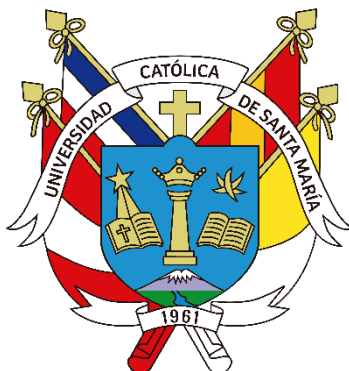


Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



**Elaboración de films activos poliméricos a base almidón de papa nativa y
determinación del efecto de la incorporación del extracto de propóleo verde
en su configuración.**

Tesis presentada por la Bachiller:
Choquetico Iquiapaza, Ivone Yanira
ORCID: 0000-0002-1933-0208

para optar el Título Profesional de Ingeniera Biotecnóloga

Asesor:
Dr. Gómez Valdez, Badhin
ORCID: 0000-0001-6539-1207

Arequipa - Perú
2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

INGENIERIA BIOTECNOLOGICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 03 de Junio del 2023

Dictamen: 003035-C-EPIB-2023

Visto el borrador del expediente 003035, presentado por:

2012242222 - CHOQUETICO IQUIAPAZA IVONE YANIRA

Titulado:

**ELABORAR FILMS ACTIVOS POLIMÉRICOS A BASE ALMIDÓN DE PAPA NATIVA Y DETERMINAR
EL EFECTO DE LA INCORPORACIÓN DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO VERDE EN SU
CONFIGURACIÓN.**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

**43668681 - PAREDES FUENTES JULITZA LINDSEY
DICTAMINADOR**



**45498291 - ALVARADO QUIROZ KENY DAVI
DICTAMINADOR**



**45945764 - YUGRA CONDORI MONICA MEYLIN
DICTAMINADOR**



Elaborar films activos poliméricos a base almidón de papa nativa y determinar el efecto de la incorporación del extracto de propóleo verde en su configuración

INFORME DE ORIGINALIDAD

3%

INDICE DE SIMILITUD

5%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

teses.usp.br

Fuente de Internet

1%

2

ses.library.usyd.edu.au

Fuente de Internet

1%

3

www.degruyter.com

Fuente de Internet

1%

4

es.scribd.com

Fuente de Internet

1%

5

orcid.org

Fuente de Internet

1%

Excluir citas

Apagado

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Apagado

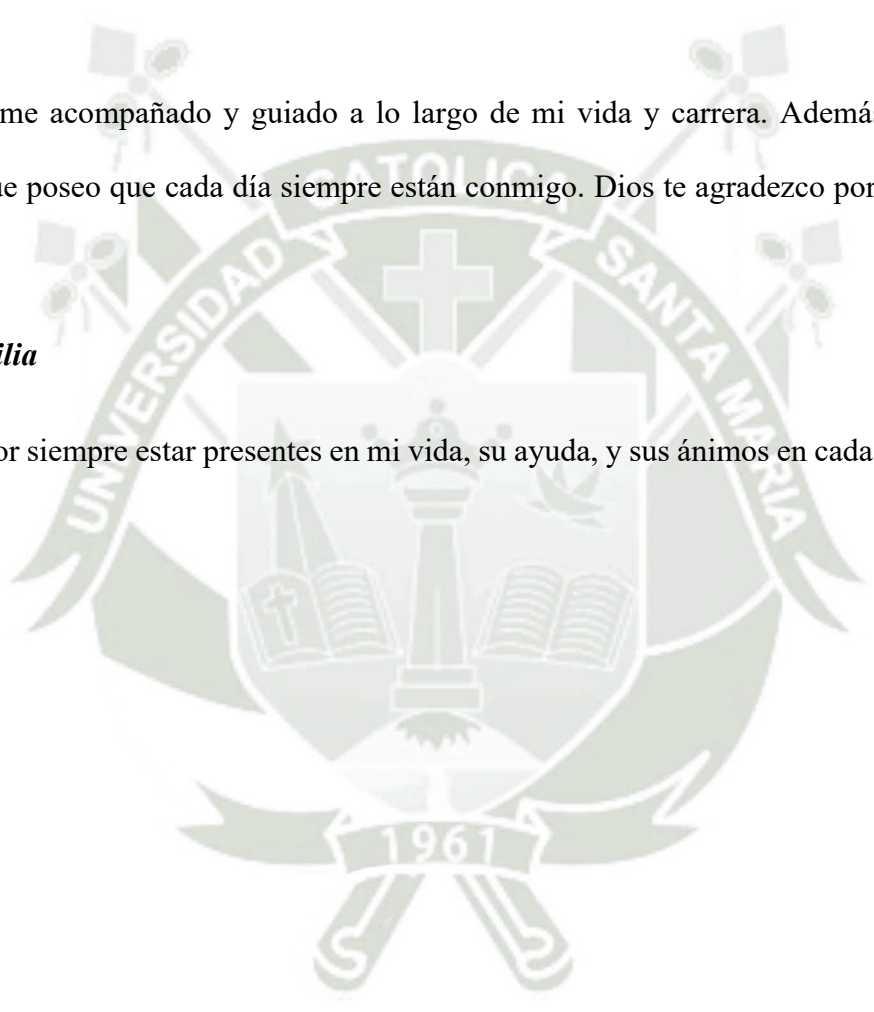
Dedicatoria

A dios

Por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi vida y carrera. Además de darme a la familia que poseo que cada día siempre están conmigo. Dios te agradezco por todo lo que me has dado.

A mi familia

Gracias por siempre estar presentes en mi vida, su ayuda, y sus ánimos en cada reto en mi vida.



Agradecimiento

En primer lugar, quiero dar las gracias a Dios por darme la vida, por su fuerza y sabiduría de enfrentar cada reto en mi vida y cada adversidad. Por siempre acompañarme y cuidarme, muchas gracias Dios.

Quiero agradecer a mis padres por sus enseñanzas y sus palabras de apoyo; a mi mamá por darme el mejor ejemplo de sacrificio, amor y apoyo incondicional; y a mi papá por su ejemplo de superación y por siempre enseñarme a ser valiente. También a mi tío Luis por todo su amor, cariño y por estar siempre conmigo.

Agradezco el financiamiento de la Coordinación de la formación del personal de nivel superior (CAPES) del Ministerio de Educación de Brasil por la beca concedida.

A mi Co-asesora la Dra. Delia Rita Tapia Blácido por todo su apoyo, amistad, consejos, disposición de tiempo para ayudarme siempre, sin ella no habría podido terminar este trabajo de investigación. Muchas gracias profesora por ser un ejemplo de investigadora, profesora y ser humano.

A mi asesor el Dr. Badhin Gómez Valdez por su apoyo y tiempo brindado para el término de mi tesis.

A la Ing. Jhenifer Peralta Medrano y al Mg. Denis Janse Lemos Costa por ayudarme en toda la parte de investigación y haberme cedido las muestras de almidón de papa nativa y propolis verde.

A mis amigos del laboratorio de Biopolímeros Agroindustriales –FFCLRP, por siempre estar dispuestos a ayudarme y a compartir mi día a día. A Guilherme José Aguilar por su compañerismo y apoyo durante los experimentos y enseñanzas.

A mis queridos amigos por todo su apoyo constante a lo largo de mi carrera universitaria,
gracias por siempre ser mis personas favoritas.



RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la incorporación de extracto de propóleo verde (EAP) en la caracterización y elaboración de films activos a partir de almidón de papa nativa *Yana Winku*. Este estudio fue realizado en el laboratorio de Biopolímeros Agroindustriales del Departamento de Química de la Universidad de São Paulo. El EAP se obtuvo con 10 g de propóleo molido en 50 mL de solución de NaOH al 15% de concentración alcalina. Los films se prepararon usando una concentración de almidón nativo de 3 p/v, glicerol (35 g de plastificante / 100 g de almidón) y diferentes concentraciones de EAP (0, 0.5, 10 y 30% en relación al almidón), utilizando la metodología de *Casting*. Fue usado un diseño experimental completamente al azar (DCA), con un análisis de varianza para comparación de medias de TUKEY para establecer diferencias significativas en las formulaciones de los films. Los films se acondicionaron por 48 horas antes de su caracterización (UR = 58%, 25 °C). Los films fueron caracterizados en relación a las propiedades mecánicas, de barrera al vapor de agua, humedad, solubilidad en agua y etanol, ángulo de contacto, propiedades antioxidantes (ABTS y DDPH) y compuestos fenólicos (Folin Ciocalteu). Todos los films obtenidos fueron atractivos, homogéneos, con ligero brillo, fáciles de manejar y con ausencia de partículas insolubles observadas visualmente. La incorporación de EAP provocó un aumento en la opacidad, un viraje de color a un naranja profundo, menor humedad, una superficie más hidrofóbica debido a la presencia de moléculas hidrofóbicas presentes en el extracto; así como una reducción en la tensión y elongación del material a concentraciones de 10 y 30% EAP. En tanto, las propiedades de PVA y solubilidad en agua (con excepción film de 10% de EAP) no fueron afectadas por la incorporación del extracto. Con la adición del EAP a la matriz polimérica se logró obtener films activos debido al aumento de compuestos fenólicos totales y antioxidantes, este aumento estuvo en función a la concentración utilizada de EAP. Se concluyó que la adición de 10% de EAP mejoró las características de opacidad, solubilidad en agua, solubilidad en etanol, humedad y ángulo de contacto del film de almidón *Yana Winku*, añadiéndole características activas al film con valores de compuestos fenólicos totales (CFT) de 336.13 mg GAE/ 100g film, actividad antioxidante de 79.23 % inhibición del radical de DPPH. y 11496.00 $\mu\text{mol TE}/100\text{g film}$ por ABTS; posicionándose como opción viable en la conservación de alimentos susceptibles a la oxidación.

Palabras claves: films bioactivos, almidón nativo, extracto acuoso de propóleo.

ABSTRACT

The aim of this research was to evaluate the effect of the incorporation of green propolis extract (EAP) in the characterization and elaboration of active films from *Yana Winku* native potato starch. This study was carried out in the Agroindustrial Biopolymers laboratory of the Chemistry Department of the University of São Paulo. EAP was obtained with 10 g of ground propolis in 50 mL of NaOH solution at 15% alkaline concentration. The films were prepared using a native starch concentration of 3 w/v, glycerol (35 g of plasticizer / 100 g of starch) and different concentrations of EAP (0, 0.5, 10 and 30% in relation to starch), using the *Casting* methodology. A completely randomized experimental design (CRD) was used, with an analysis of variance for comparison of means by TUKEY to establish significant differences in the film formulations. The films were conditioned for 48 hours prior to characterization (UR = 58%, 25 °C). The films were characterized with respect to mechanical properties, water vapor barrier, moisture, water and ethanol solubility, contact angle, antioxidant properties (ABTS and DDPH) and phenolic compounds (Folin Ciocalteu). All films obtained were attractive, homogeneous, with slight gloss, easy to handle and with absence of visually observed insoluble particles. The incorporation of EAP caused an increase in opacity, a color change to a deep orange, lower moisture, a more hydrophobic surface due to the presence of hydrophobic molecules present in the extract; as well as a reduction in the tension and elongation of the material at concentrations of 10 and 30% EAP. Meanwhile, the PVA properties and water solubility (with the exception of 10% EAP film) were not affected by the incorporation of the extract. The addition of EAP to the polymeric matrix resulted in active films due to the increase of total phenolic compounds and antioxidants, this increase was a function of the concentration of EAP used. Conclusions were reached that the addition of 10% EAP improved the characteristics of water solubility, ethanol solubility, moisture and contact angle of the starch film, adding active characteristics to the film with total phenolic compounds (CFT) values of 336.13 mg GAE/ 100g film, antioxidant activity of 79.23 % DPPH radical inhibition and 11496.00 $\mu\text{mol TE}/100\text{g film}$ by ABTS; positioning it as a viable option in the preservation of foods susceptible to oxidation.

Keywords: bioactive films, native starch, propolis aqueous extract.

ÍNDICE

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	3
OBJETIVOS	4
OBJETIVO GENERAL	4
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	5
1.1 PAPAS NATIVAS	6
1.1.1 <i>Papa nativa Yana Winku</i>	8
1.2 ALMIDÓN.....	10
1.2.1 <i>Almidón de papa</i>	13
1.3 PROPÓLEO	15
1.3.1 <i>Propóleo verde</i>	18
1.4 FILMES BIODEGRADABLES	21
1.4.1 <i>Films de almidón</i>	23
1.5 FILMES ACTIVOS	27
1.5.1 <i>Films con actividad antimicrobiana</i>	30
1.5.2 <i>Films con actividad antioxidante</i>	31
1.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS FILMS	32
1.6.1 <i>Propiedades de barrera</i>	32
1.6.2 <i>Propiedades microestructurales</i>	32
1.6.3 <i>Propiedades ópticas</i>	33
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS	34
2.1 LUGAR DE EJECUCIÓN.....	35
2.2 MATERIALES	35
2.2.1 <i>Muestras y/o unidades biológicas</i>	35
2.2.2 <i>Material de laboratorio</i>	36

2.3	MÉTODOS	38
2.3.1	<i>Extracto acuoso de propóleo (EAP)</i>	38
2.3.2	<i>Elaboración de los films</i>	39
2.3.3	<i>Caracterización de los films</i>	40
2.4	DISEÑO EXPERIMENTAL	50
2.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	53
CAPÍTULO III	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	54
3.1	CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS	55
3.1.1	<i>Aspecto visual y opacidad de los films</i>	55
3.1.2	<i>Espesor de los films</i>	56
3.1.3	<i>Propiedades mecánicas de los films</i>	57
3.1.4	<i>Humedad y PVA de los films</i>	58
3.1.5	<i>Solubilidad de los Films</i>	60
3.1.6	<i>Ángulo de contacto de los Films</i>	62
3.1.7	<i>Compuestos bioactivos</i>	63
CONCLUSIONES		66
RECOMENDACIONES		67
REFERENCIAS		68
ANEXOS		92

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA - Actividad antioxidante.

ABTS - Radical, (ácido 2,2-azinobis- [ácido 3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico]).

ANOVA - Análisis de varianza.

ASTM - Sociedad Americana para Pruebas y Materiales.

BHA – Butilhidroxianisol.

BHT – Butilhidroxitolueno.

CFT - Compuestos fenólicos totales.

DPPH - Abreviatura de compuesto químico orgánico 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl

E – Elongación (%).

EAP – extracto acuoso de propóleo verde.

EEP – extracto etanólico de propóleo.

GAE – Acido gálico

IUPAC - La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

MPa – Megapascal.

MY – Módulo de Young.

PR – Propóleo.

PVA: Permeabilidad al vapor de agua.

TE – Trolox (antioxidante sintético).

TS – Tensión de Ruptura.

Tgel - temperatura de gelatinización

TPS – Termoplástico.

UR - Humidad relativa.

