

**CARACTERIZACIÓN DE PELICULAS COMESTIBLES DE QUITOSANO Y LA
AFECTACIÓN DE LAS PROPIEDADES POR APLICACIÓN DE ACEITES
ESENCIALES**

CHRISTIAN CAMILO ALFONSO ARCE

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Bogotá, 2011

**CARACTERIZACIÓN DE PELICULAS COMESTIBLES DE QUITOSANO Y LA
AFECTACIÓN DE LAS PROPIEDADES POR APLICACIÓN DE ACEITES
ESENCIALES**

CHRISTIAN CAMILO ALFONSO ARCE

CODIGO: 107460

**Trabajo de grado presentado para optar al título de Especialista en Ciencia y
Tecnología de Alimentos**

DIRIGIDO POR:

Ing. WILLIAM ALBARRACIN HERNÁNDEZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Bogotá, 2011

CARACTERIZACIÓN DE PELICULAS COMESTIBLES DE QUITOSANO Y LA AFECTACIÓN DE LAS PROPIEDADES POR APLICACIÓN DE ACEITES ESENCIALES

RESUMEN

La influencia del tipo de aceite esencial (romero y/o tomillo), su contenido y el tratamiento de homogeneización, ha sido objeto de varios estudios, observando que varían las propiedades físicas de las películas de quitosano y otros tipos de dispersiones comestibles que el quitosano forma. Las propiedades características de las películas de quitosano varían en resistencia, grosor, apariencia y aspectos organolépticos y se observó que hay una relación directa entre la concentración de aceite esencial y de quitosano que presente la película. Películas compuestas de aceites esenciales fueron más suaves, menos rígidas y más elásticas que las películas puras de quitosano. Las películas del 1% y del 3% (% p/p) quitosano, resultaron ser mejores respecto al patrón de celophane® en dureza, resistencia al quiebre, pero en el aspecto organoléptico la película de 3% quitosano no resultó atractiva para ser una película comestible, por el color amarillo que presentó, además de un olor fuerte similar al PVA, por lo cual se omitió esta concentración para las posteriores pruebas y se prosiguió la investigación con las películas de 1% quitosano para realizar los ensayos evaluando diferentes variables. Se utilizaron aceites esenciales de romero y de tomillo debido a que se comprobó en estudios anteriores que su contacto directo con los alimentos sirve como antimicrobiano y su uso en productos de pesca nos mostro efectividad importante respecto a patrones almacenados la misma cantidad de tiempo en temperatura de refrigeración y sin ningún aditivo. Las películas al ser formadas con los aceites esenciales mencionados presentaron algunas burbujas en el caso que el aceite llegara a ser concentrado pero poco homogeneizado, una buena homogeneización generó películas elásticas, de buena apariencia y con el olor característico de los aceites esenciales, distribuido uniformemente.

Se evaluaron las propiedades de punto de ruptura, punto de quiebre, reología, y aspectos físicos de las películas en concentración de 1 y 3% de quitosano, como patrón (solo quitosano) y con adicción de 0.75 g de aceite esencial/ 1 g de quitosano presente en el biopolimero.

Palabras Clave: aceite esencial, quitosano, película comestible, tomillo, romero.

Effect of essential oils and their concentration and homogenization conditions on properties of chitosan-based films

ABSTRACT

The influence of the type of essential oil (rosemary and thyme), its content and treatment of homogenization of the physical properties of chitosan-based film-forming dispersions and edible films has been studied. The characteristic properties of chitosan films vary in strength, thickness, appearance and organoleptic aspects are highly related to the concentration of essential oil and chitosan present in the film. Films composed of essential oils were softer, less rigid and more elastic than pure chitosan films. The films of 3% chitosan, were much better than the pattern of cellophane® in hardness, resistance to cracking, resistance to cutting, but the organoleptic aspect is not attractive for an edible film, the yellow color present, and a strong odor similar to PVA were unacceptable, so the 1% chitosan films were chosen for testing different variables. Essential oils of rosemary and thyme, because previous studies found that direct contact with food and serves as an antimicrobial use in poultry and fish products showed us important effect. The films to be formed with the essential oils mentioned had some bubbles in the case that the oil came to be concentrated but not very homogenized, good homogenization generated elastic films of good appearance and a smell of essential oils, evenly distributed.

Properties were assessed breaking point, turning point, rheology, and physical aspects of the films in concentrations of 1 and 3% chitosan, as an emulsifier (only chitosan) and 0.75 g of addition of essential oil / 1 g present in the biopolymer chitosan.

TABLA DE CONTENIDO

| Pág. | | |
|------|--|----|
| | INTRODUCCIÓN | 10 |
| | MARCO CONCEPTUAL | 11 |
| | 1.1 ALTERNATIVAS DE BARRERAS Y MATERIALES PARA AMPLIAR LA VIDA ÚTIL | 11 |
| | 1.2 ACEITES ESENCIALES | 12 |
| | 1.2.1 Definición y características | 12 |
| | 1.2.2 Mecanismo de acción antioxidante | 13 |
| | 1.2.3 Tomillo y romero: generalidades y mecanismo antioxidante | 15 |
| | 1.2.4 Análisis de propiedades de una película polimérica | 16 |
| | 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 17 |
| | 2.1 MATERIALES | 17 |
| | 2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL | 17 |
| | 2.3 ENSAYOS PRELIMINARES | 17 |
| | 2.3.1 Determinación de la cantidad de aceite esencial | 17 |
| | 2.3.2 Determinación del sistema de aplicación | 17 |
| | 2.4 Evaluación del efecto antioxidante de los aceites esenciales en las propiedades de las películas de quitosano | 18 |
| | 2.4.1 Preparación de las muestras para análisis | 18 |
| | 2.4.2 Análisis de propiedades. Comportamiento reológico | 18 |
| | 2.5 Preparación de las películas | 19 |
| | 2.6 Caracterización de las películas | 19 |
| | 2.6.1 Espesor | 19 |
| | 2.6.2 Propiedades mecánicas | 20 |
| | 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 21 |

| | |
|---|----|
| 3.1 PRUEBAS PRELIMINARES | 21 |
| 3.2 Propiedades físicas de las películas | 22 |
| 3.2.1 Pruebas de ruptura | 22 |
| 3.3 Aspecto Visual | 23 |
| 3.4 Propiedades mecánicas de las películas | 23 |
| 3.5 Análisis organoléptico por panel no entrenado | 24 |
| 4. CONCLUSIONES | 28 |
| 5. RECOMENDACIONES | 29 |
| 6. BIBLIOGRAFÍA | 30 |

LISTA DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1. Datos muestrales requeridos para la medición | 17 |
| Tabla 2. Propiedades físicas evaluadas en las películas y soluciones de quitosano | 21 |
| Tabla 3. Valores absolutos de esfuerzos cortantes vs gradiente para la película de quitosano al 1% (p/p) | 23 |
| Tabla 4. Valores absolutos de esfuerzos cortantes vs gradiente para la película de quitosano al 3% (p/p) | 24 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Diagrama de flujo para el proceso de preparación de las muestras | 18 |
| Figura 2. Diagrama de flujo para el ensayo de | 18 |
| Figura 3. Diagrama de flujo para análisis de tensión por ruptura | 19 |
| Figura 4. | 22 |
| Figura 5. | 23 |

LISTA DE IMAGENES

| | Pág. |
|-----------|------|
| IMAGEN 1. | 34 |
| ANEXO 2. | 35 |

INTRODUCCIÓN

Actualmente hay un creciente interés por el desarrollo de materiales que puedan mejorar la vida útil de los alimentos y también por la seguridad microbiológica que se les da. Los polímeros biodegradables son unos de estos materiales que ha logrado mayor interés y por lo tanto tienen un alto potencial comercial. En este contexto, si añadimos el lograr un uso comercial del gran volumen de desperdicios que genera la industria de los mariscos y específicamente de los crustáceos, se muestra una gran propuesta en las películas de quitosina para su aplicación en la preservación de los alimentos. Recientes estudios muestran que hay diversas posibilidades de extracción de la quitina presente en los crustáceos, y se considera que en Colombia existe un mercado de mariscos suficientemente grande para poder otorgar esta materia prima y lograr avances en investigación y desarrollo de materiales para la industria alimenticia.

