiro-santos, R.; Andrade, M.; Ramos, N.; Melo, D.; Sanches-silva, A. Biological Activities and Major Components Determination in Essential Oils Intended for a Biodegradable Food Packaging. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, 97, 201–210.
- (38) Castaño P., Ciro G., Zapata M., S. L. J. R. Actividad Bactericida Del Extracto Etanólico y Del Aceite Esencial de Hojas de Rosmarinus Officinalis L. Sobre Algunas Bacterias de Interés Alimentario. **2010**, 149–154.
- (39) Andrea, M. M.; Aníbal, M. J.; Fernanda, A. D.; Luciano, V. E.; Pilar, P. N. Del; Artículo, D. Efecto Antimicrobiano Del Extracto Crudo Oleoso de Rosmarinus Officinalis Sobre Cepa de Escherichia Coli Effect Antimicrobial of Extract of Rosmarinus Officinalis on Strain of Escherichia Coli Introducción Materiales y Métodos. **2017**, 168–175.
- (40) Jiang, Y.; Wu, N.; Fu, Y.; Wang, W.; Luo, M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Rosemary. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2011**, 32 (1), 63–68.
- (41) Sandí, A. Utilización Del Ñame (*Discorea Alata*) y Del Tiquisque (*Xanthosoma Sagittifolium*) de Rechazo Para La Obtención de Adhesivos Naturales En Base Acuosa. Tesis de Licenciatura En Química Industrial, Universidad Nacional, 2008.
- (42) Rojas, L. y Solano, L. Formulación de Un Plástico Biodegradable Apto Para Empaque

de Abarrotes, Semejante a Plástico de Bolsa de Supermercado, a Partir de Almidón de Yuca. Tesis de Licenciatura de Ingeniería Química, Universidad de Costa Rica., 2013.

- (43) Geyer, R.; Jambeck, J. R.; Law, K. L. Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made. *Sci. Adv.* **2017**, *3* (7), e1700782.
- (44) Kelly, F. J. Threat to Human Health from Environmental Plastics. *BMJ* **2017**, *358* (September 2017), j4334.
- (45) Andrady, A. L. The Plastic in Microplastics: A Review. *Mar. Pollut. Bull.* **2017**, *119* (1), 12–22.
- (46) Lebreton, L.; Andrady, A. Future Scenarios of Global Plastic Waste Generation and Disposal. *Palgrave Commun.* **2019**, *5* (1), 1–11.
- (47) Rajmohan, S. K.; Ramya, C.; Varjani, S. Plastic Pollutants: Waste Management for Pollution Control and Abatement. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* **2019**.
- (48) Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T. S. Microplastics as Contaminants in the Marine Environment: A Review. *Mar. Pollut. Bull.* **2011**, *62* (12), 2588–2597.
- (49) Gibb, B. C. Plastics Are Forever. *Nat. Chem.* **2019**, *11* (5), 394–395.
- (50) Zheng, J.; Suh, S. Strategies to Reduce the Global Carbon Footprint of Plastics. *Nat. Clim. Chang.* **2019**, *9* (5), 374–378.
- (51) Scherer, C.; Emberger-klein, A.; Menrad, K.; Scherer, C. Consumer Preferences for Outdoor Sporting Equipment Made of Bio-Based Plastics: Results of a Choice-Based-Conjoint Experiment in Germany. *J. Clean. Prod.* **2018**.
- (52) Spierling, S.; Knüpfper, E.; Behnsen, H.; Mudersbach, M.; Krieg, H.; Springer, S.; Albrecht, S.; Herrmann, C. Bio-Based Plastics - A Review of Environmental, Social and Economic Impact Assessments. *J. Clean. Prod.* **2018**, *185*, 476–491.
- (53) Xanthos, D.; Walker, T. R. International Policies to Reduce Plastic Marine Pollution

from Single-Use Plastics (Plastic Bags and Microbeads): A Review. *Mar. Pollut. Bull.* **2017**, *118* (1–2), 17–26.

- (54) Halley, P.; Avérous, L. E. Starch Polymers From Genetic Engineering to Green Applications. *Elsevier B.V San Diego.* **2014**, 13–45.
- (55) López, R. Efecto de La Fermentación y El Secado Sobre La Obtención de Almidón Agrio a Partir de Dos Variedades de Yuca (Manihot Esculenta). Tesis En Licenciatura En Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, 2011.
- (56) Adamolekun, B. Etiology of Konzo, Epidemic Spastic Paraparesis Associated with Cyanogenic Glycosides in Cassava: Role of Thiamine Deficiency? *J. Neurol. Sci.* **2010**, *296* (1–2), 30–33.
- (57) Bolarinwa, I. F.; Oke, M. O.; Olaniyan, S. A.; Ajala, A. S. A Review of Cyanogenic Glycosides in Edible Plants. *Intech* **2016**, chapter 8.
- (58) Perez S, Baldwin PM, G. D. Structural Features of Starch Granules I. In: James B, Roy W, Editors. Starch. 3rd Ed. San Diego:Academic Press. **2009**, 149–92.
- (59) Bertoft, E. Understanding Starch Structure: Recent Progress. *Agronomy* **2017**, *7* (3), 56.
- (60) Janssen, L.; Moscicki, L. E. Thermoplastic Starch: A Green Material for Various Industries. *WILEY-VCH Verlag GmbH Co. KGaA, Weinheim All Gran Bretaña* **2009**, pp.15-38; 170-187.
- (61) Rolland-sabaté, A.; Sanchez, T.; Buléon, A.; Colonna, P.; Ceballos, H.; Zhao, S.; Zhang, P.; Dufour, D. Molecular and Supra-Molecular Structure of Waxy Starches Developed from Cassava (*Manihot Esculenta Crantz*). *Carbohydr. Polym.* **2013**, *92* (2), 1451–1462.
- (62) JL., J. Structural Features of Starch Granules II. In: James B, Roy W, Editors. Starch. 3rd Ed. San Diego: Academic Press. **2009**, 193–236.