NaBr – Bromuro de sodio.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Descripción morfológica.....	9
Tabla N° 2. Evaluación agronómica.....	10
Tabla N° 3. Funciones de los almidones en varios sistemas alimentarios.	12
Tabla N° 4. Características de diferencias almidones comerciales.	15
Tabla N° 5. Composición química del propóleo del grupo 12 (G 12) y <i>B. dracunculifolia</i> . ..	20
Tabla N° 6. Avances recientes en films comestibles que contienen compuestos antioxidantes y antimicrobianos.	29
Tabla N° 7. Características del almidón de papa <i>Yana winku</i>	35
Tabla N° 8. Formulación de los films a base de almidón de papa nativa y extracto acuosos de Propóleos.	40
Tabla N° 9: Espesor en films a base de almidón y EAP.	57
Tabla N° 10. Las propiedades mecánicas de los films con almidón y EAP (Tensión, Alargamiento y Módulo de Young).	58
Tabla N° 11. Humedad y la permeabilidad al vapor de agua (PVA) en films a base de almidón nativo y EAP.	60
Tabla N° 12. Solubilidad en agua y etanol al 70% en films a base de almidón nativo y extracto acuosos de propóleos.....	62
Tabla N° 13. Ángulo de contacto en films a base de almidón nativo y extracto acuosos de propóleos.	63
Tabla N° 14. Compuestos fenólicos totales de los films.	64
Tabla N° 15. Actividad antioxidante de los films	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Papas nativas de los andes centrales del Perú.	6
Figura N° 2. Principales ácidos fenólicos en papas.....	7
Figura N° 3. Estructura de las principales agliconas de antocianinas de patatas.	8
Figura N° 4. Fotografías de la planta de papa <i>Yana Winku</i> (A) y papa <i>Yana Winku</i> (B).	9
Figura N° 5. Estructuras químicas de las macromoléculas de amilosa (A) y amilopectina (B) del almidón.	11
Figura N° 6. Diagrama de difracción de rayos X de almidones de diferentes tipos de patrones de cristalinidad.	13
Figura N° 7. Micrografías electrónicas de barrido de almidones de diferentes fuentes (bar = 10µm).	14
Figura N° 8. Colecta de la resina por parte de las abejas para la fabricación de propóleo.	16
Figura N° 9. Fotografías de abejas recolectando hojas de <i>Baccharis dracunculifolia</i> para traerlas de regreso a su nido como propóleo.	18
Figura N° 10. Estructuras de compuestos fenólicos aislados de propóleo verde. (A) 2,2-dimetil-8-prenilcromo; (B) ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinámico (artepilina C); (C) éster alílico del ácido 3-prenilcinámico; (D) kaempferide; (E) propóleo benzofurano A.	20
Figura N° 11. Ciclo de vida de los materiales de envasado a partir de biopolímeros.	21
Figura N° 12. Film a base de almidón de yuca.	22
Figura N° 13. Esquema ilustrativo de la ruptura de los gránulos de almidón con la temperatura de gelatinización.....	24
Figura N° 14. Número de artículos (2015-2020) que se encuentran en la base de datos de Web of Science para los siguientes métodos de producción de envases de almidón: <i>Casting</i> , Moldeo y Extrusión.	25
Figura N° 15. Incorporación de compuestos activos en sistemas de envasado de alimentos. (A) Formulación del producto, (B) revestimiento y (C) films biodegradables.	28
Figura N° 16. Apariencia visual y microscopia de barrido por SEM del almidón de papa nativa <i>Yana Winku</i>	36
Figura N° 17. Muestra de propóleo verde que se utilizara en la investigación.	36
Figura N° 18. Extracto acuoso de propóleo.....	39
Figura N° 19. Muestra para prueba de tracción.....	42
Figura N° 20. Muestra de film almidón fijada en agarres del texturómetro lista para ejecutar la prueba mecánica de acuerdo con el método estándar ASTM D882-95.	42

Figura N° 21. Esquema del medio utilizado para determinar la permeabilidad al vapor de agua de PVA.	43
Figura N° 22. Prueba de PVA con el método estándar AS96 E96-95 a los films: (A) Almidón-0% EAP y (B) Almidón-10% EAP.	44
Figura N° 23. Esquema ilustrativo del ángulo de contacto formado por la gota depositada sobre la superficie del film.....	45
Figura N° 24. Determinación del ángulo de contacto en films de almidón nativo y extracto de propóleo al 0.5%.	46
Figura N° 25. Extracto de los films: (A) Almidón-0% EAP, (B) Almidón-0.5% EAP, (C) Almidón-10% EAP y (D) Almidón-30% EAP.	46
Figura N° 26. Generación de ion fenolato por el método de Folin-Ciocalteu, (A) y la reducción de los compuestos de Molibdeno y Wolframio por el ion fenolato, (B).....	47
Figura N° 27. Mecanismo de reacción para el ensayo ABTS.	48
Figura N° 28. Mecanismo de acción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH).....	50
Figura N° 29. Esquema experimental general de la investigación.....	52
Figura N° 30. Aspecto visual y opacidad de los films, A) Almidón-0% EAP, B) Almidón-0.5% EAP, C) Almidón-10% EAP y D) Almidón-30% EAP. Opacidad se expresó en A600/mm. .	56

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación N° 1. Determinación de la opacidad del film.	40
Ecuación N° 2. Contenido de humedad.....	41
Ecuación N° 3. Permeabilidad de vapor de agua.	43
Ecuación N° 4. Solubilidad del film en agua.	44
Ecuación N° 5. Solubilidad del film en etanol al 70%.....	45
Ecuación N° 6. Determinación de DPPH en porcentaje.	50



ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1. Curva estándar para la cuantificación de compuestos fenólicos expresados en ácido gálico.	92
ANEXO N° 2. Curva estándar para la cuantificación de actividad antioxidante por el método ABTS expresado en Trolox.	92
ANEXO N° 3. ANOVA para la opacidad, realizado por statgraphics.	92
ANEXO N° 4. Prueba de Tukey para la opacidad, realizado por statgraphics.	93
ANEXO N° 5. ANOVA para el espesor, realizado por statgraphics.	93
ANEXO N° 6. Prueba de Tukey para el espesor, realizado por statgraphics.	93
ANEXO N° 7. ANOVA para tensión de rotura, realizado por statgraphics.	94
ANEXO N° 8. Prueba de Tukey para la tensión de rotura, realizado por statgraphics.	94
ANEXO N° 9: ANOVA para la elongación, realizado por statgraphics.	95
ANEXO N° 10: Prueba de Tukey para la elongación, realizado por statgraphics.	95
ANEXO N° 11. ANOVA para el Módulo de Young, realizado por statgraphics.	96
ANEXO N° 12. Prueba de Tukey para el Módulo de Young, realizado por statgraphics.	96
ANEXO N° 13. ANOVA para humedad, realizado por statgraphics.	96
ANEXO N° 14. Prueba de Tukey para humedad, realizado por statgraphics.	97
ANEXO N° 15. ANOVA para PVA, realizado por statgraphics.	97
ANEXO N° 16. Prueba de Tukey para PVA, realizado por statgraphics.	97
ANEXO N° 17. ANOVA para solubilidad en agua, realizado por statgraphics.	98
ANEXO N° 18. Prueba de Tukey para solubilidad en agua, realizado por statgraphics.	98
ANEXO N° 19. ANOVA para solubilidad en etanol, realizado por statgraphics.	99
ANEXO N° 20. Prueba de Tukey para solubilidad en etanol, realizado por statgraphics.	99
ANEXO N° 21. ANOVA para ángulo de contacto, realizado por statgraphics.	99
ANEXO N° 22. Prueba de Tukey para ángulo de contacto, realizado por statgraphics.	100
ANEXO N° 23. ANOVA para compuestos fenolicos realizado por statgraphics.	100
ANEXO N° 24. Prueba de Tukey para compuestos fenolicos, realizado por statgraphics.	100
ANEXO N° 25. ANOVA para actividad antioxidante por el metodo de DPPH, realizado por statgraphics.	101
ANEXO N° 26. Prueba de Tukey para actividad antioxidante por el metodo de DPPH, realizado por statgraphics.	101
ANEXO N° 27. ANOVA para actividad antioxidante por el metodo ABTS, realizado por statgraphics.	102

ANEXO N° 28. Prueba de Tukey para actividad antioxidante por el metodo de ABTS, realizado por statgraphics. 102



INTRODUCCIÓN

Los plásticos son un material versátil e indispensable en la economía global. Su popularidad se atribuye a las grandes ventajas que ofrece (ligero, duradero, moldeable, bioinerte, hidrófobo y económico) (1,2). Solo en el 2018 su producción mundial fue de alrededor de 360 millones de toneladas, siendo las poliolefinas los materiales más demandados (3). Estos plásticos sintéticos se fabrican a partir de petróleo, una fuente no renovable y con resistencia a la degradación natural que puede demorar hasta 500 años para su degradación completa (4,5). La elevada producción de plástico ha llevado a una descomunal cantidad de residuo que llega a terminar en los océanos, se estima a la actualidad más de más de 150 millones de toneladas de desechos plásticos en los océanos (6,7). Representando una gran amenaza para los ecosistemas oceánicos y las cadenas alimentarias.

En los últimos años hay un creciente interés en el desarrollo de envases biodegradables y activos, elaborados a través de materias primas renovables y sustentables que ofrezcan propiedades antimicrobianas y antioxidantes para alargar la vida en anaquel de productos alimenticios y reducir el uso de conservantes químicos (8). Los films pueden ser elaborados a partir de biopolímeros (polisacáridos, proteínas y lípidos) con la adición de aditivos (plastificantes, emulsionantes) e ingredientes antimicrobianos y antioxidantes naturales o sintéticos (9–11).

El almidón es una materia prima muy utilizada para la elaboración de films biodegradables dado que ofrece una serie de ventajas que incluyen facilidad de manejo, bajo costo, disponibilidad, fuente renovable, transparencia, sin sabor, inodoro, sin toxicidad y buenas propiedades de barrera (12–15). Sin embargo, su aplicabilidad es limitada por su alta solubilidad en agua y malas propiedades mecánicas (16–20). Para superar estas deficiencias y obtener propiedades funcionales, se puede combinar el almidón con otros polímeros y extractos naturales (21).

El propóleo tiene un alto potencial para actuar como aditivo en materiales poliméricos (22). Es un material resinoso recolectado por las abejas (*Apis Mellifera*

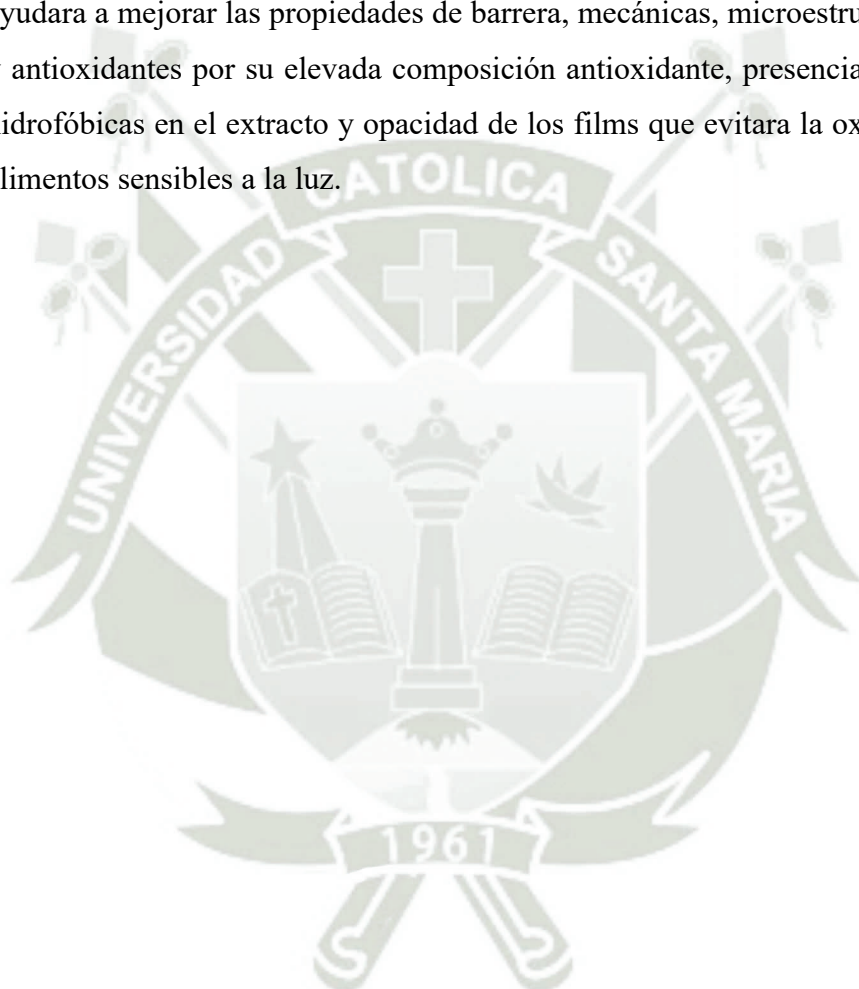
L.); su composición química, color y propiedades depende del tipo de planta, las resinas y las especies de abejas. Por lo que es un producto que puede variar en composición según la fuente de origen (23–25). Ha logrado un renombre mundial por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y medicinales (antivirales, antiinflamatorias, antitumorales, hepatoprotectores e inmunomoduladores) (26,27).

Esta investigación tiene como objetivo evaluar el efecto de la incorporación de extracto de propóleo verde en la caracterización y elaboración de films activos a partir de almidón de papa nativa *Yana Winku*.



HIPÓTESIS

La hipótesis considerada se basa en que el almidón de papa nativa *Yana Winku* posee compuestos fenólicos y capacidad antioxidante a diferencia de otros almidones por lo cual su incorporación les otorgara tales propiedades a los films. Así mismo, la adición de un antioxidante natural como el extracto de propóleo verde ayudara a mejorar las propiedades de barrera, mecánicas, microestructural, ópticas y antioxidantes por su elevada composición antioxidante, presencia de moléculas hidrofóbicas en el extracto y opacidad de los films que evitara la oxidación de los alimentos sensibles a la luz.



OBJETIVOS

Objetivo general

Esta investigación tiene como objetivo utilizar el almidón de papa nativa *Yana Winku* para el desarrollo de films activos y mejorar sus propiedades de barrera, mecánicas, microestructural, ópticas y antioxidantes con la incorporación del extracto de propóleo verde.

Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la adición de diferentes concentraciones del extracto de propóleo verde en las propiedades de barrera, mecánicas, microestructural, ópticas y antioxidantes de los films a base de almidón.
2. Desarrollar films a base de almidón/extracto de propóleo verde.
3. Caracterizar las propiedades de barrera, mecánicas, microestructural, ópticas y antioxidante del film a base de almidón de papa nativa *Yana Winku*.
4. Comparar los films de almidón con almidón/ extracto de propóleo verde.



CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Papas nativas

La papa es originaria de América del sur, donde los incas cultivaban y consumían hace unos 13,000 años. La historia de la papa en Europa y otras partes del mundo inicio después del descubrimiento de América, grandes cantidades de oro y papa fueron llevadas en la época de la conquista del Perú (28). En el 2016, el área de cultivo de la papa en nuestro país fue de 69,500 ha; donde más de 600 mil hogares dependían de su producción para sustentar su economía, con un rendimiento medio de 28,777 Kg/ ha y una producción total de 2 millones de toneladas (29).



Figura N° 1. Papas nativas de los andes centrales del Perú.

** Adaptado de Haan & Rodriguez (29).*

Según el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), el Perú posee 6,408 registros de variedades de papas nativas (30). Por ende, existe una amplia diversidad genética que permite encontrar individuos con diferentes tipos de ploidía (diploides a pentaploides) que se manifiesta en el fenotipo a través de las diferencias en la forma y tamaño del tubérculo, color de la pulpa y / o piel, ciclo de cultivo, productividad, contenido nutricional y funcional (31). Los datos publicados sobre

el grado de variación con respecto a los contenidos de antioxidantes y minerales dentro del germoplasma de papa nativa son escasos debido a que solo existe estudios con números limitados de genotipos de papa (32,33).