Por otro lado, podemos observar una aplicación proyectada a una necesidad colombiana específicamente. Colombia es un país de amplia agricultura e importador de alimentos, y parte de su mercado está compuesto por la importación de frutas, productos pesqueros y algunos productos cárnicos, ya que son estos alimentos parte del catálogo de productos que actualmente el país usa orgánicas, las cuales tiene un mercado ya fuertemente posicionado en países europeos y de Norteamérica. En este proyecto se plantea la posibilidad de generar una película comestible de quitosano que será evaluada para incorporarle aceites esenciales de romero y tomillo (dos aceites esenciales comerciales comunes en Colombia) utilizada en el almacenamiento de frutas mínimamente procesadas, buscando mejorar la vida útil del alimento y a la vez utilizando un material que actualmente en Colombia se maneja como un desecho.

1. MARCO CONCEPTUAL

1.1 Alternativas de barreras y materiales para ampliar la vida útil

Las barreras artificiales ayudan a extender la corta vida útil de las carnes y alimentos en general. Una de las alternativas que se usan como barrera son las películas o recubrimientos comestibles, que se usan para complementar u suplir la refrigeración de las carnes y lograr una mejoría al tiempo de conservación.

Por otra parte, algunos materiales estudiados en los últimos años, tienen un alto potencial en la industria porque a la vez son películas comestibles y sirven como aditivos de los alimentos que cubren, funcionando como antioxidantes, antimicrobianos, saborizantes y colorantes (Han, 2000; Perez et al, 2001). Los métodos de aplicación varían desde la aplicación directa, hasta la incorporación de los agentes antimicrobianos en la película comestible. Las propiedades antimicrobianas se ven reducidas con el tiempo de la superficie del alimento, no obstante, logra mantenerse alta la concentración antimicrobiana por periodos largos de tiempo (Coma et al., 2002; Ouattara et al., 2000).

Las películas y recubrimientos comestibles ofrecen ventajas como las propiedades barrera, biocompatibilidad y mejor apariencia estética (Han, 2000; Kim et al, 1995; Kalemba and Kunicka, 2003). En adición este tipo de materiales son afectados por parámetros como la formulación, la tecnología de formación de la película, las características del solvente y los aditivos (Gocho et al., 2000; Gontard et al, 1993).

De los biopolímeros antes nombrados, la quitina es el segundo biopolímero más abundante en la tierra después de la celulosa y se encuentra en fuentes como el exoesqueleto de los crustáceos, en la pared celular de los hongos y en otros recursos biológicos variados (Andrady, 2011). El quitosano es derivado de la quitina por desacetilación en presencia de una base alcalina. Es un copolímero que consiste de unidades β -(1-4)-2-acetamido-glucosa y β -(1-4)-2-amino – glucosa, siendo el último más del 80% por lo general. Los quitosanos son descritos en términos del grado de acetilación, el peso molecular, la viscosidad y la solubilidad. La importancia de este biopolímero está en sus propiedades antimicrobianas en conjunto con sus propiedades para formar películas (Fernandez-Saiz et al, 2009, Muzzarelli, 2000). Dentro de sus características se conoce que es hidrofílico, biocompatible, biodegradable y que es el principal componente estructural de cangrejo y cáscaras de camarón. El quitosano tiene muchas propiedades específicas tales como la actividad antimicrobiana, no toxicidad y la afinidad notable a las proteínas.

Del quitosano y sus derivados se han estado recibiendo crecientes intereses por diversas áreas tales como las ciencias de los alimentos, la purificación del agua, la industria de pulpa y papel, farmacia y la medicina (Felse y Panda, 2000; Beverly et al., 2008, Bernkop-Schnürch et al. 2006, Hu et al., 2005, Mathew and Abraham, 2008, Perez-Gago et al., 1999, Santos et al., 2009 y Vargas et al., 2006).

Sin embargo, las aplicaciones prácticas de quitosano se ven limitadas por su insolubilidad en agua a pH superior a 6. Varios derivados del quitosano han sido diseñados para superar este obstáculo (Muzzarelli et al., 1982 y al Muzzarelli et al., 1988). Una de las maneras más populares para proporcionar un carácter hidrofílico de este polisacárido es a través de carboxilación.

Los recubrimientos y películas de quitosano que se han investigado tienen propiedades muy diferentes entre los variados experimentos realizados alrededor del mundo. De estas películas se hacen evaluaciones de quiebre, elongación, opacidad y un gran número de diferentes características que pueden verse en un polímero.

1.2 ACEITES ESENCIALES

1.2.1 Definición y características. Los aceites esenciales (AE, también llamados aceites volátiles o etéreos) son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos de material vegetal (flores, botones, semillas, hojas, corteza, tronco, hierbas, frutas y raíces) (Burt, 2004). También se los define como sustancias que “constituyen las fracciones líquidas volátiles responsables del aroma de las plantas, y que tienen gran importancia en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes y principios activos)” (Martínez, 2003). Los aceites esenciales pueden obtenerse mediante sistemas de expresión (exprimir las frutas como en el caso de naranjas y cítricos), extracción (sistema tradicional con solventes orgánicos o con fluidos supercríticos) y destilación por arrastre con vapor. La diferencia en los perfiles organolépticos indica una diferencia en la composición de los aceites, y ello también puede influenciar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Burt, 2004).

Los aceites esenciales han demostrado poseer propiedades antimicrobianas que no sólo se limitan al efecto antibacterial sino que incluyen características antivirales, antimicóticos, antitoxigénicas, antiparasitarias e incluso insecticidas. Estas propiedades están relacionadas con la naturaleza de los AE en la planta, en la cual comúnmente hacen parte de factores preinfección (sustancias

almacenadas en los tejidos vegetales listas para su expulsión ante el ataque de agentes patógenos en la planta; un símil a los antígenos del sistema inmune en los animales) (Burt, 2004; Shafiur, 2007). Como metabolitos secundarios, los AE están a su vez conformados por compuestos de diferente naturaleza, la mayoría de los cuales comprenden sustancias terpenoides junto con sustancias oxigenadas (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos) (Instituto de investigación para recursos biológicos “Alexander Von Humboldt”, 2003). Los aceites esenciales pueden englobar más de 60 compuestos individuales, donde los componentes primarios aportan cerca del 85% del AE, y el resto sólo están presentes como trazas; generalmente el efecto antimicrobiano se atribuye a los compuestos fenólicos presentes en el aceite (Burt, 2004). El análisis composicional detallado se puede realizar mediante técnicas como la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas o la espectroscopia de infrarrojo, aunque ésta última no posee el mismo grado de resolución que las anteriores y por tanto es más útil para la identificación de los principales grupos funcionales (Burt, 2004; Instituto de investigación para recursos biológicos “Alexander Von Humboldt”, 2003).

La calidad de los aceites esenciales depende de varios factores inherentes a la planta y su manipulación, lo que hace que éstos compuestos no tengan una estandarización global. Básicamente estos factores que afectan la calidad final son las condiciones edáficas del cultivo (existencia y disponibilidad de nutrientes para las plantas), el régimen climático (luminosidad, temperatura, pluviosidad, vientos, altitud), latitud (en algunas zonas o regiones latitudinales las plantas producen aceites esenciales en cantidades y calidades más convenientes), labores agrícolas (distancias de siembra, abonos, podas, asociaciones), prácticas poscosecha (lavado, secado, empaque, almacenamiento, transporte), métodos de extracción y procesos industriales de refinamiento (desterpenado, descerado, esterificación, hidratación, etc.) (Instituto de investigación para recursos biológicos “Alexander Von Humboldt”, 2003).

1.2.2 Mecanismo de acción antioxidante. No se tiene un mecanismo absoluto que explique la actividad antioxidante de los aceites esenciales, principalmente debido a que están conformados por una gran cantidad de compuestos de diferente naturaleza. Stashenko et al (2005) establecen que si bien el mecanismo de la acción antioxidante de los aceites esenciales no se conoce con toda certeza, la composición química inherente de los mismos establecerá las pautas para determinar los medios de la acción antioxidante o pro-antioxidante. Fotti et al (2003) establecen la actividad antioxidante del γ -terpineno (un componente de algunos aceites esenciales) como resultado de la capacidad de sus radicales para reaccionar con los radicales libres de ácidos grasos insaturados, de lo cual se infiere que en mayor o menor grado los compuestos del tipo monoterpenoide y/o sesquiterpenoide tienen capacidad antioxidante mediante el atrapamiento de

intermediarios de radicales y consecuente bloqueo de la reacción en cadena típica de la oxidación lipídica. De igual modo, en otros estudios se ha mostrado una capacidad similar para atrapar radicales del tipo DPPH y ATBS por parte de aceites esenciales y sus componentes, especialmente aquellos de tipo fenólico (Stashenko, 2005). Las propiedades antioxidantes de los compuestos fenólicos, especialmente polifenoles, es conocida en el ámbito científico dada su capacidad para atrapar radicales libres y evitar su propagación en el medio. En efecto, la capacidad de un antioxidante para reducir un radical como el DPPH depende en gran parte en su habilidad para donar protones (H⁺) lo que a su vez está directamente relacionado con el número de grupos hidroxilo dentro del compuesto fenólico. Estudios sobre potenciales de oxidación y reacciones redox entre polifenoles e iones de metales de transición han mostrado que una estructura del tipo o-dihidroxil es crucial en la eficiencia del sistema (Li, 2009; Rojas & Brewer, 2007).