- (63) Kim, H. S.; Huber, K. C. Channels within Soft Wheat Starch A- and B-Type Granules. *J. Cereal Sci.* **2008**, *48* (1), 159–172.
- (64) Waterschoot, J.; Gomand, S.V.; Fierens, E.; Delcour, J. A. Production, Structure, Physicochemical and Functional Properties of Maize, Cassava, Wheat, Potato and Rice Starches. *Starch/Stärke* **2015**, 14–29.
- (65) Zhu, F., & Wang, S. Physicochemical Properties, Molecular Structure, and Uses of Sweetpotato Starch. *Trends in Food Science and Technology*, 36,68–78. **2014**.
- (66) Russo, M. A. L.; Sullivan, C. O.; Rounsefell, B.; Halley, P. J.; Truss, R.; Clarke, W. P. Bioresource Technology The Anaerobic Degradability of Thermoplastic Starch : Polyvinyl Alcohol Blends : Potential Biodegradable Food Packaging Materials. *Bioresour. Technol.* **2009**, *100* (5), 1705–1710.
- (67) Zhu, F. Composition, Structure, Physicochemical Properties, and Modifications of Cassava Starch. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *122*, 456–480.
- (68) Chaudhary, D. S.; Adhikari, B. P.; Kasapis, S. Glass-Transition Behaviour of Plasticized Starch Biopolymer System - A Modified Gordon-Taylor Approach. *Food Hydrocoll.* **2011**, *25* (1), 114–121.
- (69) Kalia, S.; Dufresne, A.; Cherian, B. M.; Kaith, B. S.; Avérous, L.; Njuguna, J.; Nassiopoulos, E. Cellulose-Based Bio- and Nanocomposites: A Review. *Int. J. Polym. Sci.* **2011**, *2011*.
- (70) Ebnesajjad, S. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications. *Elsevier Inc.* **2012**, 16–79.
- (71) Quesada, K; Alvarado, P; Sibaja, R; Vega, J. Utilización de Las Fibras Del Rastrojo de Piña (Ananas Comusus, Variedad Champaka) Como Material de Refuerzo En Resinas de Poliéster. *Rev. Iberoam. Polímeros.* **2005**, *6* (2), 157–179.
- (72) REPCar; PNUMA-UCR/CAR. Informe del Proyecto “Reduciendo el escurrimiento de

plaguicidas al mar caribe” <http://cep.unep.org/repcar/proyectos-demostrativos/costa-rica-1/publicaciones-proagroin/protocolo-rastrajo.pdf> (accessed mar 12, 2018).

- (73) Brinchi, L.; Cotana, F.; Fortunati, E.; Kenny, J. M. Production of Nanocrystalline Cellulose from Lignocellulosic Biomass: Technology and Applications. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94* (1), 154–169.
- (74) Mishra, R. K.; Sabu, A.; Tiwari, S. K. Materials Chemistry and the Futurist Eco-Friendly Applications of Nanocellulose: Status and Prospect. *J. Saudi Chem. Soc.* **2018**.
- (75) Ferreira, F. V.; Pinheiro, I. F.; Gouveia, R. F.; Thim, G. P.; Lona, L. M. F. Functionalized Cellulose Nanocrystals as Reinforcement in Biodegradable Polymer Nanocomposites. *Polym. Compos.* **2017**, 1–21.
- (76) Cherian, B. M.; Leão, A. L.; De Souza, S. F.; Costa, L. M. M.; De Olyveira, G. M.; Kottaisamy, M.; Nagarajan, E. R.; Thomas, S. Cellulose Nanocomposites with Nanofibres Isolated from Pineapple Leaf Fibers for Medical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2011**, *86* (4), 1790–1798.
- (77) Mondal, S. Preparation, Properties and Applications of Nanocellulosic Materials. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *163*, 301–316.
- (78) Li, S.; Lee, P. S. Development and Applications of Transparent Conductive Nanocellulose Paper. *Sci. Technol. Adv. Mater.* **2017**, *18* (1), 620–633.
- (79) Emblem, A. Plastics Properties for Packaging Materials. *Packag. Technol.* **2012**, 287–309.
- (80) Mangaraj, S.; Goswami, T. K.; Mahajan, P. V. Applications of Plastic Films for Modified Atmosphere Packaging of Fruits and Vegetables: A Review. *Food Eng. Rev.* **2009**, *1* (2), 133–158.
- (81) Keller, P. E.; Kouzes, R. Water Vapour Permeation in Plastics. *Pacific Northwest Natl.*

Lab.(PNNL), Richland, WA (United States). 2017, No. January, 29.