Las papas nativas han despertado el interés de parte de los consumidores y la industria por su riqueza en compuestos fenólicos entre ellos destaca: el ácido cafeico (280 mg / kg), escopolina (98 mg / kg), ácido clorogénico (16-71 mg / kg), ácido ferúlico (28 mg / kg), ácido criptoclorogénico (11 mg / kg) y la tirosina (770-3900 mg / kg) (34,35). Campos et al. (32), realizó la caracterización de 15 genotipos de papas nativas obtenidas de los campos experimentales del CIP en Huancayo (3700-3800 m); donde reportó la cantidad de compuestos fenólicos totales (0.64 a 2.32 mg g⁻¹), antocianinas totales (0.08 a 0.8 mg g⁻¹), carotenoides totales (2 a 5 µg g⁻¹), capacidad antioxidante hidrofílica (860 a 3780 µg Trolox g⁻¹) y capacidad antioxidante lipofílica (115 a 361 µg Trolox g⁻¹). A partir de estos resultados, destaca su potencial como una nueva fuente de nutraceuticos y para la producción de nuevos y únicos productos (funcionales y saludables).

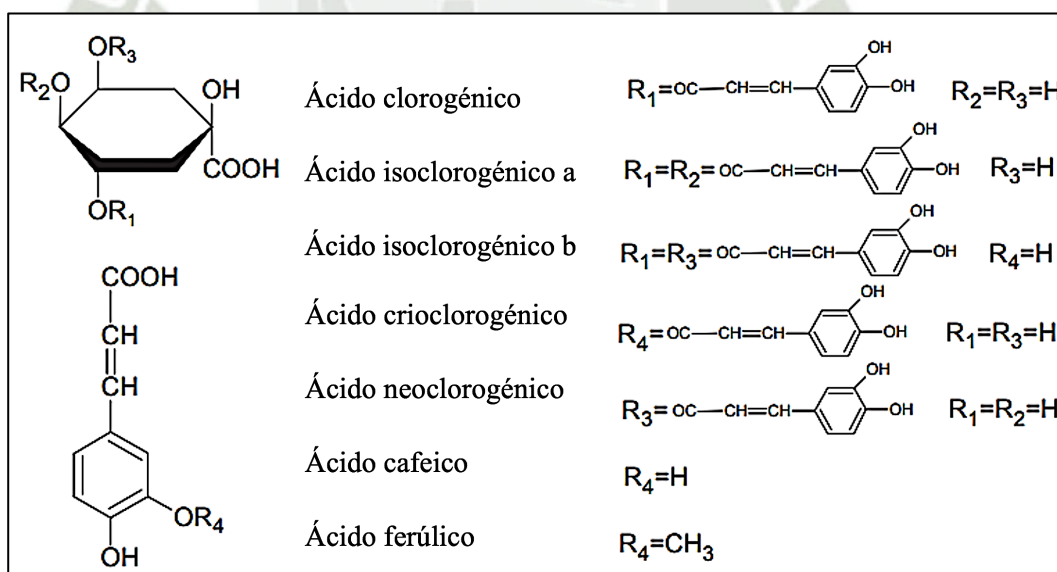


Figura N° 2. Principales ácidos fenólicos en papas.

* Adaptado de Jaromír et al. (35).

Las papas nativas que poseen una coloración morada o roja en la pulpa poseen un alto contenido de antocianina, en particular los derivados acilados. Estas papas nativas pueden poseer tres veces más de contenido fenólico y actividad

antioxidantes comparado con las papas nativas de pulpa blanca y amarilla. Mientras tanto las papas de coloración blanca y amarilla poseen principalmente ácido clorogénico, ácido gálico, ácido cafeico y catequina (36–38). En tanto, las papas de pulpa moradas y roja contienen acilados de pelargonidina, glucósidos acilados de malvidina, petunidina, peonidina y delfinidina (38,39).

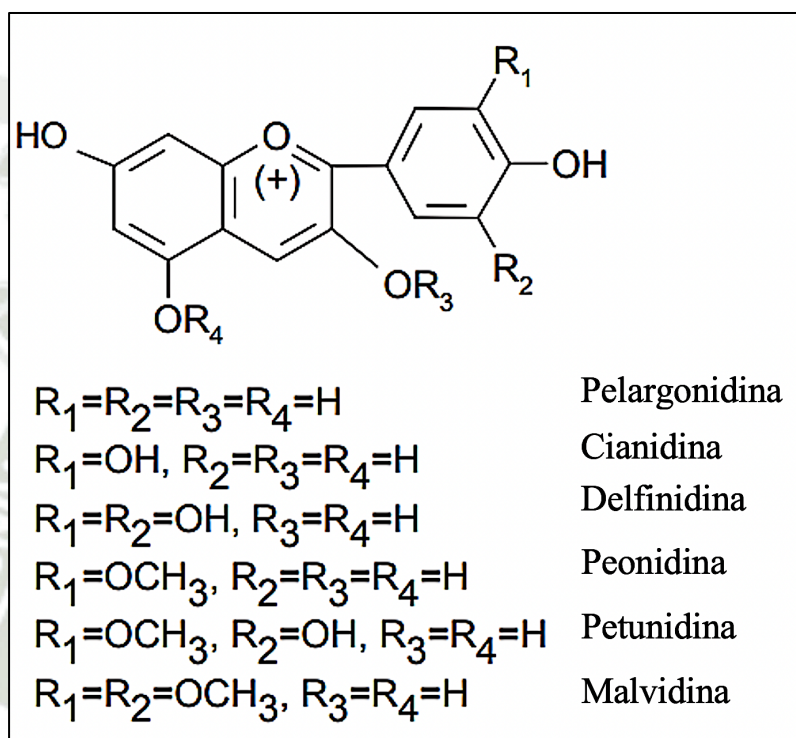


Figura N° 3. Estructura de las principales agliconas de antocianinas de papas.

**Adaptado de Lachman et al. (38).*

1.1.1 Papa nativa *Yana Winku*

La papa nativa *Yana Winku* o llamada también Wencos, Cacho de Toro, Papa Pilush o Yana Waqras (subespecie *Andigena*); tiene como origen la provincia de Tayacaja de la región Huancavelica. Su cultivo alcanza una altitud de hasta 4,200 metros sobre el nivel del mar, la textura de la papa es harinosa y posee una coloración morada en la pulpa (40,41).

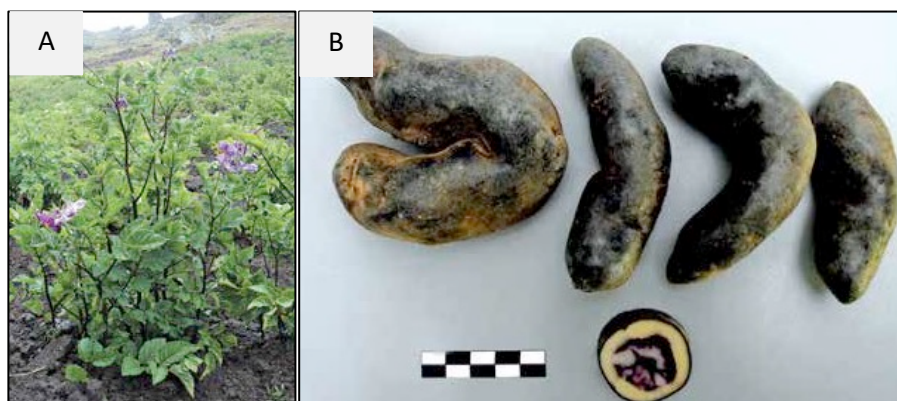


Figura N° 4. Fotografías de la planta de papa *Yana Winku* (A) y papa *Yana Winku* (B).

* Adaptado del Ministerio de Agricultura del Perú (42).

Tabla N° 1. Descripción morfológica.

Descripción Morfológica	
Hábito de crecimiento	Semi-erecto
Color del tallo	Verde con muchas manchas pigmentadas
Forma de las alas del tallo	Recto
Tipo de disección de la hoja	Disectada
Numero de pares de foliolos laterales	4
Forma del foliolo terminal	Elíptico
Forma de la corola	Muy rotada
Color predominante de la flor	Blanco
Intensidad del color predominante en la flor	Pálido
Color secundario de la flor	Ausente
Distribución del color secundario de la flor	Negruzco
Color predominante de la piel del tubérculo	Intermedio
Intensidad del color predominante de la piel del tubérculo	Ausente
Distribución del color de la piel del tubérculo	Ausente
Color principal de la pulpa	Morado
Color secundario de la pulpa	Blanco
Distribución del color secundario de la pulpa	Pocas manchas

Forma general del tubérculo	Elíptico
Variante de la forma del tubérculo	Fusiforme
Profundidad de los ojos	Superficial
Color predominante del brote	Violeta
Color secundario del brote	Ausente
Distribución del color secundario del brote	Ausente

* Adaptado de Roldan et al. (41).

Tabla N° 2. Evaluación agronómica.

Evaluación agronómica

Numero promedio de tubérculo/planta	9
Peso promedio de tubérculo (Kg)/planta	0.10

* Adaptado de Roldan et al. (41).

1.2 Almidón

El almidón es un polisacárido de reserva en el reino vegetal que se deposita en los cloroplastos, se clasifica como homopolisacárido, su unidad básica es la glucosa, el peso molecular varía entre 10^6 - 10^8 unidades y está compuesta por dos macromoléculas (amilosa y amilopectina). Su proporción de amilosa / amilopectina depende de la fuente y la edad del almidón. La amilosa es esencialmente un polímero lineal, ligado a α -1,4 (~ 99%) que contiene puntos de ramificación α -1,6- (~ 1%) que contribuyen principalmente a la fase amorfa del gránulo de almidón (43). Por el contrario, la amilopectina es una estructura altamente ramificada que contiene enlaces α -1, 4 unidas al α -1, 6 con puntos de ramificación cada 20-30 unidades de glucosa. La amilopectina contribuye predominantemente a la organización cristalina periférica de los gránulos de almidón.

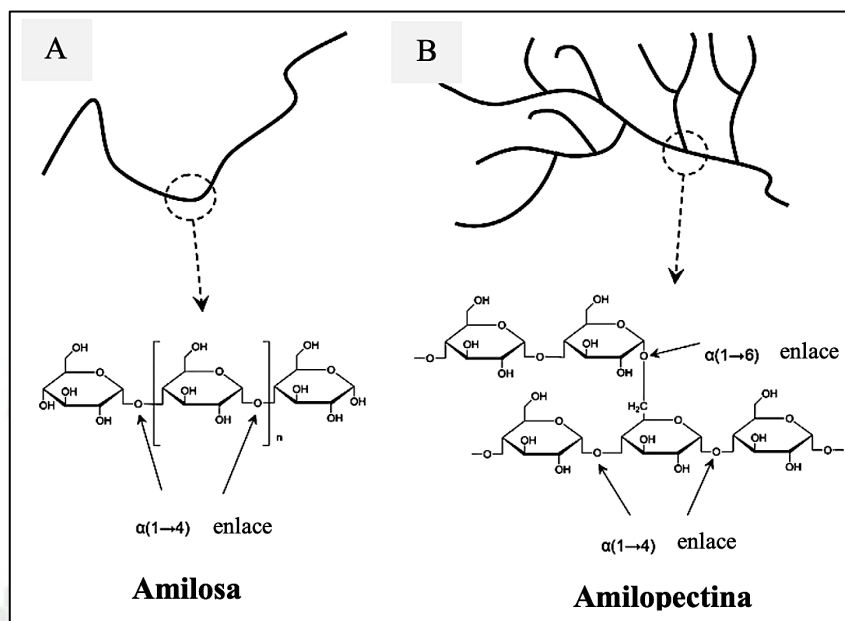


Figura N° 5. Estructuras químicas de las macromoléculas de amilosa (A) y amilopectina (B) del almidón.

* Adaptado de Xie et al. (18).

Se denomina almidón "normal" a los que poseen un contenido de amilosa de 25-30%. Mientras que los que poseen un contenido de amilopectina de 98-99%, se les denomina almidón "ceroso" (44). La presencia de regiones amorfas y cristalinas en los gránulos de almidón, le concede una entidad semicristalina. Mediante la técnica de difracción de rayos X, se puede determinar los patrones específicos de cristalinidad en los gránulos de almidón. Estos patrones se utilizan para diferenciar almidones de cereales y tubérculos (45,46). Todas las características como la forma y tamaño, relación amilosa / amilopectina, longitud de la cadena distribución y disposición de componentes están involucrados en la funcionalidad del biopolímero (44,47).

El almidón nativo se denomina cuando se extrae de la planta sin alteración. McComber et al. (48) sugiere que los almidones nativos, seleccionados de cultivares adecuados pueden tener el potencial de reemplazar a los almidones químicamente modificados. Los gránulos de almidón se encuentran principalmente en semillas, raíces y tubérculos, pero igualmente son encontrados en tallos, hojas, frutos e incluso en el polen (49,50). Sin embargo las principales fuentes comerciales de almidón son los cereales (maíz) y los tubérculos- raíces (papa y la yuca) (51).

Las técnicas de extracción de almidón presentes en la literatura son diversas desde una simple extracción con agua pura hasta el uso de diferentes reactivos químicos. Según su contenido de proteínas, lípidos, fibras y cenizas se evalúa la calidad de la extracción del almidón. Cuanto menor es el contenido de estos componentes, mayor será la calidad del proceso de extracción. Una extracción con agua significa la máxima conservación del granulado de almidón y de sus propiedades funcionales; aunque este método de extracción provoca un mayor contenido de proteínas y lípidos (52).

El almidón es utilizado en diferentes industrias (textil, papelera, farmacéutica, plástica y alimentaria) por sus funciones y aplicaciones. El mercado de este polímero ha ido en alza. Es una fuente de ingreso para muchos agricultores y se encuentra en constante mejora para lograr satisfacer las demandas del mercado actual (53,54).

Tabla N° 3. Funciones de los almidones en varios sistemas alimentarios.

Función	Alimentos
Adhesión	Alimentos rebozados y empanizados
Unión	Carne formada, condimentos para bocadillos.
Enturbiamiento	Bebidas.
Crujiente	Alimentos fritos y horneados, bocadillos.
Estabilización de emulsión	Bebidas, cremas
Encapsulamiento	Sabores.
Expansión	Snacks, cereales
Reemplazo de grasa	helados, aderezos para ensaladas, pastas para untar.
Estabilización de espuma	Malvaviscos
Gelificación	Centros de goma de mascar
Retención de humedad	Pasteles, carnes
Espesamiento	Salsas, rellenos para tartas, sopas

* Adaptado de Mason (55).

1.2.1 Almidón de papa

En los tubérculos de papa, el almidón representa aproximadamente el 15-20% de su peso. Posee una baja cantidad de proteínas y lípidos, en comparación a los almidones extraído de cereales (56–58). La amilopectina de la papa es menos ramificada que la de otros almidones y posee cadenas más largas que pueden estar relacionadas al perfil de cristalinidad de tipo B, donde se encuentra por difracción de rayos x, un pico más fuerte a 17° , algunos picos medios a 5.6° , 14.4° , 22° y 24° y un pico débil a 19.5° (59–65).

La digestibilidad también puede estar influenciada por el tipo de estructura cristalina de los gránulos de almidón. El patrón tipo A, característico de almidones de cereales son altamente digestibles; mientras que el patrón tipo B presente en tubérculos son más resistentes a la digestión. En cambio, el patrón tipo C presente en semillas de leguminosas son algo resistentes a la hidrólisis por α -amilasa (66,67).