Sin embargo, el mecanismo no dependerá exclusivamente de la interacción entre los compuestos fenólicos del aceite esencial y los radicales libres producidos durante el proceso de oxidación lipídica; sino que en él también intervienen las relaciones sinérgicas internas entre los componentes del aceite esencial y los efectos de otros componentes como proteínas, minerales y vitaminas (Bouhdid, 2008). Las investigaciones relacionadas con la aplicación in Vivo del aceite esencial a fin de conseguir un efecto antioxidante en carnes crudas y productos procesados constituyen el punto de interés más relevante para este trabajo. Estévez et al (2006, 2007) realizaron una aplicación de aceites esenciales de romero y salvia sobre un derivado cárnico (paté de hígado de cerdo) comparando su efectividad con la de un antioxidante químico conocido: butil hidroxitolueno (BHT). Estévez & Cava (2006) analizaron la efectividad del aceite esencial de romero sobre la oxidación de proteínas y lípidos en diferentes tipos de salchichas. Bözkurt (2006) igualmente investigó los efectos de antioxidantes naturales (extracto de té verde y aceite esencial de *Timbra spicata*) en un tipo de salchicha turca fermentada, donde los aditivos naturales mostraron mayor efectividad para evitar el proceso de enranciamiento que el BHT.

1.2.3 Tomillo y romero: generalidades y mecanismo antioxidante. Se conoce con el nombre “tomillo” a las diversas plantas aromáticas del género Thyme, familia lamiaceae o lamiales, y que se emplea generalmente con fines medicinales y alimenticios (como condimento). El tomillo (*Thymus vulgaris*) es originaria del mediterráneo, donde algunas especies forman un tipo especial de vegetación arbustiva no mayor a 50 cm de altura. Morfológicamente es una planta perenne de tallos leñosos y grisáceos, hojas ovadas, flores blancas o rosadas, y cuya mayor cualidad sensorial es su potente olor característico, como resultado de la composición de su aceite esencial (Stahl – Bizkut & Sáez, 2002). La composición química del aceite esencial de tomillo varía según la geografía, país de origen,

clima, etc.; aunque sus componentes principales se mantienen a lo largo de la especie. Para la variedad *Thymus vulgaris* (la más común) el timol es el componente principal (aproximadamente en un 40 – 50%), seguido por el carvacrol ($\approx 5\%$), p-cimeno ($\approx 30\%$) y γ -terpineno ($\approx 2\%$) (Horváth et al, 2006). De hecho, el efecto antioxidante está determinado principalmente por los isómeros timol y carvacrol; especialmente el timol dada su mayor resistencia estérica en el grupo fenólico en comparación con el carvacrol lo que a su vez impide reacciones colaterales indeseables (los compuestos fenólicos tienen la capacidad de donar los átomos de hidrógeno del grupo funcional hidroxilo al reaccionar con radicales peroxilo, lo cual produce radicales estables fenoxilo y por ende termina la reacción en cadena típica de los procesos de oxidación lipídica. Luego, entre menor sea la probabilidad de reacciones simultáneas para dicho grupo funcional mejor será su efecto como receptor de radicales libres). El efecto antioxidante de estos compuestos fenólicos (timol y carvacrol) es dependiente de la concentración de los mismos (Yanishlieva et al, 1999; Mastelic et al, 2008).

El romero (*Rosmarinus officinalis*) es un arbusto perenne muy aromático de la familia de las labiadas, que puede llegar a medir hasta 3 metros y que generalmente crece espontáneamente en los matorrales en compañía de otras plantas como el tomillo o el espliego. Posee tallos erectos y ramificados, hojas lineares de color verde al haz y blanquecinas al envés y flores pequeñas de color azul pálido. Al igual que el tomillo posee un olor particular debido a la composición de su aceite esencial (Botanical-online, 2009). La composición química de su aceite esencial es mayoritaria en 1-8 cineol / eucaliptol (40 – 80%) con menores cantidades de otros compuestos como el canfor (2 – 14%), borneol 12 (2 – 10%) y el α -pineno (2 – 25%) (Burt, 2004; Dimitrijević et al, 2007).

Ocasionalmente (como en el caso del aceite a usar en este trabajo) ácido rosmarínico puede estar presente dentro de la composición del aceite esencial. El mecanismo antioxidante del aceite esencial de romero obedece principalmente al efecto conjugado del eucaliptol, el pineno y el ácido rosmarínico (de estar presente). Los dos primeros hacen parte de compuestos monoterpenoides (aunque el eucaliptol es más bien un fenólico) que se caracterizan por su interacción con radicales libres lo que impide que las reacciones en cadena se lleven a cabo. El ácido rosmarínico es un compuesto fenólico con cuatro grupos hidroxilo en su estructura, y si bien esto puede beneficiar la reacción entre el antioxidante y el radical libre para impedir la propagación de más radicales, realmente es la posición estructural de los OH- en el compuesto antioxidante la que es determinante (en el ácido rosmarínico están hacia los extremos lo que puede favorecer las reacciones colaterales indeseables) (Wang et al, 2011; Erkan et al, 2008).

1.2.4 PELICULAS POLIMERICAS COMESTIBLES.

El efecto nocivo del oxígeno en los alimentos se han retrasado comúnmente con la aplicación de antioxidantes y agentes anti-pardeamiento, tales como los ácidos ascórbico y cítrico. La inclusión de antioxidantes de sabor fuerte, (por ejemplo, aceites esenciales, N-acetilcisteína y otros) en películas y recubrimientos comestibles puede permitir la encapsulación de sabores generados por la oxidación y pueden reducir los fuertes aromas. Además de este método, la oxidación puede ser eficaz mediante la selección de películas y recubrimientos de permeabilidad limitada para el oxígeno. De acuerdo con Kester y Fennema (1994) las películas y recubrimientos hidrofílicos (polisacáridos o basados en proteínas) por lo general ofrecen una buena barrera a la transferencia de oxígeno. Esta propiedad es a su vez, muy afectada por la cantidad de agua que pueden hidrolizar la película y la temperatura de almacenamiento. Dentro de las películas poliméricas más investigadas están las que se basan en proteínas como almidón, quitosano, colágeno y gluten, ya que son hechas a partir de materias primas más fáciles de obtener. De lo anterior se puede hacer un aparte en la películas de quitosano, ya que este compuesto tiene un gran número de aplicaciones y ha comprobado ser una materia prima de excelentes resultados en el campo de los alimentos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

A partir de quitosano de alto peso molecular y alto grado de deacetilación 98.9% (donación de la Universidad Austral de Chile, Santiago, Chile) puesto en solución se preparo una dispersión para la formación de la película, (con viscosidad de 0.8 Pa s , quitosano 1% p/p en 1% p/p acido acético glacial). Sin adicción de plastificante. Los aceites esenciales de tomillo y de romero fueron provistos por los laboratorios de fisicoquímica ICTA (Bogotá, Colombia) y los demás compuestos requeridos fueron entregados por los laboratorios LIQ e ICTA financiados por la DIB de la Universidad Nacional de Colombia.