- (82) FDA: Code Fed. Regul. (CFR). Title 21 Food DDep. Heal. Hum. Serv. Subchapter B – Food Hum. Consum, Part 182–Subst. Gen. Recognized as Safe (GRAS). Chapter I – Food Drug Adm. **2016**.
- (83) Santos, D. C.; Ribeiro-Santos, R.; Ventura, L. A. F.; Melo, N. R.; Costa, B. S.; Rojas, E. E. G.; Salgado, N. L. Antimicrobial Activity Studies and Characterization of Cellulose Acetate Films Containing Essential Oils. *Ital. J. Food Sci.* **2016**, 28 (2), 248–257.
- (84) Santos, R. R.; Costa, D. C.; Cavaleiro, C.; Costa, H. S.; Albuquerque, T. G.; Castilho, M. C.; Ramos, F.; Melo, R.; Sanches-silva, A. A Novel Insight on an Ancient Aromatic Plant: The Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.). *Trends Food Sci. Technol.* **2015**.
- (85) De Camargo Andrade-Molina, T. P.; Shirai, M. A.; Victória Eiras Grossmann, M.; Yamashita, F. Active Biodegradable Packaging for Fresh Pasta. *LWT - Food Sci. Technol.* **2013**, 54 (1), 25–29.
- (86) Dvaranauskaite, A.; Venskutonis, P. R.; Raynaud, C.; Talou, T.; Viškelis, P.; Sasnauskas, A. Variations in the Essential Oil Composition in Buds of Six Blackcurrant (*Ribes Nigrum* L .) Cultivars at Various Development Phases. **2009**, 114, 671–679.
- (87) Wannes, W. A.; Mhamdi, B.; Sriti, J.; Jemia, M. Ben; Ouchikh, O.; Hamdaoui, G.; Kchouk, M. E.; Marzouk, B. Antioxidant Activities of the Essential Oils and Methanol Extracts from Myrtle (*Myrtus Communis* Var . *Italica* L .) Leaf , Stem and Flower. *Food Chem. Toxicol.* **2010**, 48 (5), 1362–1370.
- (88) Hill, L. E.; Gomes, C.; Taylor, T. M. Characterization of Beta-Cyclodextrin Inclusion Complexes Containing Essential Oils (*Trans* -Cinnamaldehyde , Eugenol , Cinnamon Bark , and Clove Bud Extracts) for Antimicrobial Delivery Applications. *LWT - Food*

Sci. Technol. **2013**, *51* (1), 86–93.

- (89) Costa, D. C.; Costa, H. S.; Albuquerque, T. G.; Ramos, F.; Castilho, M. C.; Sanches-silva, A. Trends in Food Science & Technology Advances in Phenolic Compounds Analysis of Aromatic Plants and Their Potential Applications. *Trends Food Sci. Technol.* **2015**.
- (90) Begum, A.; Sandhya, S.; Ali, S. S.; Vinod, K. R.; Reddy, S.; Banji, D. An In-Depth Review on the Medicinal Flora *Rosmarinus Officinalis* (Lamiaceae). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2013**, *12* (1), 61–73.
- (91) Teixeira, B.; Marques, A.; Ramos, C.; Neng, N. R.; Nogueira, J. M. F.; Saraiva, J. A.; Nunes, M. L. Chemical Composition and Antibacterial and Antioxidant Properties of Commercial Essential Oils. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *43* (1), 587–595.
- (92) Ojeda-Sana, A. M.; van Baren, C. M.; Elechosa, M. A.; Juárez, M. A.; Moreno, S. New Insights into Antibacterial and Antioxidant Activities of Rosemary Essential Oils and Their Main Components. *Food Control* **2013**, *31* (1), 189–195.
- (93) Mathlouthi, N.; Bouzaienne, T.; Oueslati, I.; Recoquillay, F.; Hamdi, M.; Urdaci, M.; Bergaoui, R. Use of Rosemary, Oregano, and a Commercial Blend of Essential Oils in Broiler Chickens: In Vitro Antimicrobial Activities and Effects on Growth Performance. *J. Anim. Sci.* **2012**, *90* (3), 813–823.
- (94) Riahi, L.; Chograni, H.; Elferchichi, M.; Zaouali, Y.; Zoghلامي, N.; Mliki, A. Variations in Tunisian Wormwood Essential Oil Profiles and Phenolic Contents between Leaves and Flowers and Their Effects on Antioxidant Activities. *Ind. Crops Prod.* **2013**, *46*, 290–296.
- (95) Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S. K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6* (2), 71–79.
- (96) Cortés, E. Caracterización de Los Almidones de Ñame, Ñampí, Tiquisque y Evaluación de Su Uso Potencial Como Material Prima Para La Producción de Una

Pasta Alimenticia a Base de Harina de Arroz Con Alto Contenido de Almidón Resistente., Tesis de Licenciatura en Ingeniería de Alimentos, Universidad de Costa Rica., 2015.

- (97) American Society for Testing and Materials. ASTM. Designation: D 4442 – 92: “Standard Test Methods for Direct Moisture Content Measurement of Wood and 93 Wood-Base Materials.” 2016, 1–6.
- (98) American Society for Testing and Materials. ASTM. Designación: E 1755 – 01: “Standard Test Method for Ash in Biomass”. 2012, 1–5.
- (99) American Society for Testing and Materials. ASTM. Designación D1104-56: “Standard Test Method for Holocellulose in Wood”. 1978, 278–279.
- (100) American Society for Testing and Materials. ASTM. Designación D1103-60: “Standard Test Method for Alpha Cellulose in Wood”. 1977, 276–277.
- (101) Mohamad Haafiz, M. K.; Eichhorn, S. J.; Hassan, A.; Jawaid, M. Isolation and Characterization of Microcrystalline Cellulose from Oil Palm Biomass Residue. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *93* (2), 628–634.
- (102) Wulandari, W. T.; Rochliadi, A.; Arcana, I. M. Nanocellulose Prepared by Acid Hydrolysis of Isolated Cellulose from Sugarcane Bagasse. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* **2016**, *107* (1).
- (103) Conde-Hernández, L. A.; Espinosa-Victoria, J. R.; Trejo, A.; Guerrero-Beltrán, J. CO₂-Supercritical Extraction, Hydrodistillation and Steam Distillation of Essential Oil of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis*). *J. Food Eng.* **2017**, *200*, 81–86.
- (104) Erkan, N.; Ayranci, G.; Ayranci, E. Antioxidant Activities of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Extract, Blackseed (*Nigella Sativa* L.) Essential Oil, Carnosic Acid, Rosmarinic Acid and Sesamol. *Food Chem.* **2008**, *110*, 76–82.
- (105) López, O. V.; Ninago, M. D.; Lencina, M. M. S.; García, M. A.; Andreucetti, N. A.;