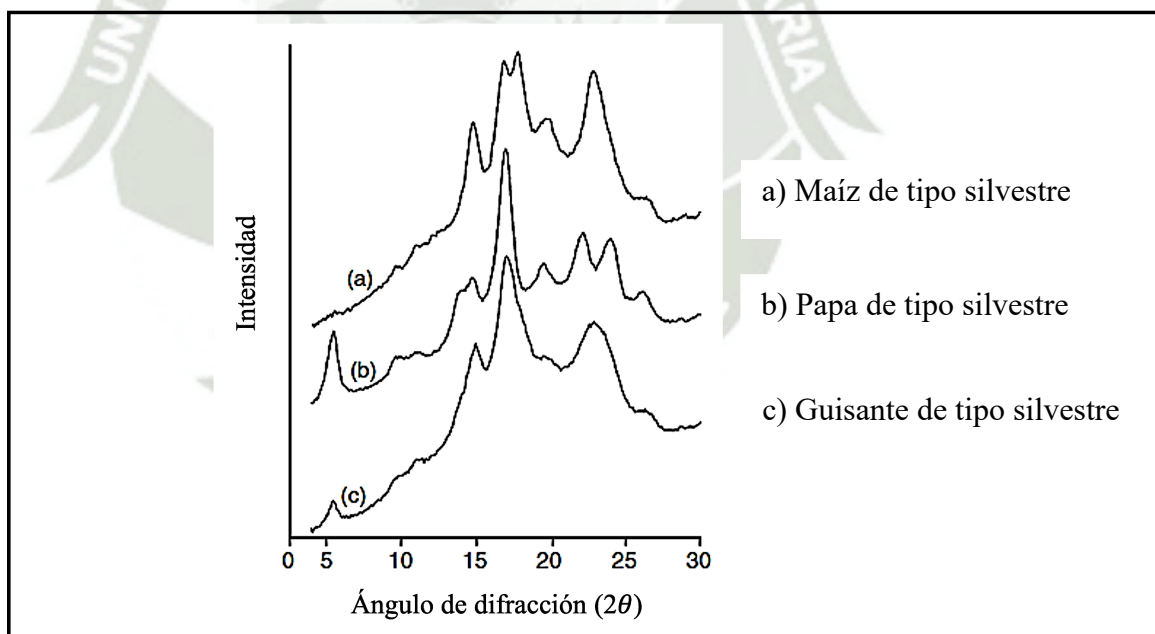


Figura N° 6. Diagrama de difracción de rayos X de almidones de diferentes tipos de patrones de cristalinidad.

**Adaptado de Bogracheva et al. (68).*

La morfología del granulo del almidón depende del genotipo de planta, las prácticas culturales utilizadas en el cultivo, la bioquímica del cloroplasto / amiloplasto y la fisiología de la planta. Existe una diferencia en tamaño y forma entre los gránulos

de almidón de papa y cereales. Singh et al. (69), estudio la morfología de los gránulos de almidón de diferentes cultivares de papa por la metodología de SEM, comprobando la variación morfológica de los gránulos de las diferentes variedades de papa. Los gránulos pequeños y medianos presentaban formas ovaladas. A diferencia de los gránulos grandes que presentaban una forma irregular o cuboide. La variación de la forma con el tamaño del granulo de almidón de papa puede estar relacionada con el empaquetamiento de los gránulos durante el crecimiento de los órganos de almacenamiento. La disponibilidad limitada de espacio en las células del tubérculo puede provocar una alteración en la forma del gránulo cuando se encuentra en crecimiento. Los gránulos de almidones de arroz, trigo, y maíz también poseen diferentes formas. El almidón de maíz posee una forma angular, el almidón arroz posee una forma pentagonal y angular; mientras que el almidón de trigo posee una forma esférica y lenticular (Figura 7) (70,71).

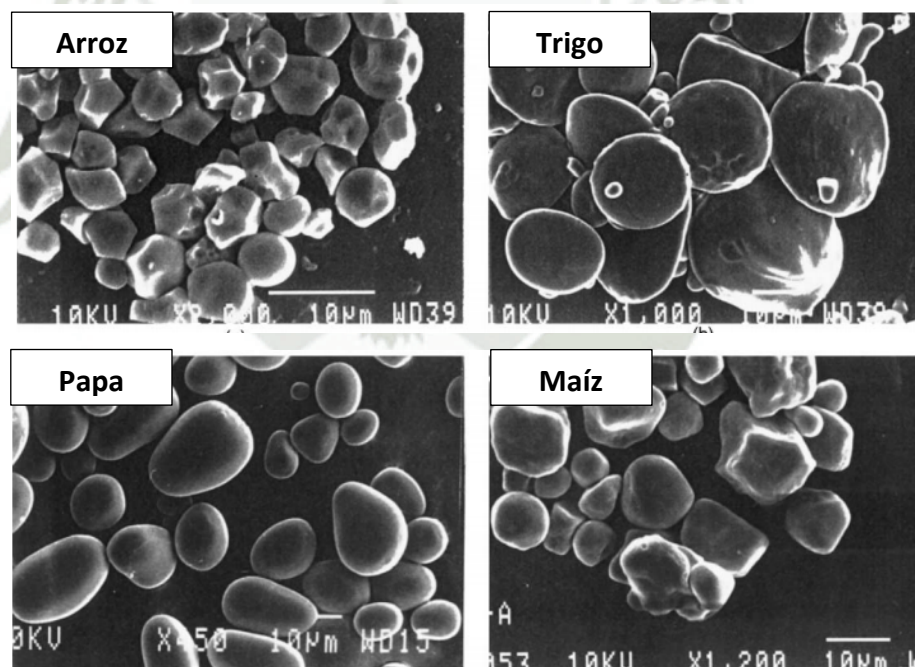


Figura N° 7. Micrografías electrónicas de barrido de almidones de diferentes fuentes (bar = 10µm).

* Adaptado de Singh et al. (72).

La amilopectina de papa posee grupos éster monofosfato, una característica única en el almidón de este tubérculo, estos grupos se encuentran en las partes amorfas de los gránulos de almidón (56,71). Estos grupos de monofosfato les confieren a

los almidones de papa; una alta capacidad de retención de agua, viscosidad, claridad, estabilidad a la congelación-descongelación y temperatura más baja de gelatinización (73–75). Se encontró trazas de diferentes cationes (potasio, sodio, calcio y magnesio); como componentes menores en los gránulos de almidón, aparentemente en coordinación con los grupos fosfato (76).

Tabla N° 4. Características de diferencias almidones comerciales.

Composición y características	Papa	Maíz	Trigo	Tapioca	Maíz ceroso	Patata cerosa
Forma de gránulos	esférico ovalado	poligonal redondo	lenticular redondo	redondo truncado	poligonal redondo	esférico ovalado
Diámetro, rango (μm)	5-100	2-30	0.5-4.5	4-35	2-30	5-100
Diámetro, promedio numérico (μm)	23	10	8	15	10	23
Diámetro, peso promedio (μm)	45	15	25	25	15	45
Número de gránulos por gramo	100	1300	2600	500	1300	100

* Adaptado de Grommers & van der Krogt (28).

1.3 Propóleo

Es una sustancia resinosa y fuertemente adhesiva que las abejas (*Apis mellifera L.*) recolectan, transforman y lo usan para sellar agujeros en sus panales, suavizar las paredes internas, proteger la entrada contra intrusos y cubrir los cadáveres de los intrusos que murieron dentro de la colmena (proceso similar al efecto de embalsamamiento) (24,25). Para cortar y recolectar el material resinoso las abejas utilizan sus mandíbulas, el material recolectado es trasladado para las patas traseras

(Corbículas). Este material recolectado se lleva a la colmena donde otra abeja saca este material usando las mandíbulas y añadiendo secreciones y enzimas (77). Si bien el propóleo es un producto animal, una proporción de sus componentes son derivados de plantas y justamente estos compuestos presentan actividad biológica (78).

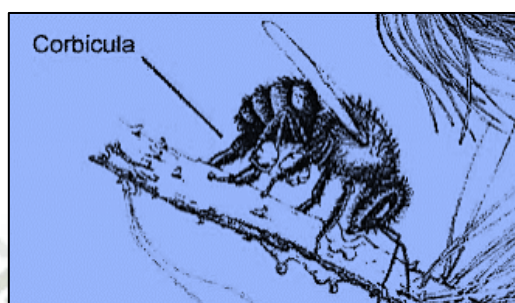


Figura N° 8. Colecta de la resina por parte de las abejas para la fabricación de propóleo.

** Adaptado de Matsuda (77).*

La composición química, color y olor del propóleo está directamente relacionada con la de los exudados de brotes recolectados por las abejas de varios árboles; álamo (*Populus spp.*), abedul (*Betula alba*), haya (*Fagus sylvatica*), castaño de indias (*Aesculus hippocastanum*), aliso (*Alnus glutinosa*) y varias coníferas (23). Esto va a depender de la vegetación geográfica del sitio de recolección, por eso se han venido estudiado ampliamente sus propiedades en diversos orígenes geográficos (79). En Santiago del Estero (Argentina), las muestras de propóleo recolectadas mostraron una variabilidad en la actividad antioxidante de propóleo de un mismo departamento, esto se atribuye a las diferencias observadas en las especies arbóreas para cada localidad ya que un departamento no es un grupo homogéneo (80).

Hasta el momento se han identificado más de 420 compuestos químicos en muestras de propóleo procedentes de diversas regiones geográficas del mundo (81). Los flavonoides (flavonas, flavonoles y flavononas), ácidos aromáticos, ácidos diterpénicos y compuestos fenólicos parecen ser los principales componentes responsables de las actividades biológicas de las muestras de propóleos (79).

Se ha informado que el propóleo posee propiedades antibacterianas (bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas), antivirales, antitumorales,

antiinflamatorias, anticancerígenas, antifúngicas y antitumorales. El propóleo se ha utilizado en alimentos y productos farmacéuticos para mejorar la salud y prevenir enfermedades como el cáncer, la inflamación, la diabetes y las enfermedades del corazón (23,82,83). Ristivojević et al. (84), recolectó un total de 53 muestras de propóleos de diferentes regiones de Serbia durante 2010 y 2011. Encontró que los picos más relevantes que influyen en la actividad antimicrobiana del propóleo contra todas las cepas bacterianas son los compuestos fenólicos (ácido cafeico, quercetina, luteolina, apigenina, ácido p-cumárico, kaempferol, naringenina, pinobanksina y dos compuestos desconocidos a RF = 0,60 y 0,70). Por su propiedades antioxidantes y antimicrobianas, el propóleo se ha ganado en las últimas décadas una reputación mundial y una amplia aceptación como producto natural en numerosos países.

Independientemente de su origen, el propóleo crudo no es adecuado para su uso en productos alimenticios, debido a su alto contenido de contaminantes (principalmente ceras, resinas y sustancias peligrosas) y poca solubilidad en agua. El propóleo debe pasar por un proceso de purificación por solvente. La extracción etanólica en propóleo es útil para obtener un alto contenido de compuestos bioactivos; pero con un bajo contenido de cera (85,86). No obstante, presenta como desventajas un fuerte sabor residual e intolerancia de algunos consumidores al alcohol (87). La industria y los investigadores están interesados en producir un extracto que posea los mismos compuestos extraídos por el método etanólico, pero sin las desventajas (85). Otra alternativa es la extracción acuosa, aunque todavía los datos de investigación son escasos. Algunos autores han mencionado que la extracción acuosa es menos eficiente que la extracción etanólica, puesto que disminuye el contenido fenólico en 10 veces (85,88,89). Mientras que autores como Laskar et al. (90), contradicen informes anteriores, ya que señalan que la extracción acuosa es más eficiente que la extracción etanólica, dado que extrae mejor los compuestos fenólicos y antioxidantes del propóleo de la india. En esta misma línea el autor Lemos Costa (91), logró optimizar el proceso de extracción acuoso de propóleo, evaluando el efecto de la concentración de hidróxido de sodio, tamaño de partícula y tiempo de extracción. Concluyendo que el extracto acuoso en medio alcalino tiene una composición y propiedades similares al extracto de etanol comercial de propóleos. Sun et al. (92), señala que los disolventes de etanol / agua

mostraron un efecto significativo sobre la composición fenólica y las propiedades antioxidantes de los extractos de propóleo de Beijing, en especial el disolvente de etanol / agua al 75% en peso. Con lo cual, los diferentes disolventes utilizados en la extracción va afectar directamente la composición de los compuestos fenólicos y antioxidantes de los extractos de propóleos.

1.3.1 Propóleo verde

Brasil es un importante proveedor de propóleo en el mercado mundial (93). La gran biodiversidad ecológica vegetal brasileira proporciona una composición única y variable, se han identificado 13 grupos distintos de acuerdo a sus características fisicoquímicas y localización geográfica (94,95). Sin embargo, varios otros tipos de propóleos se pueden encontrar en Brasil y su composición química y actividad biológica están actualmente en estudio (96).



Figura N° 9. Fotografías de abejas recolectando hojas de *Baccharis dracunculifolia* para traerlas de regreso a su nido como propóleo.

* Adaptado de Kumazawa et al. (97).

El propóleo del grupo 12 es conocido como propóleo verde, su fuente principal es la planta nativa *Baccharis dracunculifolia* que es recolectada en los estados de São Paulo y Minas Gerais (98). La coloración de este propóleo varía entre amarillo

verdoso a verde intenso. Esta coloración está relacionada con la clorofila presente en los brotes vegetativos y hojas sin expandir de *B. dracunculifolia* (78).

El propóleo verde posee una composición fenólica particular que incluye ácido p-cumárico y artepilina C, estos contribuyen a su alta capacidad antioxidante (99,100). El estado de madurez de las hojas del *Baccharis* se asocia a la cantidad de Artepilina C presentes en el extracto (101). Park et al. (102); investigo los constituyentes químicos presentes en los extractos etanólicos de exudados resinosos de *B. dracunculifolia* y del propóleo del grupo 12. Mostrando que los perfiles por HPLC de los flavonoides y compuestos fenólicos del propóleo de grupo 12 era exactamente igual al del extracto de yemas de las hojas de *B. dracunculifolia*. Además, encontraron altas concentraciones del compuesto artepilina C en comparación con los otros compuestos químicos (Tabla 5). Similares apreciaciones fueron señaladas por otros autores que le atribuyen la actividad biológica del PR verde a los niveles altos de los ácidos p-cumaricos prenilados, principalmente Artepilina C (103–105). Veiga et al. (106), destacó la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleo verde y *Baccharis dracunculifolia* DC frente aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina y *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. Esta propiedad antimicrobiana y antioxidante está relacionada con la presencia de artepilina C y la presencia de otros componentes de los extractos. Por otro lado, se demostró que la reducción del tamaño de partícula en el propóleo produce una pérdida de compuesto bioactivos, esto se explica por qué al reducir el tamaño tenemos pérdida de las ceras que ejercen un efecto de protección de los procesos oxidativos. Paralelamente se verifico la actividad antibacteriana del propóleo verde contra *Staphylococcus aureus* .