2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Tabla 1. Tabla de datos muestrales requeridos para medición de cada una de las propiedades a evaluar

| | | 1 % Quitosano | 3 % Quitosano |
|------------------------------|-----------------------------------|----------------|-----------------|
| Tip o de Ac eite | Romero 0.75 g/1g quitosano | X ₁ | X ₄ |
| | | X ₂ | X ₅ |
| | | X ₃ | X ₆ |
| | Tomillo 0.75 g/1g quitosano | X ₇ | X ₁₀ |
| | | X ₈ | X ₁₁ |
| | | X ₉ | X ₁₂ |

2.3 ENSAYOS PRELIMINARES

2.3.1 Determinación de la cantidad de aceite esencial en las películas. Se realizó una revisión bibliográfica para comparar las cantidades de aceite esencial usado en investigaciones preliminares con otros aceites esenciales (AES), observando que el valor de 1 % p/p es el valor que mas reporta la literatura reciente. Se realiza junto a esta concentración unas muestras blanco las cuales solo contienen el quitosano.

2.3.2. Preparación de las soluciones formadoras de películas

Se realizó una solución acuosa de acido acético glacial (0.1 M) a 25 °C a la cual le fue agregado quitosano (1 % p/p).después de una agitación a 600 RPM durante la noche se obtiene una mezcla homogénea de color traslucido y tono ligeramente

amarillo. Luego de tener esta solución se agrega la cantidad de aceite esencial a la solución del polímero hasta alcanzar la concentración final de (1% p/p). Junto a esto se realizan las soluciones de quitosano a sus diferentes concentraciones sin la adición de aceites esenciales.

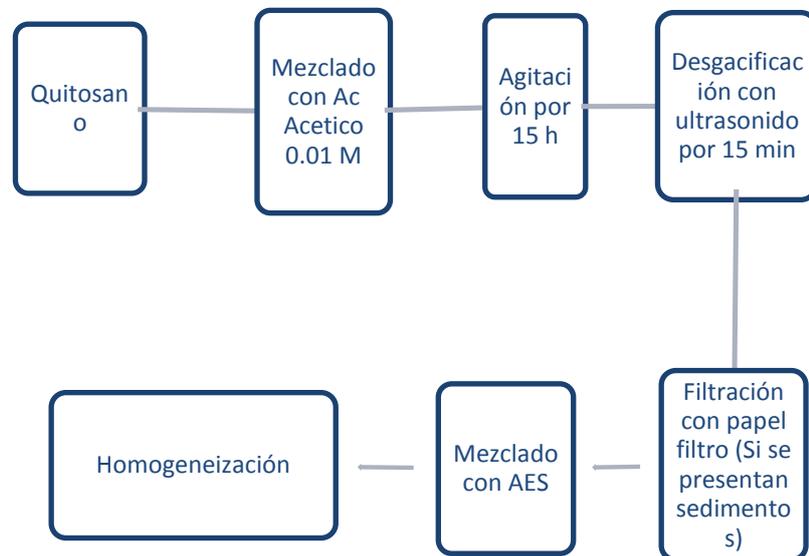
Las mezclas son agitadas a temperatura ambiente usando agitadores magnéticos esterilizados.

Luego estas mezclas pasan a ser desgasificadas por medio de un equipo de ultrasonido (Bransonic® 8510, USA) durante un periodo de 15 min a temperatura ambiente.

2.4 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS ACEITES ESENCIALES EN LAS PROPIEDADES DE LAS PELICULAS DE QUITOSANO

2.4.1 Preparación de las muestras para análisis. Se dispersa las soluciones en placas de teflón de manera que se agrega 10 ml de solución para realizar cada película, luego se realiza un proceso de *casting* en un horno secador donde se colocan las soluciones a 60 °C durante 24 horas. Luego se puede retirar las películas resultantes fácilmente de la placa de teflón, las cuales obtienen forma irregular que se recorta para lograr un tamaño y forma estándar con el cual se hacen las pruebas de las propiedades respectivas.

Figura 1. Diagrama de flujo para el proceso de preparación de las muestras



2.4.2 Analisis de propiedades. Comportamiento reológico. El comportamiento reológico de las soluciones formadoras de las respectivas películas fueron analizados por triplicado a 25 °C usando un reómetro rotacional (HAAKE Rheostress 1, Thermo Electric Corporation, Karlsruhe, Germany LIQ) con un sistema de sensores por cilindros coaxiales, tipo Z34DIN Ti. Las muestras se dejan en reposo por 5 minutos antes de tomar las medidas en el equipo. Los

esfuerzos cortantes (σ) fueron obtenidos como una función de la tasa de corte $\dot{\gamma}$ entre 0 and 300 s⁻¹, tomando 3 min cada prueba (ciclo de up and down). Los datos experimentales obtenidos se ingresan a la siguiente ecuación del modelo Ostwald deWaal (Eq. (1)) para determinar los esfuerzos cortantes y la viscosidad de la solución.

$$\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

2.5. Preparación de películas

Se utilizó un método de *casting* para la obtención de películas. La solución formadora de película se vierte sobre una placa plana de teflón enmarcado y nivelado placa (cuadrado de 15 cm de lado) y se secaron en las condiciones reguladas de un horno secador (alrededor del 60% de humedad relativa y 60 °C) durante 20 h. El espesor de la película fue controlado mediante el vertido de la cantidad de solución utilizando la cantidad mínima para cubrir en totalidad la superficie de la placa. Las películas secas lograron un peso de aproximadamente 60 g/m² en todas las formulaciones de película. El secado se dio de manera uniforme y controlada por la utilización del equipo nombrado anteriormente.

2.6 Caracterización de las películas

2.6.1. Espesor

El espesor de las películas fue determinado con un micrómetro análogo de medida cercana a 0.01 mm. Para esta prueba fueron tomados tres datos de cada película en puntos aleatorios de la misma para obtener las medidas.

2.6.2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas fueron analizadas por medio de ensayos de tensión (ASTM método estándar D882, ASTM, 2001), para obtener el verdadero estrés (σ) vs curvas de tensión de Hencky (3H). Se evaluaron los siguientes parámetros mecánicos: Módulo de elasticidad (EM), resistencia a la tensión (TS) y punto de quiebre (E). Las pruebas fueron realizadas en un texturometro universal de ensayos (Modelo TA.XT plus, Stable Micro Systems, Haslemere, Inglaterra), con una carga de 500 N se utilizó para realizar las pruebas.

Se estableció utilizar muestras rectangulares (30 * 100 mm) se cortaron y se almacenaron a 25 ° C. La humedad contenida por las películas utilizadas para la prueba mecánica presentan un rango entre 0,09 y 0,15 (g agua / g de la película), con una disminución significativa ($p < 0,05$).

Muestras uniformes de película se montaron sobre las pinzas de tensión del texturometro para agarrar y se estirar a 50 mm de 1 min hasta que se rompa. Las pruebas se realizaron por triplicado con cada formulación.

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 PRUEBAS PRELIMINARES

En los ensayos preliminares se evaluó la estabilidad de las soluciones de quitosano y si era necesario el uso de agente plastificante o emulsificante en las muestras, la influencia del tiempo de agitación y las revoluciones sobre el resultado final de las películas obtenidas. En la prueba de estabilidad se encontró que después de 24 h de agitación a más de 450 RPM ninguna de las concentraciones evaluadas mostró evidencia de separación de fases, por lo que se eligió el límite superior del rango reportado bibliográficamente (es decir se utilizó 24 h a 600 RPM) como características de agitación para las demás películas que se produjeron en adelante. El medio utilizado de ácido acético (0.1 M) se evaluó también en concentraciones menores hasta llegar a agua (0.1 M, 0.05 M y 0 M Ac. Acético), observando que a 0.05 M no se lograba total solubilidad del quitosano y además las películas finales resultaban quebradizas. La agitación de las soluciones al aplicárseles posteriormente los aceites esenciales es de suma importancia, ya que se obtuvieron varias películas con burbujas de aceite dispersas en la superficie, causando así la ruptura final de la película y que esta no fuera uniforme, la agitación aconsejable para la agitación de la solución con los aceites esenciales es un tiempo mayor a 15 min a 450 RPM o más. Las propiedades finales de las películas se ven afectada de manera importante al cambiar el material de la placa donde se realiza el proceso de *Casting*, ya que se obtuvieron películas de buen aspecto y muy uniformes al utilizar vidrio como placa, pero con el gran inconveniente que eran muy difíciles de desprender y en consecuencia se fracturaron en repetidas ocasiones, en cambio, al utilizar placas de teflón, el desprendimiento resultó más sencillo, pero, las películas resultantes son de una tonalidad más oscura y no es del todo traslúcida la película.