- Ciolino, A. E.; Villar, M. A. Thermoplastic Starch Plasticized with Alginate-Glycerol Mixtures: Melt-Processing Evaluation and Film Properties. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *126*, 83–90.
- (106) De Sousa, L. L.; de Andrade, S. C. A.; Athayde, A. J. A. A.; de Oliveira, C. E. V.; de Sales, C. V.; Madruga, M. S.; de Souza, E. L. Efficacy of *Origanum Vulgare* L. and *Rosmarinus Officinalis* L. Essential Oils in Combination to Control Postharvest Pathogenic *Aspergilli* and Autochthonous Mycoflora in *Vitis Labrusca* L. (Table Grapes). *Int. J. Food Microbiol.* **2013**, *165* (3), 312–318.
- (107) Ghanbari, A.; Tabarsa, T.; Ashori, A.; Shakeri, A.; Mashkour, M. Preparation and Characterization of Thermoplastic Starch and Cellulose Nanofibers as Green Nanocomposites: Extrusion Processing. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *112*, 442–447.
- (108) American Society for Testing and Materials. ASTM. Designación: D638 – 02: “American Society for Testing and Materials. ASTM. Designación: D882 – 02: ‘Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting’. 2003, 1-13.”
- (109) Daudt, R. M.; Avena-Bustillos, R. J.; Williams, T.; Wood, D. F.; Kulkamp-Guerreiro, I. C.; Marczak, L. D. F.; McHugh, T. H. Comparative Study on Properties of Edible Films Based on Pinhão (*Araucaria Angustifolia*) Starch and Flour. *Food Hydrocoll.* **2016**, *60*, 279–287.
- (110) Stojanović-Radić, Z.; Pejčić, M.; Joković, N.; Jakanović, M.; Ivić, M.; Šojić, B.; Škaljac, S.; Stojanović, P.; Mihajilov-Krstev, T. Inhibition of *Salmonella* Enteritidis Growth and Storage Stability in Chicken Meat Treated with Basil and Rosemary Essential Oils Alone or in Combination. *Food Control* **2018**, *90*, 332–343.
- (111) Institute, Clinical and Laboratory Standards M100-S23: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2013, p 23rd informational supplement document.
- (112) Lewandowski, C. M.; Co-investigator, N.; Lewandowski, C. M. *Starch Chemistry and*

Technology. 3rd Edition; 2015; Vol. 1.

- (113) Rocha, T. D. S., Carneiro, A. P. D. A., & Franco, C. M. L. Effect of Enzymatic Hydrolysis on Some Physicochemical Properties of Root and Tuber Granular Starches. *Food Sci. Technol.* **2010**, 2009 (003853), 544–551.
- (114) Nuwamanya, E.; Baguma, Y.; Emmambux, N.; Taylor, J. Physicochemical and Functional Characteristics of Cassava Starch in Ugandan Varieties and Their Progenies. **2010**, 2 (1), 1–11.
- (115) Abera, S.; Rakshit, S. K. Comparison of Physicochemical and Functional Properties of Cassava Starch Extracted from Fresh Root and Dry Chips. *Starch/Staerke* **2003**, 55 (7), 287–296.
- (116) Charoenkul, N.; Uttapap, D.; Pathipanawat, W.; Takeda, Y. Molecular Structure of Starches from Cassava Varieties Having Different Cooked Root Textures. *Starch/Staerke* **2006**, 58 (9), 443–452.
- (117) Kittipongpatana, O. S.; Kittipongpatana, N. Resistant Starch Contents of Native and Heat-Moisture Treated Jackfruit Seed Starch. *Sci. World J.* **2015**, 2015.
- (118) Aguilar, P. V.; Quesada, Y. A.; Marín, R. L.; Ruth, A.; Leiva, B. Artículo Características de Calidad y Digestibilidad in Vitro Del Almidón Agrio de Yuca (*Manihot Esculenta*) Producido En Costa Rica Quality Characteristics and in Vitro Digestibility of Sour Cassava (*Manihot Esculenta*) Starch Produced in Costa Rica. **2012**, 3 (1), 1–13.
- (119) Martinez, C.; Prodoliet, J. Determination of Amylose in Cereal and Non-Cereal Starches by a Colorimetric Assay : Collaborative Study. **1996**, No. 3114, 81–85.
- (120) Sievert, D.; Holm, J. Determination of Amylose by Differential Scanning Calorimetry. **1993**, 45 (4).
- (121) Pérez, A.; Sandoval, A. J.; Cova, A.; Müller, A. J. Glass Transitions and Physical

Aging of Cassava Starch – Corn Oil Blends. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *105*, 244–252.