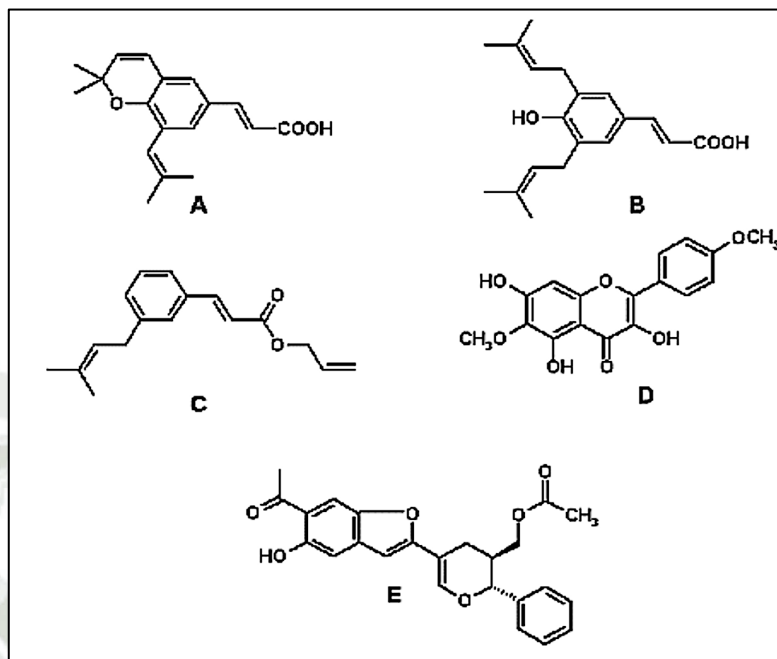


Figura N° 10. Estructuras de compuestos fenólicos aislados de propóleo verde.

(A) 2,2-dimetil-8-prenilcromo; (B) ácido 4-hidroxi-3,5-diprenilcinámico (artepilina C); (C) éster alílico del ácido 3-prenilcinámico; (D) kaempferide; (E) propóleo benzofurano A.

**Adaptado de Salatino et al. (78).*

Tabla N° 5. Composición química del propóleo del grupo 12 (G 12) y *B. dracunculifolia*.

Composición química (mg / g de extracto)	Propóleo G 12	<i>B. dracunculifolia</i>
Ácido cumárico	10.67	4.23
Ácido ferúlico	2.40	4.80
Ácido cinámico	2.62	0.68
Pinobanksina	1.66	7.20
Kaempferol	1.30	1.10
Isosakuranetina	4.87	1.22
Crisina	1.86	1.05
Acetina	6.65	2.33
Kaempferide	12.57	8.15

Artepillin C

38.58

40.54

* Adaptado de Park et al. (102).

1.4 Filmes Biodegradables

Los films tradicionales pueden demorarse hasta 500 años para su degradación completa; mientras que los films biodegradables demoran aproximadamente 20 días (107,108). La ASTM, define los plásticos degradables como aquellos que sufren un cambio significativo en su estructura química perdiendo sus propiedades mecánicas y físicas, bajo condiciones ambientales específicas (luz, calor, humedad, actividad biológica y condiciones químicas), mientras que la IUPAC lo define como “macromoléculas o sustancias poliméricas susceptibles de degradarse por la actividad biológica mediante la disminución de las masas molares de las macromoléculas que forman las sustancias” (109).



Figura N° 11. Ciclo de vida de los materiales de envasado a partir de biopolímeros.

**Adaptado de Popovic' et al. (110).*

Los films son capas delgadas de un material biodegradable que se aplica como barrera entre los alimentos y el medio ambiente. Por lo tanto, protege el producto de daños físicos y biológicos aumentando así su vida útil, ya que controla la

transferencia de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, sabor y aroma entre los componentes del producto alimenticio y la atmósfera que los rodea. Dependiendo de la materia prima utilizada puede ser consumido como parte del producto (111–113). Son elaborados a partir de biopolímeros tales como proteínas (caseína, proteína de suero, proteína de maíz (zeína), proteína de trigo (gluten), colágeno, gelatina), polisacáridos y sus derivados (celulosa, quitosano, almidón, alginatos, pectinas, gomas) (114). Estos polímeros son capaces de formar una red tridimensional semirrígida, que retiene el solvente. La red tridimensional está formada por asociaciones inter e intramoleculares o enlaces cruzados de cadenas de polímeros (115).

Las características de los films están íntimamente relacionadas con las propiedades del biopolímero utilizado (conformación, peso molecular, distribución de carga y polaridad) y a las condiciones de fabricación del film (concentración del polímero en la solución filmogénica; pH, tratamiento térmico de la solución, temperatura y HR durante el secado; tipo y concentración de aditivos utilizados (plastificantes)). Se han venido estudiado diversas materias primas derivadas de recursos naturales con el propósito de conocer y mejorar las características finales del film formado (resistencia mecánica, flexibilidad, color, opacidad, permeabilidad al vapor de agua y gases, solubilidad, entre otros) (116,117).

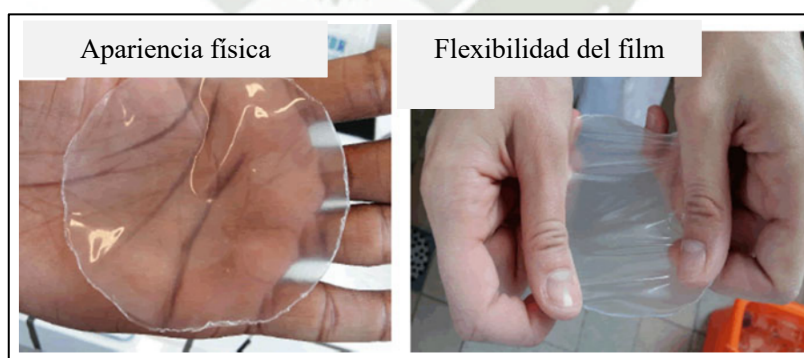


Figura N° 12. Film a base de almidón de yuca.

**Adaptado de Adjoumar et al. (118).*

Los plastificantes comúnmente usados para mejorar las propiedades físicas y mecánicas de los films son los compuestos hidrofílicos, como los polioles (glicerol, sorbitol y polietileno glicol) (110). El rol del plastificante consiste en la eliminación

de enlaces de hidrógeno, causando un aumento en el volumen libre, lo que lleva a una mayor movilidad de las cadenas de almidón y una disminución de la Tg (119). Debido a esto se produce una variación en las propiedades de los films que va a depender del tipo y cantidad de plastificante.

El glicerol es uno de los plastificantes más utilizados en la formación de films, por su naturaleza hidrofílica dado que absorbe más moléculas de agua, que actúan como un plastificante adicional. Las moléculas de glicerol son pequeñas y acceden fácilmente entre las cadenas de polisacáridos a través de enlaces de hidrógeno, reduciendo las interacciones intermoleculares de polisacáridos, aumentando el espaciamiento intermolecular y, en consecuencia, la velocidad de transferencia de vapor de agua. Proporcionando que los films tengan una estructura más flexible y ajustándolas al proceso de producción del empaque. Aunque su uso puede llegar a afectar las propiedades de barrera como PVA y solubilidad (119) Otro aspecto crucial son los solventes utilizados para la formación de los filmes biodegradables normalmente son agua, etanol o una combinación de los dos, de la solubilidad del biopolímero depende su homogeneidad en los films (120). Cabe señalar que el agua también es un plastificante menos estable que otras moléculas debido a su tendencia a evaporarse a altas temperaturas de proceso y durante el almacenamiento dando como resultado la contracción del material (121).

1.4.1 Films de almidón

Se han publicado diversos estudios acerca de la caracterización de las propiedades mecánicas, ópticas, de barrera y microestructurales de los films a base de almidón, principalmente por la gran variedad de almidones con las podemos trabajar ya sea almidones nativos o modificados (química, física o genética); mostrándose como la materia prima más prometedora para la producción de films biodegradables.

El almidón posee una gran capacidad para la formación de films cuando se procesan bajo condiciones específicas, es insoluble en agua fría por los enlaces de hidrogeno que mantienen unido el polímero (122). Asimismo, no se funde como los termoplásticos convencionales por su temperatura de degradación que es más baja que su punto de fusión. Sin embargo, si se añade fuerza de cizallamiento, energía térmica y plastificante, sus gránulos van a perder su estructura semicristalina de

manera irreversible y se convierten en una matriz continua. Este comportamiento se utiliza ampliamente para la realización de plásticos biodegradables (109,123) . Se produce en 3 pasos para ruptura de los gránulos de almidón (hinchamiento granular, rotura del grupo de amilopectina y solubilización de amilosa / amilopectina). En la primera etapa se produce un hinchamiento del granulo por la absorción del agua en sus dominios amorfos, esta etapa es reversible si la temperatura permanece baja (124). Cuando se supera la temperatura de gelatinización (Tgel), la estructura cristalina se rompe y los grupos hidroxilo de la amilosa y amilopectina interactúan con las moléculas de agua dando como resultado la disolución del almidón en agua por lo tanto la amilosa y la amilopectina se entrelazan formando una fase continua (film) de almidón.

Los films pueden llegar a tener características amorfas o exhibir algún orden molecular (proceso de ruptura incompleto o por la retrogradación), esto va a depender en gran medida de las condiciones de almacenamiento de los films (18,109,125).

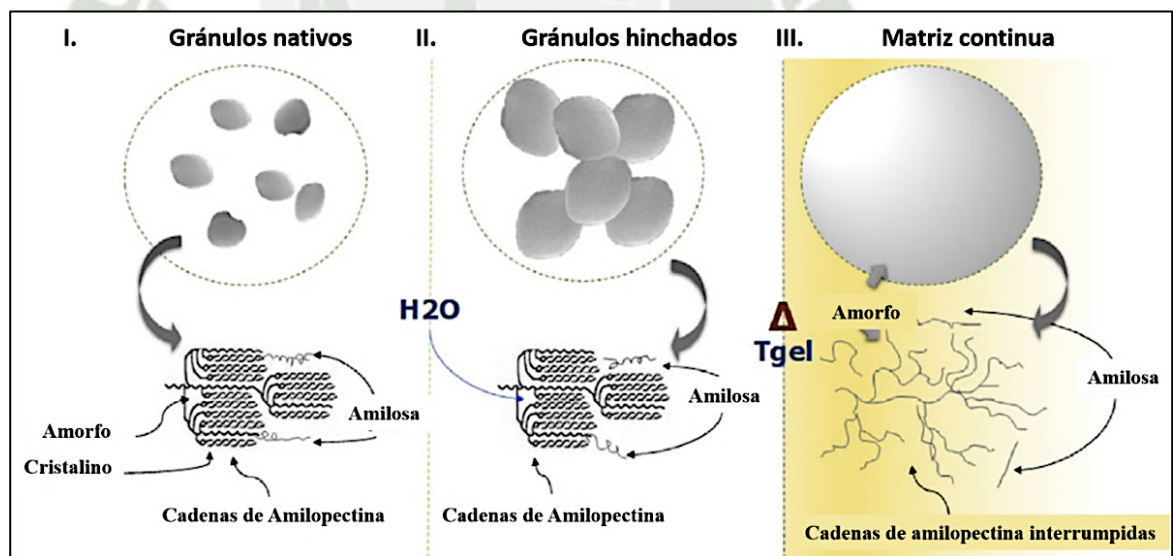


Figura N° 13. Esquema ilustrativo de la ruptura de los gránulos de almidón con la temperatura de gelatinización.

**Adaptado de Pelissari et al. (109).*

Según varios trabajos de investigación las propiedades de los films de almidón están influenciadas por el contenido de amilosa, cristalinidad, fuente de almidón, tipo y contenido de plastificante (125–130). Con un alto contenido de amilosa en el

almidón se obtiene una excelente capacidad de formación de films y excelentes propiedades mecánicas (50,126,131–134). Las cadenas lineales de amilosa se entrelazan eficazmente y forman fuertes enlaces cruzados, principalmente por enlaces de hidrógeno y cristalización local, que dan como resultado materiales fuertes y coherentes (50). Zobel, (135) señaló que la amilosa se destaca justamente por esas propiedades mientras que los films a base de amilopectina tienden a ser más frágiles. La cantidad de cristalinidad de tipo B presente en los almidones aumenta la rigidez y la tensión en la rotura del film (50). Un factor importante son las condiciones de secado que incluyen la temperatura de secado del aire y la HR (136,137).

Para realizar la conversión del almidón a films biodegradables se realiza mediante la gelatinización seguida de fundición en solución (proceso húmedo o *Casting*) o mediante procesamiento por fusión (proceso seco)(109,138,139). El proceso seco es el más utilizado a nivel industrial mientras que el proceso húmedo es más aplicado a escala de laboratorio. Do Val Siqueira et al. (140), destaca que el método de *Casting* es el más usado en las publicaciones para la producción de envases a partir almidón, esta información sugiere que la mayoría de tipos de investigación en este campo se encuentran aún en una etapa inicial de verificación de la formulación. La comprensión de la formulación va a ser vital en las siguientes etapas de investigación con el objetivo de la lograr una producción a gran escala.

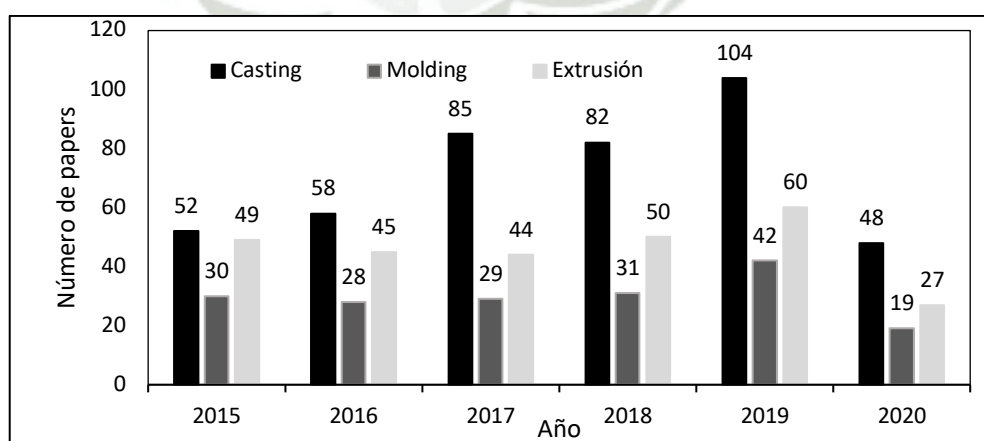


Figura N° 14. Número de artículos (2015-2020) que se encuentran en la base de datos de Web of Science para los siguientes métodos de producción de envases de almidón: *Casting*, Moldeo y Extrusión.

**Adaptado de Val Siqueira et al. (140).*

El método de *Casting*, se basa en la gelatinización del almidón para formar una solución. El almidón se mezcla con el agua hasta aproximadamente 3 a 12% en peso, seguidamente se calienta esta mezcla a una temperatura superior a la Tgel durante un período de tiempo. Por la elevada cantidad de agua, el proceso de gelatinización completo no requiera fuerza de cizallamiento. Finalmente, la solución filmogénica es vertida en placas (Acrílico, teflón o placas de Petri). El espesor del film va estar en función a la masa de la solución filmógena que no se pierde durante la etapa de secado. El proceso de secado se puede realizar a temperatura ambiente o controlada (30 a 40 ° C) y con tiempos de secado de 6 a 48 h (141).

El proceso seco incluye los métodos de moldeo y extrusión. El almidón nativo no se comporta como un polímero termoplástico, pero cuando el contenido de agua es limitado, se adiciona plastificantes y es sometido a presión, cizallamiento y temperaturas altas (120-200 °C) se produce el ablandamiento y colapso de los grupos de amilopectina generando una matriz continua fundida provocando a la vez una alteración de la estructura semicristalina original del gránulo de almidón (109,139). El almidón termoplástico (TPS) es el almidón interrumpido por el procesamiento en seco (109).