Figura 2. Película de quitosano obtenida en casting sobre placa de teflón

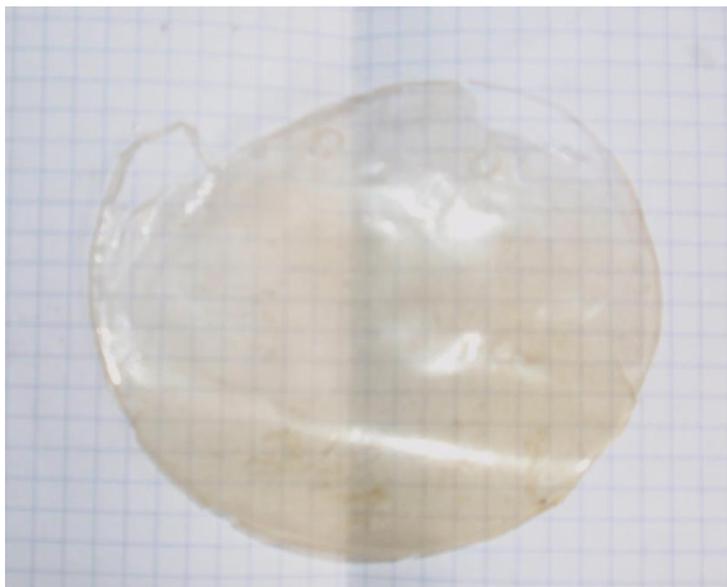


Figura 3. Película de quitosano obtenida por *casting* en placa de vidrio

3.2. Propiedades físicas de las películas

En general, el valor de contenido de humedad disminuyó a medida que fue incorporado el quitosano en la película, esto se atribuye a lo compacta que se va volviendo la estructura con mayor concentración. La agregación de AES (aceites esenciales) causa la formación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales de las cadenas de quitosano, dando lugar a una disminución en la disponibilidad de los grupos hidroxilo y amino y limitando las interacciones del agua por enlaces de hidrógeno, lo cual resulta en una disminución del valor de contenido de humedad de las películas comestibles (Park & Zhao, 2004). Como la concentración de AES aumenta, el contenido de humedad de las películas disminuyó significativamente ($p < 0,05$). Las películas de control hechas con únicamente quitosano se compactan, y la superficie de la película tuvo un aspecto liso, sin poros o fisuras (Fig. 1A y B, FOTOS DE LAS PELICULAS). Estos mismos resultados obtuvieron por Wong, Gastineau, Gregorski, Tillin y Pavlath (1992) y Seydim y Sarikus (2006).

A continuación se observa una tabla donde se comparan diferentes aspectos evaluados a las películas y soluciones obtenidas:

Tabla 2. Propiedades físicas evaluadas en las películas y soluciones de quitosano

| Propiedades físicas de las películas de quitosano con AES incorporados | | |
|--|-------------------------|-------|
| Espesor (mm) | Control quitosano 1% | 0.095 |
| | Control quitosano 3% | 0.108 |
| | Quitosano 1% Tomillo 1% | 0.102 |
| | Quitosano 1% Romero 1% | 0.108 |
| | | |

| | | |
|-------------------------------|-------------------------|--------|
| Porcentaje de humedad % | | |
| | Control quitosano 1% | 21 |
| | Control quitosano 3% | 19 |
| | Quitosano 1% Tomillo 1% | 18 |
| | Quitosano 1% Romero 1% | 18.5 |
| | | |
| Ph | | |
| | Control quitosano 1% | 3.2 |
| | Control quitosano 3% | 3.2 |
| | Quitosano 1% Tomillo 1% | 3.4 |
| | Quitosano 1% Romero 1% | 3.4 |
| | | |
| Densidad (Kg/m ³) | | |
| | Control quitosano 1% | 1050.2 |
| | Control quitosano 3% | 1120.3 |
| | Quitosano 1% Tomillo 1% | 1067.6 |
| | Quitosano 1% Romero 1% | 1084 |

3.2.1 Pruebas de ruptura.

Las pruebas de tensión y ruptura se realizaron con resultados para cada tipo de película obtenida (1%, 3% sin AES, 1% con AES tomillo 0.75%, 1% con AES romero 0.75%). Estas pruebas fueron realizadas en el texturometro que se muestra en la siguiente imagen.



Figura 4. Texturometro digital TA XT plus, en prueba a película de quitosano.

Para evaluar los resultados obtenidos por el textuometro se obtuvieron las graficas de tensión contra tiempo que se presentan en la figura 3.

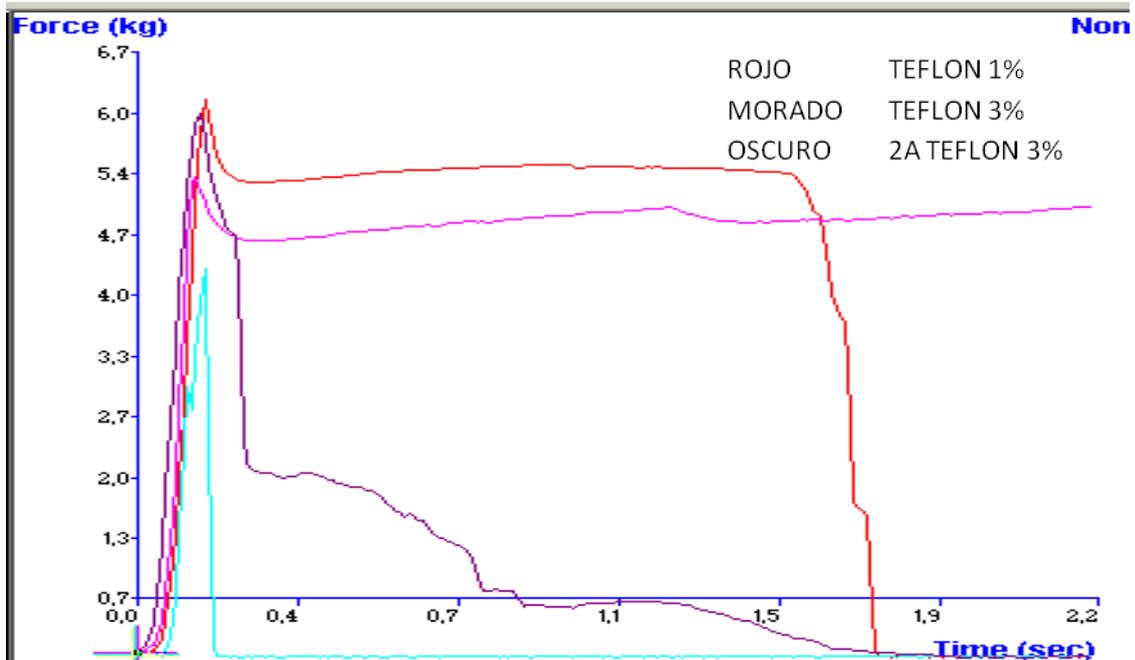


Figura 5. Tensión (Kg- fuerza) vs tiempo de la prueba (sec) para películas de 1% quitosano y 3% quitosano, hechas en placa de teflón.