- (122) Nguyen Vu, H. P.; Lumdubwong, N. Starch Behaviors and Mechanical Properties of Starch Blend Films with Different Plasticizers. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *154*, 112–120.
- (123) Wan Nadirah, W. O.; Jawaid, M.; Al Masri, A. A.; Abdul Khalil, H. P. S.; Suhaily, S. S.; Mohamed, A. R. Cell Wall Morphology, Chemical and Thermal Analysis of Cultivated Pineapple Leaf Fibres for Industrial Applications. *J. Polym. Environ.* **2012**, *20* (2), 404–411.
- (124) Montoya, J.; Farid Chejne, J.; Castillo, E.; Acero, J.; Gómez, C.; Sarmiento, J.; Valdés, C.; Garzón, L.; Osorio, J.; Tirado, D.; Blanco, A.; Moreno, N.; Marrugo, G.; Ospina, Y. *Biomasa. In Pirólisis Rápida de Biomasa*; Universidad Nacional de Colombia: Medellín, Colombia, 2013.
- (125) Moreno, G. Obtención de Un Material Compuesto de Matriz Polimérica Biodegradable Reforzado Con Una Microfibra Natural Obtenida a Partir de Un Desecho Agroindustrial, Universidad Nacional, 2018.
- (126) Karim, Z.; Afrin, S. Bacterial Cellulose: Preparation and Characterization Cellulose-Reinforced Nanofibre Composites: Production, Properties and Applications. *Woodhead Publ.* **2017**, 327–340.
- (127) Khalil, H. P. S. A.; Alwani, M. S.; Omar, A. K. M. Chemical Composition, Anatomy, Lignin Distribution, and Cell Wall Structure of Malaysian Plant Waste Fibers. *BioResources* **2006**, *1* (2), 220–232.
- (128) Pardo, M. E. S.; Cassellis, M. E. R.; Escobedo, R. M.; García, E. J. Chemical Characterisation of the Industrial Residues of the Pineapple (*Ananas Comosus*). *J. Agric. Chem. Environ.* **2014**, *03* (02), 53–56.
- (129) Pinheiro, I. F.; Ferreira, F. V.; Souza, D. H. S.; Gouveia, R. F.; Lona, L. M. F.; Morales, A. R.; Mei, L. H. I. Mechanical, Rheological and Degradation Properties of

PBAT Nanocomposites Reinforced by Functionalized Cellulose Nanocrystals. *Eur. Polym. J.* **2017**, *97*, 356–365.

- (130) Nechyporchuk, O.; Belgacem, M. N.; Bras, J. Production of Cellulose Nanofibrils: A Review of Recent Advances. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *93*, 2–25.
- (131) Özcan, M. M.; Chalchat, J. C. Chemical Composition and Antifungal Activity of Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Oil from Turkey. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2008**, *59* (7–8), 691–698.
- (132) Jalali-Heravi, M.; Moazeni, R. S.; Sereshti, H. Analysis of Iranian Rosemary Essential Oil: Application of Gas Chromatography-Mass Spectrometry Combined with Chemometrics. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218* (18), 2569–2576.
- (133) Proestos, C.; Lytoudi, K.; Mavromelanidou, O. K.; Zoumpoulakis, P.; Sinanoglou, V. J. Antioxidant Capacity of Selected Plant Extracts and Their Essential Oils. *Antioxidants* **2013**, *2* (1), 11–22.
- (134) Hesenov, A.; Erbatur, O. Study on the Stability of Supercritical Fluid Extracted Rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) Essential Oil. *J. Anal. Chem.* **2010**, *65* (9), 899–906.
- (135) Yeşilbag, D.; Eren, M.; Agel, H.; Kovanlikaya, A.; Balci, F. Effects of Dietary Rosemary, Rosemary Volatile Oil and Vitamin E on Broiler Performance, Meat Quality and Serum SOD Activity. *Br. Poult. Sci.* **2011**, *52* (4), 472–482.
- (136) Castillo, L.; López, O.; López, C.; Zaritzky, N.; García, M. A.; Barbosa, S.; Villar, M. Thermoplastic Starch Films Reinforced with Talc Nanoparticles. **2013**, *95*, 664–674.
- (137) Wilhelm, H.; Sierakowski, M.; Souza, G. P.; Wypych, F. Starch Films Reinforced with Mineral Clay. **2003**, *52*, 101–110.
- (138) Liu, X.; Wang, Y.; Yu, L.; Tong, Z.; Chen, L.; Liu, H.; Li, X. Thermal Degradation and Stability of Starch under Different Processing Conditions. **2013**, 48–60.

- (139) Clay, S.; Films, C. Biopolymer-Clay Nanocomposites: Cassava Starch and Synthetic Clay Cast Films. *2014*, 25 (2), 320–330.
- (140) Basiak, E.; Lenart, A.; Debeaufort, F. Effect of Starch Type on the Physico-Chemical Properties of Edible Films. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, 98, 348–356.
- (141) Dufresne, A. Plasticized Starch/Tunicin Whiskers Nanocomposites. 1. Structural Analysis. **2000**, 8344–8353.
- (142) Atarés, L., Bonilla, J., & Chiralt, A. Characterization of Sodium Caseinate-Based Edible Films Incorporated with Cinnamon or Ginger Essential Oils. *J. Food Eng.* **2010**, 100(4), 678-687.
- (143) Mali, S.; Sakanaka, L. S.; Yamashita, F.; Grossmann, M. V. E. Water Sorption and Mechanical Properties of Cassava Starch Films and Their Relation to Plasticizing Effect. *Carbohydr. Polym.* **2005**, 60 (3), 283–289.
- (144) Navia Porras, D. P.; Gordillo Suárez, M.; Hernández Umaña, J.; Poveda Perdomo, L. G. Optimization of Physical, Optical and Barrier Properties of Films Made from Cassava Starch and Rosemary Oil. *J. Polym. Environ.* **2019**, 27 (1), 127–140.
- (145) Shen, X. L.; Wu, J. M.; Chen, Y.; Zhao, G. Antimicrobial and Physical Properties of Sweet Potato Starch Films Incorporated with Potassium Sorbate or Chitosan. *Food Hydrocoll.* **2010**, 24 (4), 285–290.
- (146) Chiumarelli, M.; Hubinger, M. D. Evaluation of Edible Films and Coatings Formulated with Cassava Starch, Glycerol, Carnauba Wax and Stearic Acid. *Food Hydrocoll.* **2014**, 38, 20–27.
- (147) Müller, C. M. O.; Yamashita, F.; Laurindo, J. B. Evaluation of the Effects of Glycerol and Sorbitol Concentration and Water Activity on the Water Barrier Properties of Cassava Starch Films through a Solubility Approach. *Carbohydr. Polym.* **2008**, 72 (1), 82–87.