El método de moldeo por compresión consiste en calentar una resina termoendurecible bajo presión en un molde. Mientras que el moldeo por inyección se basa en inyectar una pasta en un molde en las que se tiene diversas variables de control (granulación del polvo, temperatura de la pasta, velocidad de llenado y temperatura del molde). El moldeo por compresión se destaca por la poca pérdida del material en la etapa de moldeo; mientras que el moldeo por inyección se destaca por su capacidad de producción a bajos costos (141).

El método de extrusión se basa en la entrada de un material en estado sólido o semilíquido a un extrusor pasando por un troquel que da forma al material donde los gránulos de almidón nativo se someten a un esfuerzo de cizallamiento, provocando la deformación y desorden de los gránulos cristalinos, transformándolos en un material homogéneo y amorfo (109,122)

Los films a base de almidón ofrecen una serie de ventajas: se originan de fuentes renovables, amplia disponibilidad, compostabilidad total sin dejar residuos tóxicos, bajo costo, son capaces de actuar como portadores de aditivos alimentarios (es decir, antioxidantes y antimicrobianos), proporcionan una apariencia estética, son comestibles (es decir, pueden ser consumido con la comida que contienen), económica, buenas propiedades ópticas y de barrera para los lípidos y oxígeno (18–20). Otra principal ventaja es la valorización de derivados de productos agrícolas ya que su uso como materia prima aumenta la producción y uso de estos productos.

El fenómeno de retrogradación, las malas propiedades mecánicas y la naturaleza hidrofílica de los films de almidón son sus mayores desventajas, limitando así su aplicabilidad (142). Mejorarlos es un gran desafío, para la obtención de materiales más estables con propiedades mejoradas. Actualmente hay una intensa búsqueda en el desarrollo de films biodegradables a partir de almidón en escala laboratorio. Las políticas gubernamentales, las acciones de sostenibilidad de las industrias y los cambios en el comportamiento del consumidor han impulsado este desarrollo a través de incentivos (141). Para lograr esta mejora se están agregando algunos aditivos, como lípidos, otros hidrocoloides o agentes de refuerzo (113).

1.5 Filmes Activos

Las principales causas de pérdida de alimentos se dan por la acción de microorganismos y la oxidación de los componentes alimentarios (lípidos y vitaminas). Los principales conservantes y antioxidantes sintéticos utilizados en la industria alimentaria para lograr extender la vida útil de productos alimenticios son BHT, BHA, sales sulfito, metabisulfito, ácido benzoico, óxido de etileno, nitratos, nitritos, ácido propiónico, óxido de propileno, ácido sórbico y dióxido de azufre (143–145). Sin embargo, actualmente estos productos químicos representan serias preocupaciones al consumidor debido a su posible efecto contra la salud humana; por eso se está limitando su uso en diversos países (146–149).

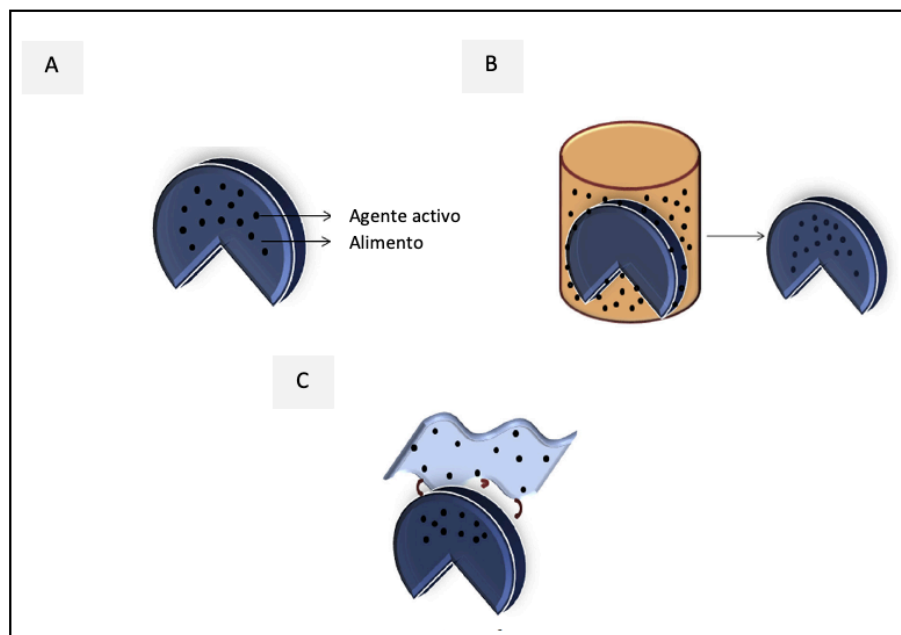


Figura N° 15. Incorporación de compuestos activos en sistemas de envasado de alimentos. (A) Formulación del producto, (B) revestimiento y (C) films biodegradables.

**Adaptado de Pelissari et al. (109).*

Los films activos aportan nuevos enfoques innovadores para mejorar el envasado tradicional, interactuando directamente con el producto, este tipo de sistema tienen una funcionalidad adicional como soporte de sustancias antioxidantes y antimicrobianas. Así, la incorporación de estos compuestos en los films biodegradables promoverá una nueva forma de mejorar la seguridad y la vida útil de los alimentos (150–152). Logrando satisfacer las demandas de los consumidores proporcionando una alta calidad y seguridad (113,153). Este envasado se basa en las interacciones "alimentos / envasado". La incorporación de los agentes activos en el envasado puede darse en forma suelta dentro del envase, adheridos al interior de los materiales o incorporados dentro de los mismos materiales de envasado (154,155). Benbettaieb et al. (156), señala que la incorporación de agentes antimicrobianos en la formulación de films logra incrementar el tiempo de su actividad antimicrobiana. La incorporación de los agentes antimicrobianos y antioxidantes en films ha incitado diferentes investigaciones que buscan evaluar su posible uso como matriz para la obtención de envasado activo. Existe una variación

de las propiedades físicas y funcionales por la incorporación e interacción de estos compuestos con los biopolímeros formadores del film (157).

Tabla N° 6. Avances recientes en films comestibles que contienen compuestos antioxidantes y antimicrobianos.

Componentes de la matriz	Compuesto antioxidante / antimicrobiano	Propiedades mejoradas	Referencia
Quitosano	Extractos de metanol de tallo, hoja y semilla obtenidos de <i>Pistacia terebinthus</i>	La adición del extracto de plantas mejora las propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Además de mejorar la elasticidad en los films quitosano-semilla y quitosano-tallo.	(158)
Goma guar, quitosano aislado y proteína de suero	Eugenol, carvacrol y citral	Disminución de PVA y mejora en la actividad antimicrobiana.	(159)
Quitosano	Nanopartículas de quitosano	Disminución de la humedad y PVA. Mejora de las propiedades antimicrobianas.	(160)
Films comestibles de pectina a base de manzana, zanahoria e hibisco	Carvacrol y cinamaldehído	Mejora de las propiedades antimicrobianas contra <i>Listeria monocytogenes</i> en jamón y mortadela contaminadas.	(161)
Pectina	Aceite esencial de clavo	Mejora en las propiedades mecánicas y PVA. Conjuntamente de una mejora en su actividad antibacteriana contra <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> .	(162)
Almidón de guisante y goma guar	Epigallocatequina-3-galato (EGCG) y dos plantas nativas de Australia: extractos de piel de fruta de arándano y macadamia	Actividad antimicrobiana contra <i>S. typhimurium</i> y <i>Rhizopus sp.</i>	(163)

kappa-carragenina	Nanoarcilla de montmorillonita y aceite esencial de <i>Zataria multiflora Boiss</i>	Mejora en las propiedades mecánicas y antimicrobianas. Además de una mejora en la disminución de PVA.	(164)
Gelatina	Extracto de té verde	Mejora la actividad antioxidante y la resistencia a la tracción. Al mismo tiempo disminuyo el PVA, alargamiento a la rotura y solubilidad en agua.	(146)
Gelatina y agar	Extracto de té verde Antioxidante	Otorga propiedades antioxidantes y antimicrobianas.	(165)
Quitosano	Extracto de té verde	Mejoró las propiedades mecánicas, PVA, contenido polifenólico y actividad antioxidante.	(166)
Quitosano	Aceite esencial de y extracto de semilla de uva	Aumenta la humectabilidad de la superficie, los compuestos fenólicos y la actividad antioxidante.	(167)

*Adaptado de Navneet Kumar & Rajni (113).

1.5.1 Filmes con actividad antimicrobiana

La aplicación directa de sustancias antibacterianas en los alimentos ofrece beneficios limitados porque las sustancias activas pueden neutralizarse parcialmente, inactivarse, deteriorarse sensorialmente o difundirse fácilmente cuando entran en contacto con la masa de alimentos. Por lo tanto, el uso de films que incorporan agentes antimicrobianos puede ser más eficiente, ya que se liberen los agentes antimicrobianos gradualmente del paquete durante un período de almacenamiento prolongado (168). Esto se logra a través de reducir, inhibir o retrasar el crecimiento de microorganismos en la superficie de los productos

alimenticios, al mismo tiempo, se puede usar como portadores de nutrientes para aumentar el valor nutricional (169–171).

Los antimicrobianos más comúnmente utilizados son los ácidos orgánicos, quitosano, nisina, sistema de lactoperoxidasa y algunos extractos de plantas y sus aceites esenciales (172). Al seleccionar un antimicrobiano se debe considerar su efectividad contra el microorganismo objetivo y las posibles interacciones entre el antimicrobiano, el biopolímero formador de film y otros componentes alimenticios presentes. Estas interacciones pueden modificar la actividad antimicrobiana y las características del film (173).

1.5.2 Films con actividad antioxidante

La autooxidación es un mecanismo autocatalítico de radicales libres, que puede generarse como resultado de la acción de iniciadores, como la luz, la temperatura o los iones metálicos. Consta de 3 fases (iniciación, propagación y terminación). La reacción de iniciación produce el radical alquilo del ácido graso, que a su vez reacciona con el oxígeno para formar radicales peróxidos en la reacción de propagación. Los radicales peróxidos reaccionan con ácidos grasos insaturados y forman hidroperóxidos, que luego se descomponen para producir compuestos aromáticos volátiles que dan un sabor no deseado y un olor rancio. La interacción de los radicales alquilo y peróxido conduce a la formación de productos tales como aldehídos, alcanos y dienos conjugados. La formación de aldehído se ha relacionado directamente con el cambio de color y sabor (174).

Los antioxidantes son sustancias que retrasan o impiden la oxidación de los sustratos, lo que los hace no disponibles para la formación de especies oxidantes. Al inhibir o retrasar la oxidación, los antioxidantes pueden eliminar los radicales libres (actividad de eliminación), en cuyo caso se describen como un antioxidante primario o pueden actuar a través de una variedad de mecanismos, que incluyen la unión de iones metálicos, eliminación / secuestro de oxígeno, conversión de hidroperóxidos en especies no radicales, absorción de radiación UV o desactivación de oxígeno singlete, en cuyo caso se describen antioxidantes secundarios. Dentro del grupo de antioxidantes se encuentran las antocianinas, fenólicos, carotenoides y ácidos orgánicos, como el ácido ascórbico y otros.

El empaque activo antioxidante busca prevenir o ralentizar la oxidación de estos componentes alimenticios, como lípidos y proteínas. Este enfoque de material activo requiere la incorporación intencional de antioxidantes dentro de los materiales de empaque para su posterior migración (175,176).

1.6 Caracterización de los films

Los films biodegradables deben cumplir con una serie de características que dependen en gran medida de su aplicación. Estas propiedades están en función a los componentes de los films y su formación. Se puede agregar plastificantes, agentes de reticulación, antimicrobianos, agentes anti-oxígeno, agentes de textura, etc. para mejorar sus propiedades (177,178).

1.6.1 Propiedades de barrera

El vapor de agua y el oxígeno son dos de los principales permeantes estudiados en las aplicaciones de empaque, ya que pueden transferirse del ambiente interno o externo a través de la pared de empaque de polímero, lo que resulta en un cambio continuo en la calidad del producto y la vida útil (179). Se pueden producir pérdidas significativas de la calidad de los alimentos debido al efecto de transferencia de humedad, gases, aroma, sabor o color hacia y desde el entorno (180).

La propiedad de solubilidad orienta la aplicación de los films para el envasado de productos alimenticios, debido a que la solubilidad del film en agua afecta directamente las propiedades de barrera contra la humedad, disminución en la resistencia a la tracción y módulo elástico; y un aumento en la elongación.


Los biopolímeros altamente polares, como los films a base de almidón y proteínas, generalmente exhiben una alto PVA, pero una baja permeabilidad a los gases. La adición de plastificantes reduce la rigidez de los films y aumenta su permeabilidad al vapor (181). Es importante enfatizar que hasta el momento no se ha desarrollado ningún film comestible que tenga un PVA más bajo que las películas plásticas de polímero artificial (182).

1.6.2 Propiedades microestructurales

Las características microestructurales están relacionadas con las pruebas mecánicas y de barrera de los films. Además de la formulación y proceso de fabricación (183). Se utilizan varias técnicas, incluida la microscopía electrónica de barrido (SEM), la espectroscopia de fotoelectrones de rayos X, la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR) y el ángulo de contacto para el análisis estructural y la observación de las disposiciones de los componentes en la estructura del film. (184).

1.6.3 Propiedades ópticas

Las propiedades ópticas (color, transparencia y brillo) de los films llegan a tener un gran impacto en la apariencia del producto alimenticio y en la aceptabilidad del consumidor (185). La opacidad y transparencia del polímero se debe a la morfología o estructura química relacionada con el peso molecular del material. El color se define en términos de L^* , a^* , b^* y ΔE^* . L^* se define como la claridad del color y se refiere a la relación entre la luz reflejada y absorbida, a valores de 0 denota color blanco y a valor de 100 denota una coloración negra (178).



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Lugar de ejecución

El trabajo de investigación se realizó en el Departamento de Química de la Facultad de Filosofía, Ciencias y Letras de Ribeirão Preto de la Universidad de São Paulo en el Laboratorio de Biopolímeros Agroindustriales –FFCLRP.

2.2 Materiales

2.2.1 Muestras y/o unidades biológicas.

La muestra de almidón fue suministrada por el Laboratorio de Biopolímeros Agroindustriales de la USP. Este almidón fue aislado de la variedad de papa nativa *Yana Winku* cultivada en la comunidad campesina Marcavalle (-12.184553, -75.148778) del Departamento de Junín por el método de molienda humedad. Esta muestra fue almacenada a una temperatura de -4 ° C. En la tabla 07, se muestra las características fisicoquímicas, morfológicas y bioactivas del almidón de papa nativa *Yana Winku*.

Tabla N° 7. Características del almidón de papa *Yana winku*.

Características del almidón de papa <i>Yana winku</i>	
Humedad (%)	11.36
Cenizas (%)	0.56
Proteínas (%)	2.03
Lípidos (%)	0.04
Actividad antioxidante por DPPH ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g b.s}$)	23.70
Actividad antioxidante por ABTS ($\mu\text{mol TE}/100 \text{ g b.s}$)	167.50
Compuestos fenólicos (mg GAE/100g b.s)	45.06
Distribución de tamaño de partícula	Bimodal
Índice de cristalinidad (%)	14.2

*Adaptado de Iquiapaza et al. (186).