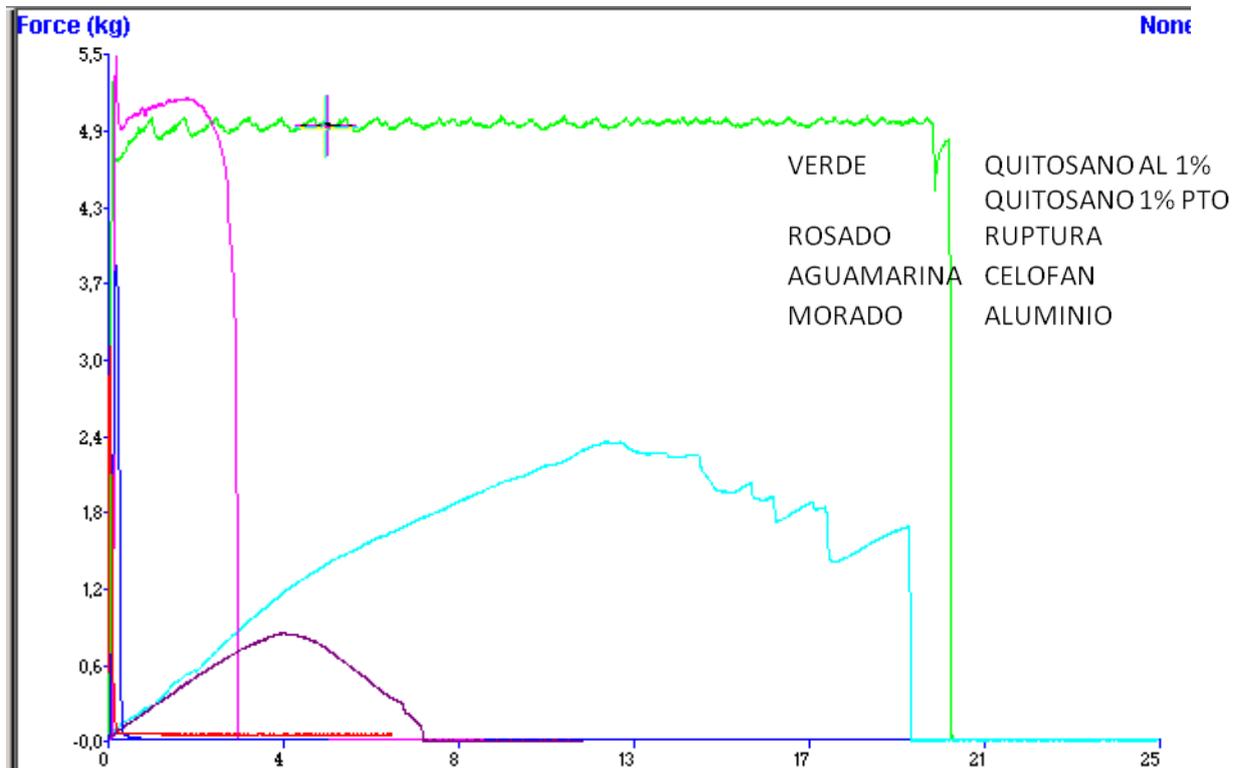


Figura 6. Grafica comparativa de prueba de ruptura (Kg-f contra tiempo de la prueba en segundos) para varios materiales (quitosano al 1%, quitosano al 3%, aluminio y celofán®).

Los resultados obtenidos a partir de las películas poliméricas de quitosano muestran que el material es más resistente a la tensión que el celophane común o el papel aluminio. (Muestras de igual tamaño expuestas a 6 kg de tensión).

3.3 Analisis organoléptico por panel no entrenado.

Las películas resultantes fueron evaluadas por cuatro personas no entrenadas para la evaluación de películas y envases alimenticios, se revisaron el aspecto visual, el olor, y la percepción general del producto.

3.3.1 Aspecto Visual

El color de las películas puede influir en la aceptabilidad de los consumidores de un producto (Sivaroban et al, 2008). Visualmente, las películas de quitosano tenían un aspecto ligeramente amarillo. Su transparencia se reduce a medida que se les incorporó AES. La incorporación de AES manifestó colores que fueron más oscuros que el del control. (Datos no mostrados)

Estos resultados se obtuvieron de acuerdo con las observaciones visuales. Sin embargo, los estudios sensoriales deben llevarse a cabo para evaluar la aceptabilidad de los consumidores de este cambio de color.

3.3.2 Percepción general de las películas luego de su consumo.

3.4. Las propiedades mecánicas de las películas

El efecto de la incorporación de AES en las propiedades mecánicas de quitosano películas se presentan en la Tabla 3. La película de control hecha solo con quitosano tuvo una resistencia a la tracción de 10,97 MPa. Al incorporarse AES en las soluciones de quitosano, las películas que presentaron mayor resistencia a la ruptura fueron las que no contenían AES ($p < 0,05$). Se consideró que una fuerte interacción entre el polímero y el AES produce un efecto de reticulación, lo que disminuye el volumen libre y la movilidad molecular del polímero. También hay posibilidades tales como la disminución en el contenido de humedad de las películas incorporadas durante la producción de películas con aceite incluido, lo que conduce a la disminución de la tensión y aumentar la resistencia a la tracción. Los resultados de las mediciones de contenido de humedad se muestran en la Tabla 2. De acuerdo con Gontard et al. (1993) y Redl et al., (2005) el agua es el plastificante más omnipresente e incontrolable para la mayoría de películas de base hidrocoloide, debido a su capacidad para modificar la estructura de las estructuras naturales de los polímeros. Así, el efecto de plastificación del agua no puede ser insignificante para estas películas, y la eficiencia de plastificación de las películas pudo ser comprobada en elementos sin requerir plastificante extra, como se realizó en este caso, donde no se agregó más plastificante, pero se lograron películas con propiedades plásticas importantes. Dentro de los datos que se

compararon para las películas obtenidas en el estudio y los reportados en la literatura (Caner et al, 2007;. García et al., 2004) se puede atribuir a la composición de quitosano y proveedores, la presencia de plastificante y la preparación de la película, efectos que cambian de manera importante la película obtenida.

El pH de la película en promedio fue entre 3,2 y 3,4, se observó un pequeño cambio de pH al realizarse la inclusión de los aceites, se puede considerar que la concentración de aceite puede ser otro factor para la variación de pH, pero no se logra en este estudio hacer una relación directa, otro factor que puede afectar esta propiedad es la forma como se realice la homogeneización de la solución, en el caso propio, se tuvo una diferencia del tiempo de agitación y de las revoluciones de agitación entre las soluciones (se paso de 450 RPM a 600 RPM).

Sin importar el tratamiento de homogeneización, la incorporación de los aceites esenciales tuvo un efecto significativo de la viscosidad. Al menor contenido (0,5%), la incorporación de los aceites esenciales produjo un significativo aumento de la viscosidad con respecto a las dispersiones de quitosano puro. Sin embargo, en el contenido de aceite (1%), las soluciones con contenido de aceite al 1% eran menos viscosas que las dispersiones de quitosano puro. Este comportamiento se puede explicar teniendo en cuenta dos efectos opuestos: la presencia o el aumento de la concentración de la fase dispersa (aceite) tiende a aumentar la viscosidad del sistema, mientras que la adsorción de las gotas en la superficie del polímero provoca una disminución de concentración de la fase acuosa en la solución.

Los análisis de las propiedades de las soluciones formadoras de las películas nos permiten concluir que el quitosano adsorbe sobre la superficie las gotas de tomillo y de romero, se observa que entre mayor es la reducción del tamaño de partícula para los AES, mayor es la adsorción de quitosano. Por lo cual las soluciones que incluyeron aceite pero en gotas grandes ($D > 2 \text{ mm}$) no lograron ser películas bien formadas y se obtuvo en cambio burbujas que rompían la estructura.

Se realizo un cambio de la inclusión del aceite, al ser lentamente incluido por medio de jeringa en toda la solución y luego se procedió a agitar a 600 RPM durante 10 minutos. En estas condiciones el aceite tamaño de las partículas se redujo considerablemente y la viscosidad se disminuyo.

Figura 7. Grafico de esfuerzos vs gradientes para la solución de quitosano puro 1%

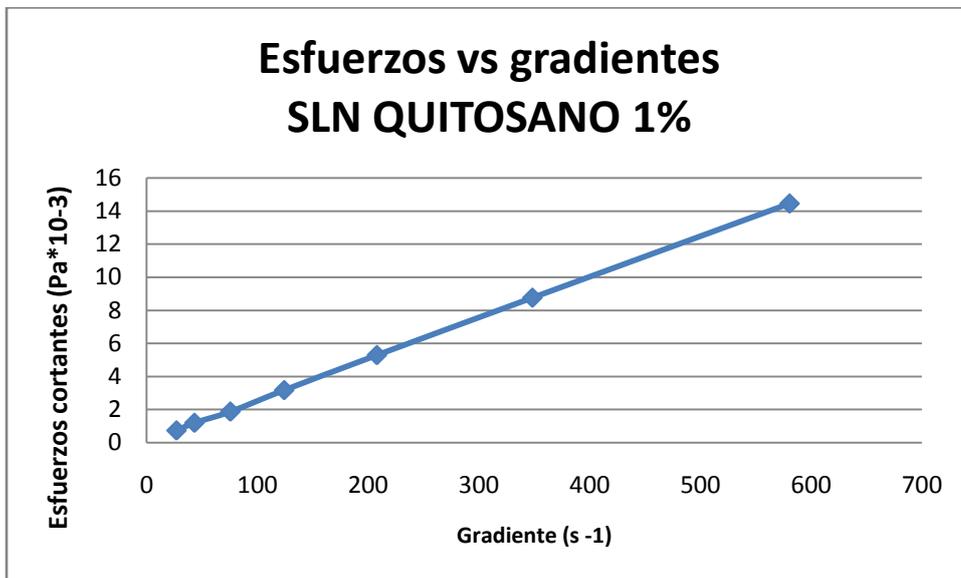


Tabla 3. Valores absolutos de esfuerzos cortantes vs gradiente para la película de quitosano al 1% (p/p)

| VALOR ABS | | Viscosidad |
|-----------|-------|------------|
| Tao | D | |
| 0,7298 | 27 | 0,02702963 |
| 1,1926 | 43,2 | 0,02760648 |
| 1,869 | 75,6 | 0,02472222 |
| 3,1684 | 124,2 | 0,02551047 |
| 5,2866 | 207,9 | 0,02542857 |
| 8,7576 | 348,3 | 0,02514384 |
| 14,4536 | 580,5 | 0,02489854 |