- (148) Colivet, J.; Carvalho, R. A. Hydrophilicity and Physicochemical Properties of Chemically Modified Cassava Starch Films. *Ind. Crop. Prod.* **2017**, *95*, 599–607.
- (149) Brandelero, R. P. H.; Yamashita, F.; Grossmann, M. V. E. The Effect of Surfactant Tween 80 on the Hydrophilicity, Water Vapor Permeation, and the Mechanical Properties of Cassava Starch and Poly(Butylene Adipate-Co-Terephthalate) (PBAT) Blend Films. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82* (4), 1102–1109.
- (150) Klancnik, A.; Guzej, B.; Kolar, M. H.; Abramovic, H.; Mozina, S. S. In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations. *J. Food Prot.* **2009**, *72* (8), 1744–1752.

ANEXOS

Anexo 1. Determinación del contenido de amilosa en el almidón de yuca amarga CM7951-5

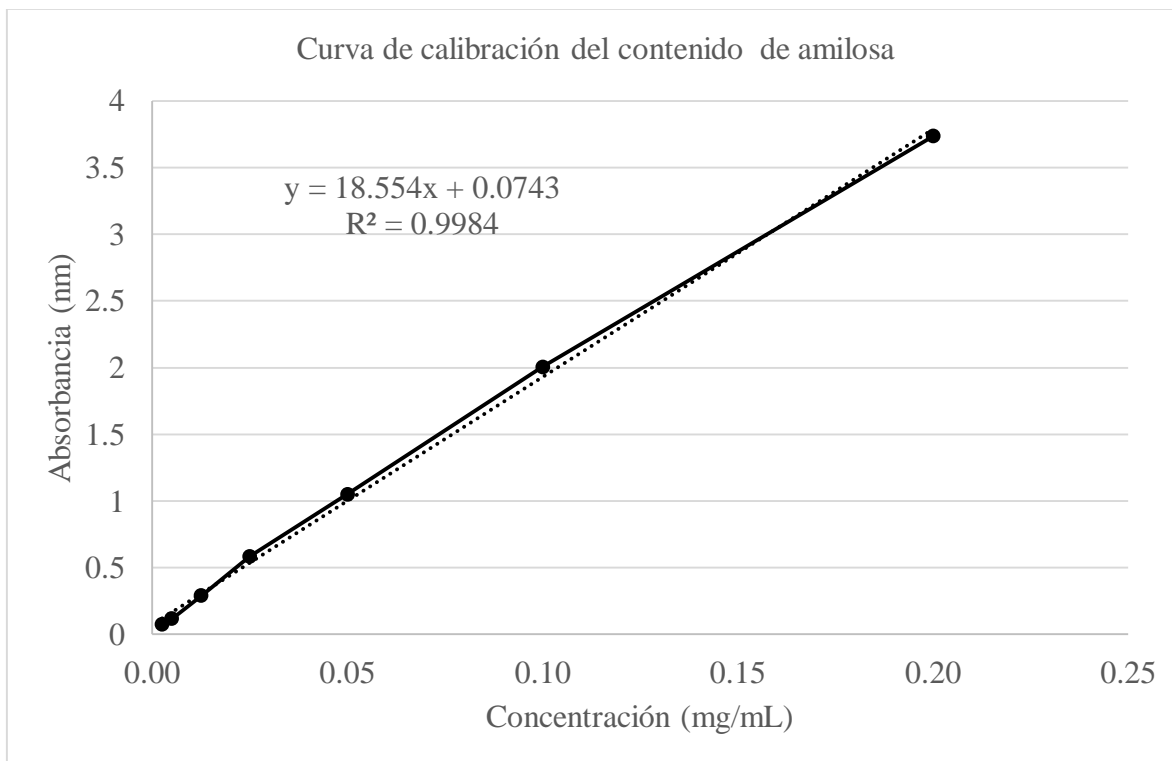


Figura 29. Curva de calibración de amilosa de papa para la determinación del contenido de amilosa en una muestra de almidón de yuca amarga determinada a 622 nm. Título de figura debajo de la misma.

Anexo 2. Caracterización por CG-MS y cuantificación de fenoles totales del aceite esencial de romero extraído por hidrodestilación

Cuadro 8. Componentes químicos volátiles del aceite esencial de romero determinado por cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de masas.

| N° | Compuesto | Tiempo de retención (min) | Abundancia (%) |
|----|---------------------------------|---------------------------|----------------|
| 1 | Triciclono | 4,88 | 0,04 |
| 2 | α -tujeno | 4,97 | 0,37 |
| 3 | α -pineno | 5,19 | 10,5 |
| 4 | Canfeno | 5,54 | 4,16 |
| 5 | Thuja-2,4(10)-dieno | 5,64 | 0,06 |
| 6 | 4(10)-tujeno | 6,14 | 0,04 |
| 7 | β -pineno | 6,26 | 3,40 |
| 8 | β -mirceno | 6,68 | 18,14 |
| 9 | α -felandreno | 7,02 | 0,12 |
| 10 | α -Terpinene | 7,39 | 0,52 |
| 11 | o-cimeno | 7,64 | 0,18 |
| 12 | 1,8-cineol | 7,93 | 25,23 |
| 13 | <i>Trans</i> - β -Ocimene | 8,06 | 1,01 |
| 14 | β - <i>cis</i> -Ocimene | 8,39 | 0,05 |
| 15 | δ -terpineno | 8,78 | 1,28 |
| 16 | Hidrato de sabineno | 9,04 | 0,11 |
| 17 | α -Terpinoleno | 9,82 | 0,65 |
| 18 | Linalol | 10,24 | 1,17 |
| 19 | 2-pinen-7-ona | 11,17 | 0,29 |
| 20 | Alcanfor | 12,03 | 18,39 |
| 21 | Pinocarvona | 12,63 | 0,12 |
| 22 | Borneol | 12,79 | 1,81 |
| 23 | Pinocanfona | 13,09 | 0,32 |
| 24 | (-)-4-Terpineol | 13,25 | 0,94 |
| 25 | α -Terpineol | 13,79 | 1,18 |
| 26 | Mirtenol | 14,02 | 0,15 |
| 27 | Verbona | 14,54 | 2,58 |
| 28 | Citronelol | 15,30 | 0,08 |
| 29 | <i>Cis</i> -verbenol | 15,84 | 0,12 |
| 30 | Geraniol | 16,42 | 1,34 |
| 31 | (E)-geranial | 17,04 | 0,08 |
| 32 | Bornil acetato | 17,72 | 3,54 |
| 33 | (E)-geranil acetato | 21,73 | 0,10 |
| 34 | Metil eugenol | 22,56 | 0,13 |
| 35 | Isocariofileno | 23,15 | 1,02 |
| 36 | α -humuleno | 24,49 | 0,27 |
| 37 | δ -Cardinene | 27,27 | 0,07 |
| 38 | Cariofinelo oxido | 29,48 | 0,28 |