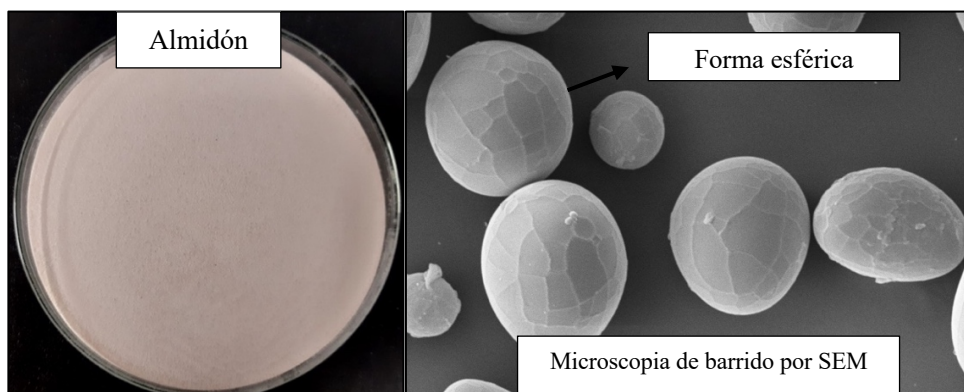


Figura N° 16. Apariencia visual y microscopia de barrido por SEM del almidón de papa nativa *Yana Winku*.

**Adaptado de Iquiapaza et al. (186).*

El propóleo fue donado por la empresa Vale do Mel Indústria e Comércio LTDA. El propóleo estudiado fue el propóleo verde, referido a la floración de *Baccharis dracunculifolia* de la ciudad de Muzambinho-MG, recolectada en septiembre de 2017.



Figura N° 17. Muestra de propóleo verde que se utilizara en la investigación.

2.2.2 Material de laboratorio.

2.2.2.1 Materiales de vidrio y plástico

- Alcoholímetro

- Bagueta
- Beackers
- Embudo
- Espátula
- Fiolas (5,10, 25,50 y 100 mL)
- Gradilla
- Matraz de Erlenmeyer
- Matraz de Kitasato
- Micropipetas 0-1000 μL
- Pipeta
- Placas de acrílico
- Placas Petri
- Probeta
- Puntas para pipeta
- Soportes de aluminio
- Tubos de ensayo
- Tubos Eppendorfs
- Tubos falcón

2.2.2.2 Equipos e instrumentos

- Agitador magnético
- Balanza
- Balanza semi-analítica (Sartorius-BL210S, Alemania)
- Baño ultratermoestatizado (IKA C-MAG HS7-Marconi, Piracicaba-Brasil)
- Bomba al vacío
- Centrifuga (modelo Q222RM - Quimis, São Paulo, Brasil.)
- Computadora
- Desecador
- Difractómetro de rayos X de Siemens (modelo D5005)
- Equipo OCA-20 Dataphysics
- Espectrofotómetro (Femto 600 Plus, Brasil)

- Estufa (Quimis, Q314M292, Brasil)
- Micrómetro digital Zaas-Precision con una punta plana
- Refrigerador
- Shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil)
- Texturómetro TA XT Plus
- Ultrasonido (Modelo USC – 1400)

2.2.2.3 *Insumos y reactivos químicos*

- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma Aldrich, São Paulo, Brazil)
- ABTS, 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma Aldrich, São Paulo, Brazil)
- Ácido Acético Glacial (Dinamica, São Paulo, Brasil)
- Acido gálico
- Agua destilada
- Alcohol etílico Absoluto (Exodo científica, São Paulo, Brasil)
- Bromuro de sodio
- Carbonato de sodio Anhidro
- Folin Ciocalteu
- Glicerina (Synth, São Paulo, Brasil)
- Hidróxido de sodio
- Metanol ($\geq 95\%$)
- Papel filtro
- Persulfato de potasio
- Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid)

2.3 Métodos

2.3.1 Extracto acuoso de propóleo (EAP)

Para la obtención del extracto acuoso de propóleo fue utilizada la metodología de Lemos Costa (91). Se añadió 10 g de propóleo molido en 50 mL de solución de hidróxido de sodio al 15% de concentración alcalina. Esta solución se agitó por 10 minutos en un agitador mecánico a una velocidad de 650 rpm (Heidolph, Modelo RZR 2020). Posteriormente se dejó en el shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil) por 12 h. Después se volvió nuevamente agitar en el agitador mecánico a 650 rpm por 10 min, concluido el tiempo se filtró con la ayuda de la bomba al vacío.



Figura N° 18. Extracto acuoso de propóleo.

2.3.2 Elaboración de los films

Los films se realizaron por la técnica de *Casting* a partir de una solución de 3% (p/v) de almidón de papa nativa en agua destilada, esta solución se agitó lentamente para evitar la formación de burbujas. Luego, la suspensión se calentó a 75 °C con agitación magnética (IKA C-MAG HS7-Marconi, Piracicaba-Brasil) durante 30 min. Se añadió el agente plastificante que es el Glicerol (35 g de plastificante / 100 g de almidón) y el extracto acuoso de propóleo (0.5, 10 y 30% de extracto de propóleo seco en relación al almidón) cinco minutos antes del tiempo final de calentamiento de las soluciones. Las soluciones pasaron por el ultrasonido (Modelo USC-1400) durante 30 minutos para la eliminación de las burbujas.

Posteriormente, se colocó la suspensión con un peso de 0.15 g / m² sobre placas de acrílico (18 x 21 cm) y se secó en un horno de circulación forzada (BOD modelo SL 200-364, marca SOLAB, Piracicaba, Brasil) a 42 °C durante 20 horas.

Antes de la caracterización, los films secos se despegaron de las placas de acrílico, se cortaron en formas específicas para diversas pruebas y se almacenaron a 25 °C a una HR de 58% durante 48 h en desecadores que contienen una solución saturada de NaBr.

Tabla N° 8. Formulación de los films a base de almidón de papa nativa y extracto acuosos de Propóleos.

% Almidón	% Extracto de propóleos
	0
3	0.5
	10
	30

2.3.3 Caracterización de los films

2.3.3.1 Opacidad

La opacidad del film se midió usando el espectrofotómetro Femto 600 Plus, (Brasil) (187). Los films fueron cortados en piezas rectangulares y se colocaron dentro de la celda de prueba del espectrofotómetro. La celda en blanco se usó como referencia. La absorbancia de las películas se registró a 600 nm y la opacidad se calculó según la siguiente ecuación 5:

$$\text{Opacidad} = \frac{A_{600}}{D}$$

Ecuación N° 1. Determinación de la opacidad del film.

Donde:

A₆₀₀: absorbancia del film a 600 nm

D: espesor del film (mm).

2.3.3.2 *Espesor del film*

El grosor de los films preacondicionados (58% HR, 25 ° C) se evaluó con la ayuda de un micrómetro digital Zaas-Precision con una punta plana (con una resolución de 1 µm). Se realizaron 10 mediciones en posiciones aleatorias para determinar el grosor promedio.

2.3.3.3 *Humedad*

La humedad de los films se determinó de acuerdo con la técnica de ASTM D644-99 (188). Se colocó aproximadamente 1 g del film en una placa y se llevó a la estufa (Quimis, Q314M292, Brasil) a 105 ° C por 24 horas. El contenido de humedad de los films se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Contenido de humedad (\%)} = \left(1 - \frac{mf}{mi}\right) \times 100$$

Ecuación N° 2. Contenido de humedad.

Donde:

Mi: masa inicial de los filmes (g)

Mf: masa final de los filmes (g).

2.3.3.4 *Propiedades mecánicas*

Se realizaron pruebas de tracción mecánica en un texturómetro TA XT Plus (TA Instrument, Inglaterra) utilizando el software de la versión “Texture Expert 1.22”. Los análisis se realizaron por sextuplicado. La resistencia a la tracción y el alargamiento a la rotura en las pruebas de tracción se determinaron de acuerdo con el estándar ASTM D882-95 (189).

Los films se cortaron de acuerdo con la figura 19 y se sometieron a tracción con una velocidad de 1.0 mm / s, comenzando desde una separación inicial de 80 mm, hasta la ruptura del film. El módulo de elasticidad, o módulo de Young, se obtuvo de la tangente en la región lineal de la curva.

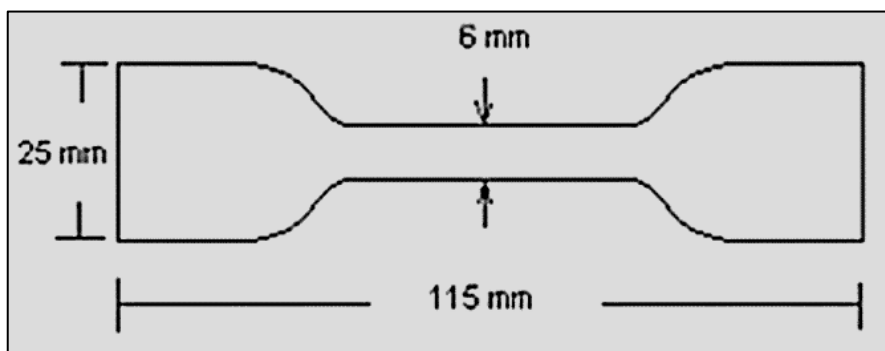


Figura N° 19. Muestra para prueba de tracción.

**Adaptado de Maniglia (190).*

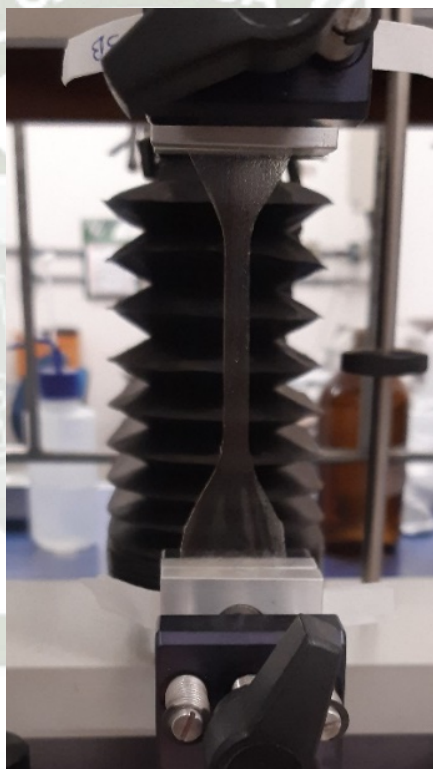


Figura N° 20. Muestra de film almidón fijada en agarres del texturómetro lista para ejecutar la prueba mecánica de acuerdo con el método estándar ASTM D882-95.

2.3.3.5 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad al vapor de agua de los films se determinó de acuerdo con el método estándar ASTM E96-95 modificado (191). Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado. Las muestras de film se fijaron en soportes de aluminio con una abertura circular de 34 mm, correspondiente al área del film expuesta para el

intercambio, sellada herméticamente y que contenía gel de sílice en el interior (0% HR). Los soportes de aluminio se colocaron dentro de desecadores que contenían agua destilada (100% HR, $P = 3.167 \text{ KPa}$ a $25^\circ \text{C} \pm 2^\circ \text{C}$), con un ambiente equilibrado durante 48 h antes del análisis.

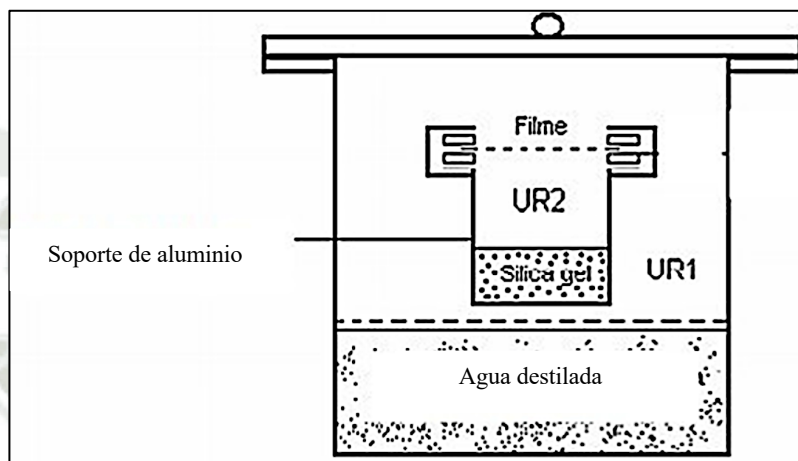


Figura N° 21. Esquema del medio utilizado para determinar la permeabilidad al vapor de agua de PVA.

* *Adaptado de Maniglia (190).*

La masa del sistema (soporte + film) se determinó en una balanza semi-analítica (Sartorius-BL210S, Alemania) a intervalos de 1 hora durante 7 horas. La tasa de permeabilidad al vapor de agua (PVA) se calculó utilizando la ecuación:

$$PVA = \frac{w\delta}{t A \Delta p} \quad (g \cdot m^{-1} \cdot h^{-1} \cdot KPa^{-1})$$

Ecuación N° 3. Permeabilidad de vapor de agua.

Dónde:

w / t : relación calculada por regresión lineal de los puntos experimentales de ganancia de masa (g) de la celda fue medida en función del tiempo (h) para la zona de estado estable ($r^2 = 0,98$).

A: área de permeación del film (0.00196 m²).

δ : espesor promedio del film (m).

ΔP : diferencia entre la presión parcial de la atmósfera sobre el gel de sílice y el agua pura (3.168 kPa, a 25°C).

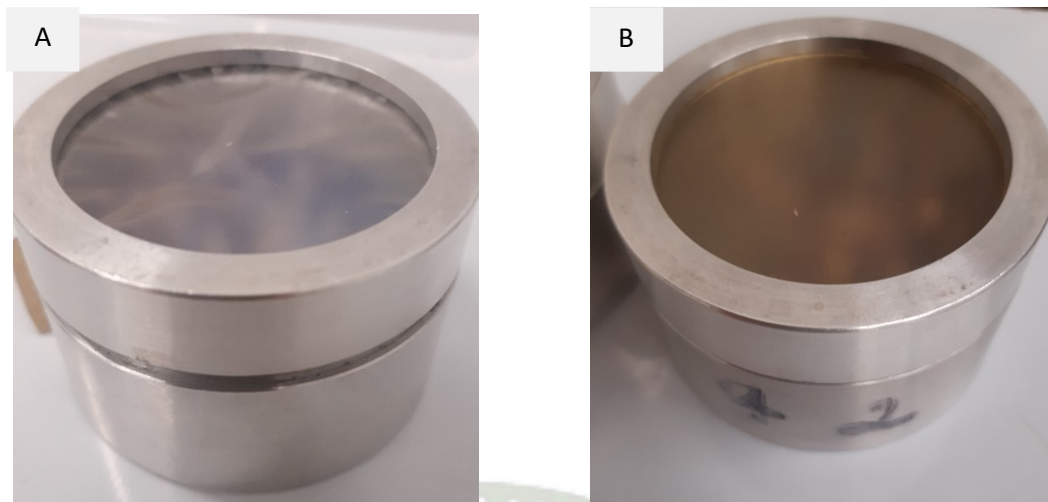


Figura N° 22. Prueba de PVA con el método estándar AS96 E96-95 a los films:
(A) Almidón- 0% EAP y (B) Almidón-10% EAP.

2.3.3.6 Solubilidad en agua

La solubilidad en agua de los films se calculó como el porcentaje de materia seca de film solubilizada después de la inmersión durante 24 horas en agua a 25 ± 2 °C (192), según lo descrito por Tapia-Blácido et al. (193).