Figura 8. Grafico de esfuerzos vs gradientes para la solución de quitosano puro 3%

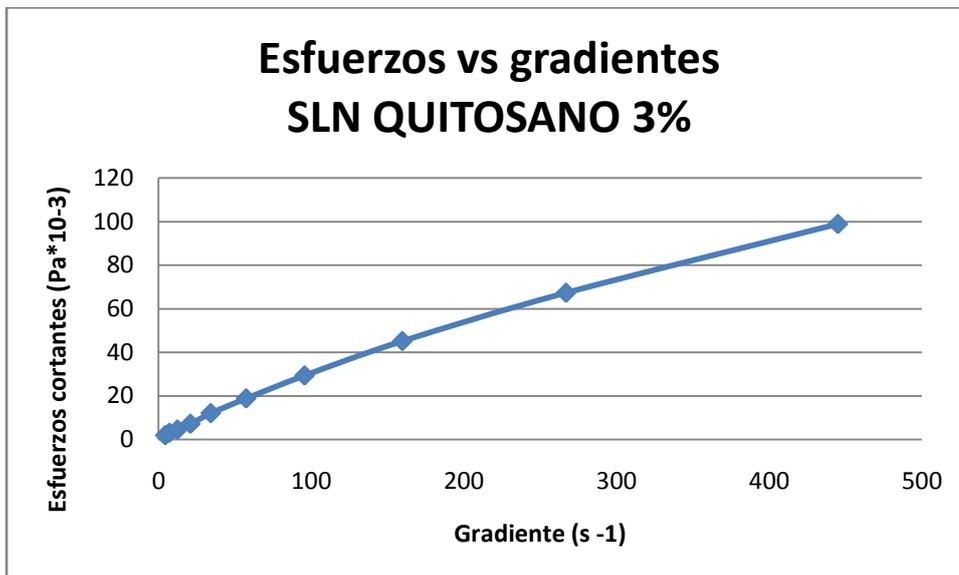


Tabla 4. Valores absolutos de esfuerzos cortantes vs gradiente para la película de quitosano al 3% (p/p)

| VALOR ABS | | Viscosidad |
|-----------|---------|------------|
| tao | D | |
| 1,88 | 4,45 | 0,42247191 |
| 3,008 | 7,12 | 0,42247191 |
| 4,512 | 12,46 | 0,36211878 |
| 7,144 | 20,915 | 0,34157303 |
| 12,032 | 34,265 | 0,35114548 |
| 18,8 | 57,405 | 0,3274976 |
| 29,328 | 95,675 | 0,30653776 |
| 45,12 | 159,755 | 0,28243247 |
| 67,304 | 267 | 0,25207491 |
| 98,888 | 445 | 0,22222022 |

Las graficas de esfuerzo cortante vs gradiente de velocidad sobre distancia, muestran una relación lineal, lo cual significa que las soluciones de quitosano funcionan como fluido newtoniano. Estas pueden ser comparadas con las graficas obtenidas por otros autores en la literatura (Bonilla et al, 2011, Seyed et al, 2010).

CONCLUSIONES

Se obtuvo de manera exitosa la solución de quitosano al 1% (p/p) y al 3% (p/p) con las cuales se logró hacer el proceso de *casting* sobre placas de vidrio y de teflón para obtener las películas de quitosano, que fueron posteriormente utilizadas para evaluar algunas propiedades físicas y mecánicas. A las soluciones de quitosano, se les hizo un agregado de aceite de romero y a otras muestras se les agregó aceite de tomillo obteniendo películas con propiedades más elásticas, maleables, películas más delgadas y con el olor característico del aceite. En estas películas se obtuvieron valores de resistencia al punto de quiebre menores y sucedió lo mismo para los valores de punto de ruptura.

Las soluciones y películas obtenidas tienen gran potencial para uso como empaque para productos alimenticios con la especificidad que debe tener el alimento, en cuanto a que el alimento debe tener una superficie seca para que durante el tiempo de almacenamiento la película (que para el caso sería el empaque del producto) no se logre solubilizar de alguna manera por factores ambientales.

Además de su función como recubrimiento de alimentos, se le realizó a las diferentes películas algunas pruebas organolépticas para lo cual se concluye que debe tenerse una previa evaluación del aceite esencial que se incluya en la película porque el olor y sabor presente en esta, puede alterar de manera considerable la percepción organoléptica total del alimento.

RECOMENDACIONES

- Este polímero obtenido tiene gran capacidad de uso, en múltiples tipos de alimentos, se recomienda seguir la investigación de este material con aceites esenciales de otro tipos que puedan ser mas compatibles con el sabor, olor y aspecto organoléptico general del alimento que vaya a empacar (el aceite de romero y de tomillo es muy compatible para usar con productos cárnicos o pescados, pero afecta mucho en el aspecto final si se usa para frutas o alimentos muy aromáticos).
- En otras investigaciones que fueron consultadas se observa que hay una evaluación de la permeabilidad del agua que tiene la película de quitosano, pero no se encontró que esta propiedad haya sido evaluada para películas de quitosano con aceites esenciales incluidos dentro de su matriz, por lo cual es muy recomendable analizar esta propiedad y revisar si es considerablemente variada por el aceite
- A partir de las diferentes películas de quitosano que se logro obtener se puede hacer un completo estudio de cómo mejoran la conservación y el alargamiento de la vida útil de algún alimento en específico y si el efecto varia entre el almacenar el mismo alimento con la película o secar su superficie y recubrir el alimento por la solución de quitosano.

6. BIBLIOGRAFÍA.

Anthony L. Andrady 2011, Microplastics in the marine environment. Marine Pollution Bulletin, Volume 62, Issue 8, August 2011, Pp. 1596-1605.

Bernkop-Schnürch et al. 2006. Andreas Bernkop-Schnürch, Alexander H. Krauland, Davide Guggi. Thiolated chitosan microparticles: A vehicle for nasal peptide drug delivery. International Journal of Pharmaceutics, Volume 307, Issue 2, 13 January 2006, Pp. 270-277

Beverly et al., 2008 R.L. Beverly, M.E. Janes, W. Prinyawiwatkula and H.K. No, Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*, Food Microbiology 25 (2008), pp. 534–537.

Bonilla et al., 2011. J. Bonilla, L. Atarés, M. Vargas, A. Chiralt. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. Food Hydrocolloids, In Press, Corrected Proof, 13 April 2011.

Bouhidid, S. et al., 2008. Antibacterial and antioxidants activities of *Origanum Compactum* essential oil. African Journal of Biotechnology. 7. No 1, 2008. pp. 1563-1570.

Bozkurt, H., 2006. Hüseyin Bozkurt. Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. Meat Science, Volume 73, Issue 3, July 2006, Pp. 442-450

Burt, 2004 S. Burt, Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review, Int. J. Food Microbiol. 94 (2004), pp. 223–253.

Caner et al, 2007. Hamit Caner, Elvan Yilmaz, Osman Yilmaz. Synthesis, characterization and antibacterial activity of poly(N-vinylimidazole) grafted chitosan Carbohydrate Polymers, Volume 69, Issue 2, 1 (2007), Pp.318-325

Coma et al., 2002 V. Coma, A. Martial-Gros, S. Garreau, A. Copinet, F. Salin and A. Deschamps, Edible antimicrobial film based on chitosan matrix, Journal of Food Science 67 (2002), pp. 1162–1169.