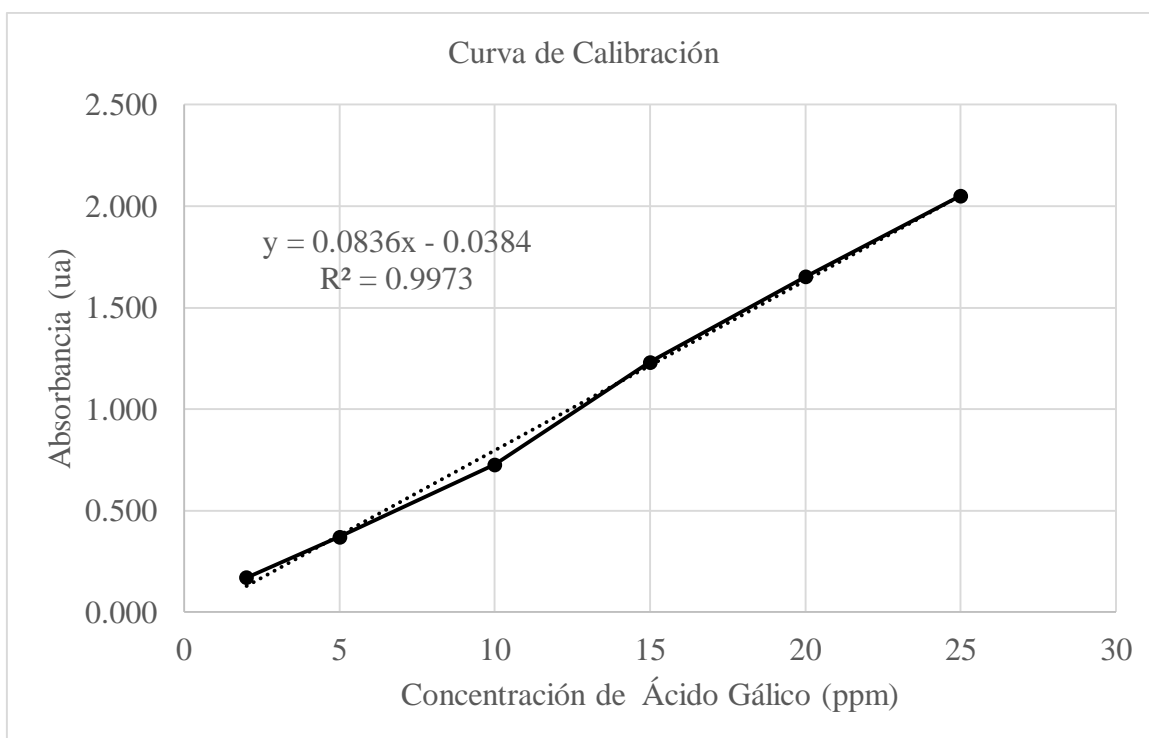


Figura 30. Curva de calibración de ácido gálico para la determinación del contenido de fenoles totales en una muestra de AER determinada a 780 nm.

Cuadro 9. Absorbancia de la muestra de AER para la determinación del contenido de fenoles totales (mg AGE/g muestra) del aceite esencial de romero (*Romarus officinalis*) determinada a 760 nm.

| Absorbancia | mg AGE/kg (ppm) | mg AGE/g muestra |
|-------------|-----------------|------------------|
| 0,676 | 6836,36 | 6,71 |
| 1,384 | 6805,74 | |
| 2,678 | 6498,56 | |

Anexo 3. Caracterización de las propiedades de interacción con el agua de las de las películas termoplásticas.

Cuadro 10. Resultados obtenidos para la determinación de la solubilidad en agua de las películas elaboradas con diferentes formulaciones y componentes realizada por triplicado.

| Película | Masa cápsula (gramos) | Masa inicial de la muestra (gramos) | Masa de la cápsula con la muestra seca (gramos) | Masa de muestra seca (gramos) | Solubilidad (%) | Solubilidad promedio (%) |
|--------------------------|------------------------------|--|--|--------------------------------------|------------------------|---------------------------------|
| TPS 20 % | 1,94 | 0,11 | 2,04 | 0,10 | 5,61 | 6.34 |
| | 1,83 | 0,11 | 1,93 | 0,10 | 6,67 | |
| | 1,96 | 0,12 | 2,07 | 0,11 | 6,73 | |
| TPS 25 % | 1,97 | 0,11 | 2,06 | 0,10 | 7,59 | 7.34 |
| | 1,96 | 0,10 | 2,05 | 0,09 | 8,02 | |
| | 1,88 | 0,11 | 1,98 | 0,10 | 6,42 | |
| TPS/NCC 5 % | 1,82 | 0,10 | 1,92 | 0,10 | 6,49 | 7.19 |
| | 1,89 | 0,11 | 1,99 | 0,10 | 8,15 | |
| | 1,96 | 0,11 | 2,06 | 0,10 | 6,93 | |
| TPS/NCC 10 % | 1,96 | 0,12 | 2,07 | 0,11 | 5,20 | 5.44 |
| | 1,93 | 0,11 | 2,02 | 0,09 | 5,44 | |
| | 1,95 | 0,11 | 2,05 | 0,10 | 5,68 | |
| TPS/NCC 15 % | 1,98 | 0,11 | 2,08 | 0,10 | 4,64 | 4.76 |
| | 2,03 | 0,11 | 2,13 | 0,10 | 5,92 | |
| | 1,91 | 0,10 | 2,01 | 0,10 | 3,73 | |
| TPS/AER 0,4 % | 1,94 | 0,10 | 2,03 | 0,10 | 8,88 | 8.76 |
| | 1,94 | 0,10 | 2,03 | 0,09 | 9,31 | |
| | 1,98 | 0,10 | 2,07 | 0,09 | 8,08 | |
| TPS/AER 0,5 % | 1,88 | 0,11 | 1,98 | 0,10 | 5,88 | 6.07 |
| | 1,88 | 0,11 | 1,96 | 0,09 | 6,07 | |
| | 1,82 | 0,11 | 1,92 | 0,10 | 6,26 | |
| TPS/NCC/AER 0,4 % | 1,94 | 0,10 | 2,04 | 0,09 | 11,00 | 10.45 |
| | 1,90 | 0,11 | 1,99 | 0,10 | 8,99 | |
| | 1,93 | 0,12 | 2,04 | 0,10 | 11,34 | |
| TPS/NCC/AER 0,5 % | 1,87 | 0,11 | 1,96 | 0,10 | 8,93 | 9.84 |
| | 2,00 | 0,10 | 2,09 | 0,09 | 9,73 | |
| | 2,00 | 0,10 | 2,09 | 0,09 | 10,87 | |

Cuadro 11. Resultados obtenidos para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua y la velocidad de transmisión de vapor de agua de las películas termoplásticas.

| Tiempo (h) | Muestra 1 | | Muestra 2 | | Muestra 3 | |
|------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| | Masa de la muestra (g) | Masa de agua ganada (g) | Masa de la muestra (g) | Masa de agua ganada (g) | Masa de la muestra (g) | Masa de agua ganada (g) |
| 0 | 134,2789 | 0,0000 | 133,34960 | 0,0000 | 133,60740 | 0,0000 |
| 1 | 134,3011 | 0,0222 | 133,36980 | 0,0202 | 133,62470 | 0,0173 |
| 2 | 134,3180 | 0,0391 | 133,38300 | 0,0334 | 133,63980 | 0,0324 |
| 3 | 134,3303 | 0,0514 | 133,39770 | 0,0481 | 133,65290 | 0,0455 |
| 4 | 134,3431 | 0,0642 | 133,40880 | 0,0592 | 133,66400 | 0,0566 |
| 5 | 134,3539 | 0,0750 | 133,42120 | 0,0716 | 133,67680 | 0,0694 |
| 6 | 134,3628 | 0,0839 | 133,43100 | 0,0814 | 133,68640 | 0,0790 |
| 7 | 134,3744 | 0,0955 | 133,44010 | 0,0905 | 133,69780 | 0,0904 |
| 8 | 134,3849 | 0,1060 | 133,45100 | 0,1014 | 133,71100 | 0,1036 |
| 9 | 134,3992 | 0,1203 | 133,4649 | 0,1153 | 133,72660 | 0,1192 |

Anexo 4. Propiedades mecánicas como resistencia a la tracción, alargamiento a la rotura y módulo elástico de las películas de TPS, TPS/NCC, TPS/NC/AER y TPS/AER.

Cuadro 12. Resultados obtenidos para la determinación de las propiedades mecánicas como la resistencia a la tracción, alargamiento a la rotura y módulo elástico de las películas de TPS, TPS/NCC, TPS/NC/AER y TPS/AER.

| Película | Resistencia a la tracción TS (MPa) | Alargamiento a la rotura EB (%) | Módulo elástico EM (MPa) |
|-------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| TPS 20 % | 1,263 ± 0,142 | 76,767 ± 15,037 | 4,470 ± 0,919 |
| TPS 25 % | 1,569 ± 0,055 | 34,847 ± 2,659 | 12,390 ± 1,285 |
| TPS/NCC 5 % | 1,067 ± 0,130 | 58,350 ± 6,998 | 4,770 ± 0,888 |
| TPS/NCC 10 % | 1,710 ± 0,128 | 45,515 ± 8,783 | 11,000 ± 3,535 |
| TPS/NCC 15 % | 1,795 ± 0,110 | 41,750 ± 4,449 | 11,950 ± 2,446 |
| TPS/AER 0,4 % | 0,495 ± 0,032 | 113,679 ± 22,895 | 2,570 ± 1,760 |
| TPS/AER 0,5 % | 0,545 ± 0,054 | 106,254 ± 25,501 | 2,640 ± 1,297 |
| TPS/NCC/AER 0,4 % | 1,022 ± 0,024 | 64,780 ± 6,944 | 5,810 ± 0,983 |
| TPS/NCC/AER 0,5 % | 0,882 ± 0,083 | 100,975 ± 9,415 | 3,500 ± 0,676 |

Figura 31. Ejemplo de gráficas obtenidas con el equipo donde se determinan las propiedades mecánicas medidas para las películas termoplásticas.