Dimitrijević et al, 2007. Suzana I. Dimitrijević, Katarina R. Mihajlovski, Dušan G. Antonović, Mirjana R. Milanović-Stevanović, Dušan Ž. Mijin. A study of the synergistic antilisterial effects of a sub-lethal dose of lactic acid and essential oils from *Thymus vulgaris* L., *Rosmarinus officinalis* L. and *Origanum vulgare* L. Food Chemistry, Volume 104, Issue 2, 2007, Pp. 774-782

Erkan et al, 2008. Naciye Erkan, Guler Ayranci, Erol Ayranci. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chemistry, Volume 110, Issue 1, 2008, Pp. 76-82

Estévez et al., 2006. Mario Estévez, Ramón Cava. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. *Meat Science*, Volume 72, Issue 2, February 2006, Pp. 348-355.

Estévez et al., 2007. Mario Estévez, Rosario Ramírez, Sonia Ventanas, Ramón Cava. Sage and rosemary essential oils versus BHT for the inhibition of lipid oxidative reactions in liver pâté. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 40, Issue 1, January 2007, Pp. 58-65

Felse y Panda, 2000. Felse P. Arthur, T. Panda. Submerged culture production of chitinase by *Trichoderma harzianum* in stirred tank bioreactors – the influence of agitator speed . *Biochemical Engineering Journal*, Volume 4, Issue 2, January 2000, Pp. 115-120

Fernández-Saiz et al., 2009 P. Fernández-Saiz, J.M. Lagarón and M.J. Ocio, Optimization of the film-forming and storage conditions of chitosan as an antimicrobial agent, *J. Agric. Food Chem.* 57 (8) (2009), pp. 3298–3307.

García et al., 2004. María A. García, Adriana Pinotti, Miriam N. Martino, Noemí E. Zaritzky. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*, Volume 56, Issue 3, 8 July 2004, Pp. 339-345

Gocho et al., 2000 H. Gocho, H. Shimizub, A. Taniokac, T.-J. Chouc and T. Nakajimad, Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan, *Carbohydrate Polymers* 41 (2000), pp. 87–90.

Gontard et al., 1993 N. Gontard, S. Guilbert and J. Cuq, Water and glycerol as plasticizers affect mechanical and water vapor barrier properties of an edible wheat gluten film, *Journal of Food Science* 58 (1993), pp. 206–211.

Han, 2000 J.H. Han, *Antimicrobial Food Packaging*, *Food Technology* 54 (3) (2000), pp. 56–65.

Horvath, G. et al., 2008. Horvath, Gyorgyi. Essential oil composition of three cultivated thymus chemotypes from Hungary. *J. of essential oils Research*. JEOR, 2008. Disponible en: indaarticles.com

Kester y Fennema, 1994. O. Fennema, I.G. Donhowe, J.J. Kester. Lipid type and location of the relative humidity gradient influence on the barrier properties of lipids to water vapor. *Journal of Food Engineering*, Volume 22, Issues 1-4, 1994, Pp. 225-239

Kim et al., 1995 J. Kim, M.R. Marshall and C. Wei, Antibacterial activity of some essential oils components against five foodborne pathogens, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995), pp. 2839–2845.

Kalemba and Kunicka, 2003 D. Kalemba and A. Kunicka, Antibacterial and antifungal properties of essential oils, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003), pp. 813–829.

Li et al., 2009 Fang Tian, Bo Li, Baoping Ji, Jinhua Yang, Guizhi Zhang, Yang Chen, Yangchao Luo Antioxidant and antimicrobial activities of consecutive extracts from *Galla chinensis*: The polarity affects the bioactivities. *Food Chemistry*, Volume 113, Issue 1, 1 March 2009, Pages 173-179

Mathew and Abraham, 2008 S. Mathew and T.E. Abraham, Characterisation of ferulic acid incorporated starch–chitosan blend films, *Food Hydrocolloids* 22 (5) (2008), pp. 826–835.

Martinez N. Alejandro. Aceites esenciales. Universidad de Antioquia, Facultad de química farmaceutica. Medellin. 2003. Pg 34.

Mastelic et al, 2008. J. Mastelić, I. Jerković, I. Blažević, A. Radonić, L. Krstulović. Hydrodistillation–adsorption method for the isolation of water-soluble, non-soluble and high volatile compounds from plant materials. *Talanta*, Volume 76, Issue 4, 15 August 2008, Pp. 885-891

Muzzarelli et al., 2000. Muzzarelli R. A. A., N. Frega, M. Miliani, C. Muzzarelli, M. Cartolari, 2000. Interactions of chitin, chitosan, N-lauryl chitosan and N-dimethylaminopropyl chitosan with olive oil. *Carbohydrate Polymers*, Volume 43, Issue 3, November 2000, Pp. 263-268

Muzzarelli et al., 1988. R. Muzzarelli, V. Baldassarre, F. Conti, P. Ferrara, G. Biagini, G. Gazzanelli, V. Vasi. Biological activity of chitosan: ultrastructural study Original Research Article. *Biomaterials*, Volume 9, Issue 3, May 1988, Pp. 247-252

Ouattara et al., 1997 B. Ouattara, R.E. Simard, R.A. Holley, G.J.-P. Piette and A. Bégin, Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms, *Int. J. Food Microbiol.* 37 (1997), pp. 155–162.

Ouattara et al., 2000 B. Ouattara, R.E. Simard, G.J. Piette-P, A. Bégin and R.A. Holley, Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan, *Int. J. Food Microbiol.* 62 (2000), pp. 139–148.

Perez-Gago et al., 1999 M.B. Perez-Gago, P. Nadaud and J.M. Krochta, Water vapor permeability, solubility and tensile properties of heat-denatured versus native whey protein films, *Journal of Food Science* 64 (1999), pp. 1034–1037.

Perez-Gago and Krochta, 2001 M.B. Perez-Gago and J.M. Krochta, Lipid particle size effect on water vapor permeability and mechanical properties of whey protein/beeswax emulsion films, *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 49 (2001), pp. 996–1002.

Redl et al., 2005. Marion Pommet, Andréas Redl, Stéphane Guilbert, Marie-Hélène Morel. Intrinsic influence of various plasticizers on functional properties and reactivity of wheat gluten thermoplastic materials. *Journal of Cereal Science*, Vol. 42, No 1, (2005), Pp. 81-91

Rojas, M. C. and Brewer M. S. Effect of natural antioxidants on oxidative stability cooked, refrigerated beef and pork. *J. Food Science*. 72. No 4, 2007. pp. 282-288.

Santos et al., 2009 Yuki Shiroasaki, Kanji Tsuru, Satoshi Hayakawa, Akiyoshi Osaka, Maria Ascensão Lopes, José Domingos Santos, Maria Adelina Costa, Maria Helena Fernandes. Physical, chemical and in vitro biological profile of chitosan hybrid membrane as a function of organosiloxane concentration. *Acta Biomaterialia*, Volume 5, Issue 1, January 2009, Pp. 346-355

Seyed et al., 2010. Seyed Mahdi Ojagh, Masoud Rezaei, Seyed Hadi Razavi, Seyed Mohamad Hashem Hosseini. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, Vol 122, Issue 1, 1 September 2010, Pp. 161-166

Shafiur Rahman 2007, M. Manual de conservación de los alimentos. Ed. Acribia. Zaragoza. 2007.

Sivarooban et al, 2008. T. Sivarooban, N.S. Hettiarachchy, M.G. Johnson. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*, Volume 41, Issue 8, October 2008, Pp. 781-785

Stahl-Biskup, E. and Saez, F. Thyme: the genius *Thymus* [online]. CRC Press, 2002. P. 330. Disponible en:
<http://books.google.com/books/about/Thyme.html?id=9jnpVP6fvUIC>

Stachenko, E. et al. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista colombiana de química*. V. 34 No 1, 2005. pp. 43-55.

Vargas et al., 2006 M. Vargas, A. Albors, A. Chiralt and C. González-Martinez, Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan–oleic acid edible coatings, *Postharvest Biology and Technology* 41 (2006), pp. 164–171

Wang et al, 2011. Yang Jiang, Nan Wu, Yu-Jie Fu, Wei Wang, Meng Luo, Chun-Jian Zhao, Yuan-Gang Zu, Xiao-Lei Liu. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, Volume 32, Issue 1, 2011, Pp. 63-68

Yanishlieva et al, 1999. Emma M. Marinova, Nedyalka V. Yanishlieva. Antioxidant activity and mechanism of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. *Food Chemistry*, Volume 81, Issue 2, 2003, Pp. 189-197.