Se sumergieron tres discos de cada muestra de film, de 2 cm de diámetro, previamente pesados, en 50 mL de la solución de agua. Se mantuvieron durante 24 horas a 25 ° C, bajo agitación en un shaker (Solab SL-223, Piracicaba, Brasil), después de lo cual se determinó el contenido de materia seca no solubilizada. La solubilidad se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Solubilidad del film (\%)} = \left(1 - \frac{mf}{mi}\right) \times 100$$

Ecuación N° 4. Solubilidad del film en agua.

Donde:

mf: masa final del film.

mi: masa inicial del film.

2.3.3.7 Solubilidad en etanol

La solubilidad en etanol de los films se calculó como el porcentaje de materia seca de film solubilizada después de la inmersión durante 24 horas en etanol al 70% a 25 ± 2 °C (192), según lo descrito por Tapia-Blácido et al. (193). Similar al ítem 3.3.5, la solubilidad en etanol se calculó de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Solubilidad del film en etanol (\%)} = \left(1 - \frac{m_f}{m_i}\right) \times 100$$

Ecuación N° 5. Solubilidad del film en etanol al 70%.

Donde:

m_f : masa final del film.

m_i : masa inicial del film.

2.3.3.8 Humectabilidad del film (ángulo de contacto)

La determinación de la humectabilidad del film se realizó mediante mediciones del ángulo de contacto con la ayuda del equipo OCA-20 Dataphysics (OCA 20, Dataphysics, Alemania). Las imágenes de una gota de agua (tensión superficial 72.7 mN / m) se tomaron cada 2 minutos a temperatura ambiente. Se tuvo cuidado de dejar la superficie expuesta al secado para la inserción de la gota de agua desionizada. El software que se usó para el procesamiento de imágenes fue GIMP 2.6.8. Los valores de los ángulos de contacto se obtuvieron por triplicado (los ángulos de contacto se midieron con la deposición de gotas de agua desionizada en diferentes regiones del film).

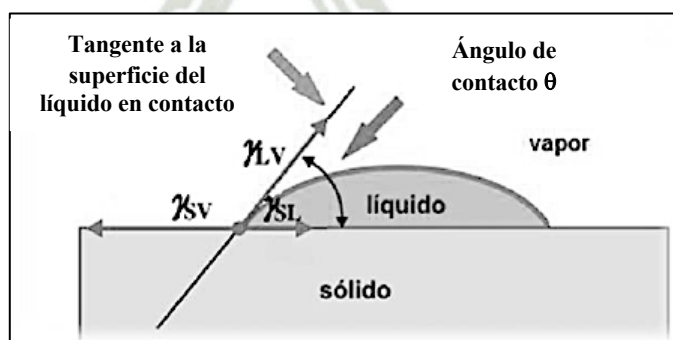


Figura N° 23. Esquema ilustrativo del ángulo de contacto formado por la gota depositada sobre la superficie del film.

* *Adaptado de Cappelari et al. (194).*

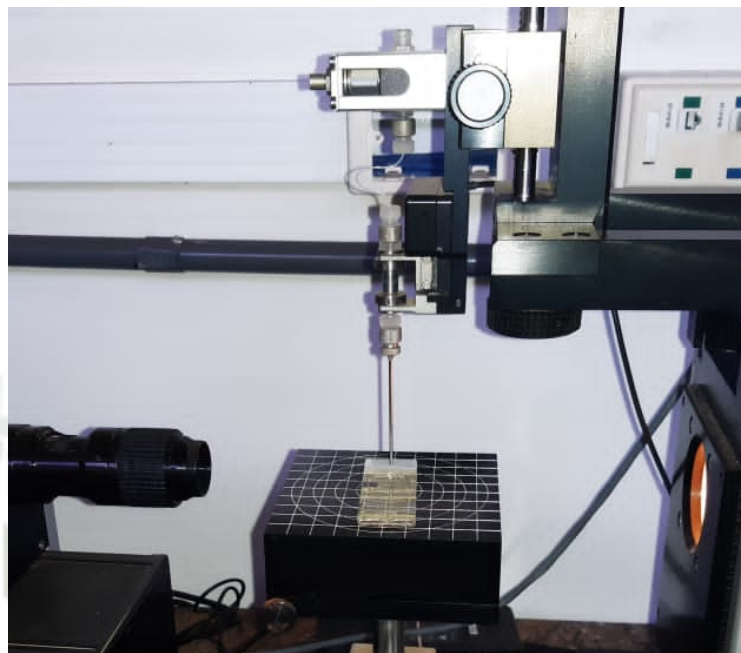


Figura N° 24. Determinación del ángulo de contacto en films de almidón nativo y extracto de propóleo al 0.5%.

2.3.3.9 *Propiedades bioactivas*

A) Extracto para la determinación de las propiedades bioactivas

Se añadió 100 mg de muestra de film en 2 mL del solvente (Agua) y se agitó en un shaker (Solab SL-223, Piracicaba - Brasil) a temperatura ambiente ($\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante 24 horas, en ausencia de luz y luego se filtró con papel de filtro para obtener el extracto.

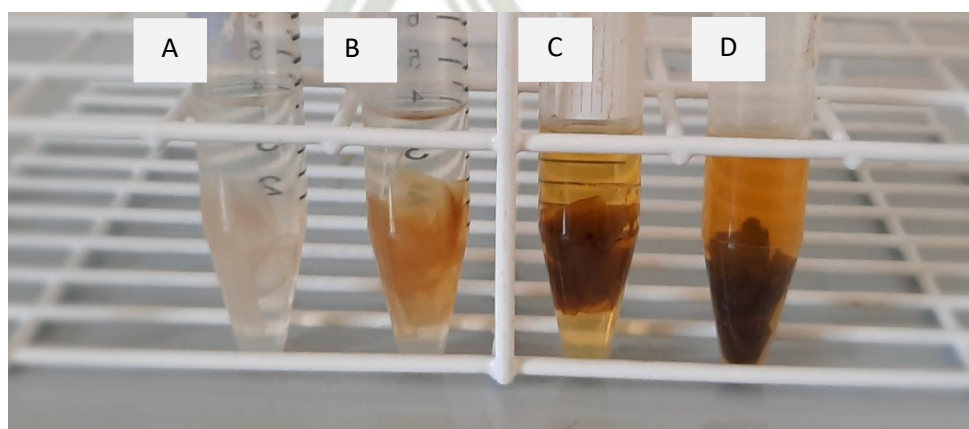


Figura N° 25. Extracto de los films: (A) Almidón-0% EAP, (B) Almidón-0.5% EAP, (C) Almidón-10% EAP y (D) Almidón-30% EAP.

B) Compuestos fenólicos totales

El método de Folin- Ciocalteu es un método colorímetro que consiste en una reacción basada en la transferencia de electrones que miden la capacidad reductora de la muestra, esta metodología es la más utilizada para la determinación de compuestos fenólicos en muestras biológicas y alimentarias (195–198).

El reactivo de Folin-Ciocalteu es una mezcla de ácidos (fosfotúngstico y fosfomolibdico), que se encuentran en el estado de oxidación 6+. Este reactivo se oxida con los iones fenolato, que se generan a partir de la ionización de los compuestos fenólicos en medio alcalino con la adición de carbonato de sodio (196,199). Los fenolatos oxidados generan estructuras quinoides y agentes oxidantes (Mo + 6 / W + 6), al reducirse, cambian el estado de oxidación de (+6) a (+5), generando complejos de color azul (200–202). Esta coloración azul es determina por espectrofotometría y refleja la concentración de CFT, para su expresión se realiza una curva patrón con ácido gálico (GAE) o su equivalente catequina.

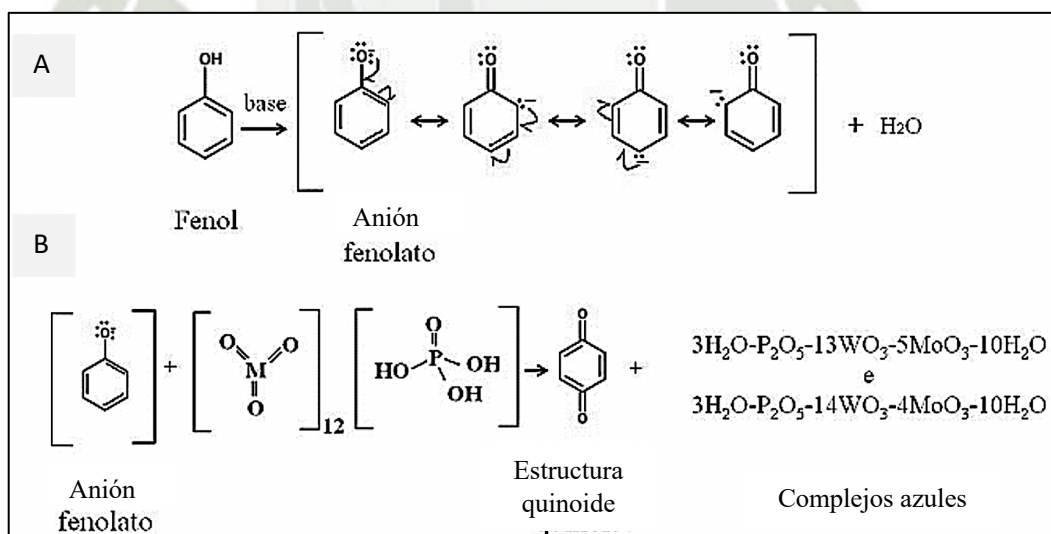


Figura N° 26. Generación de ion fenolato por el método de Folin-Ciocalteu, (A) y la reducción de los compuestos de Molibdeno y Wolframio por el ion fenolato, (B).

* Adaptado de Camarena (202).

La determinación de los compuestos fenólico en los films fue realizada por el método de Folin-Ciocalteu, con la metodología de descrita por Hillis & Swain (203).

Se añadieron 500 μL del extracto con 500 μL de la solución Folin-Ciocalteu (solución acuosa 1: 7), para su posterior agitación de 3 minutos. A continuación, se agregaron 1.0 mL de solución de carbonato de sodio (0,5 M) y se mantuvo en agitación en el shaker (Solab SL-223, Piracicaba - Brasil) por 10 minutos. La absorbancia se midió a 725 nm en el espectrofotómetro (Femto 600 Plus, Brasil). La curva estándar fue construida con ácido gálico (5 a 45 mg. L⁻¹), esta se utilizó para expresar el contenido de CFT en las muestras, los resultados se expresaron en mg de ácido gálico equivalente (EAG) por 100 g de muestra. Los análisis se realizaron por triplicado, se utilizó un blanco compuesto por el solvente (Agua) y reactivos sin extracto.

C) Actividad antioxidante por ABTS

El método ABTS se basa en la cuantificación de la decoloración del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por la reacción con el antioxidante, permite determinar la capacidad antioxidante de compuestos hidrófilos y lipófilos debido a la solubilidad del $\text{ABTS}^{\bullet+}$ en agua y disolventes orgánicos (204). El catión radical ABTS (cromóforo azul / verde) es generado mediante la oxidación de ABTS con persulfato de potasio y se reduce en presencia de donadores de hidrogeno. La disminución de la coloración del catión $\text{ABTS}^{\bullet+}$ al reaccionar con el antioxidante permite la determinación por espectrofotometría a 734 nm. Se expresa la actividad antioxidante en función a la curva patrón con Trolox, un análogo soluble en agua de la vitamina E (205,206).

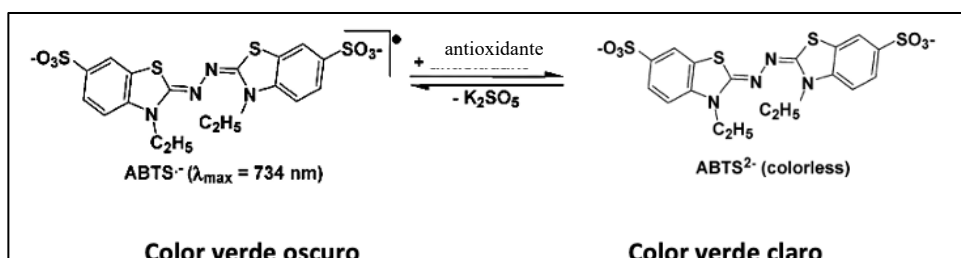


Figura N° 27. Mecanismo de reacción para el ensayo ABTS.

* Adaptado de Huang et al. (198).

La actividad antioxidante del film se midió mediante el método de captura de radicales libres ABTS^{•+} (207). El radical libre ABTS^{•+} se preparó a partir de la reacción de 5 mL de solución madre ABTS (7 mM) con 88 μ L de la solución de persulfato de potasio (140 mM). La solución se almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 16 horas. Después de este período, se diluyó 1 mL de la solución en alcohol etílico hasta que se obtuvieron valores de absorbancia de $0.70 \text{ nm} \pm 0.05$, a 734 nm. Posteriormente, se añadieron 3 mL del radical ABTS^{•+} a 30 μ L de extracto, para luego agitar la solución en un shaker (Solab SL-223, Piracicaba - Brasil) durante 10 minutos. Se determinó la cantidad de radical ABTS^{•+} restante midiendo la absorbancia a 734 nm utilizando un espectrofotómetro (Femto 600 Plus, Brasil). Para expresar los resultados se realizó una curva estándar de Trolox, en concentraciones de 10 a 2000 μ M. Los resultados de la actividad antioxidante se expresaron en mg de equivalente de Trolox (TE) en 100g de muestra. El análisis se realizó por triplicado.

D) Actividad antioxidante por DPPH

Esta metodología se basa en la medición de la capacidad reductora de los antioxidantes frente al radical de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) (206).

El DPPH es conocido como un radical libre estable en virtud de la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. Esta deslocalización da lugar al color violeta intenso. Cuando la solución de DPPH se mezcla con una sustancia donadora de átomos de hidrógeno da lugar la forma reducida de DPPH, perdiendo la coloración violeta y virando a un color amarillo pálido residual del grupo picril restante (196,208). El viraje del color es monitorizado por espectrofotometría a una banda de absorción típica del DPPH de 517 nm (en etanol) (209).

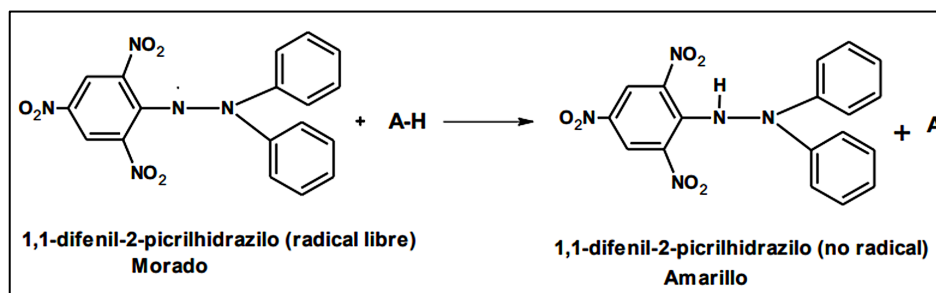


Figura N° 28. Mecanismo de acción del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH).

* Adaptado de Jennifer (210).

La actividad antioxidante del film se midió utilizando el radical estable 2,2-difenil-1-picrylhydrazyl (DPPH) con la metodología de Martins, Cerqueira, & Vicente (211).

Se añadió 500 μ L del extracto con 2 mL de la solución de DPPH (0.06 mM), se coló en agitación por 30 minutos en oscuridad y protegidos de la luz. El control utilizado fue 500 μ L de solución etanólica DPPH (0.06 mM), sin el film y para el blanco, solo se usó etanol. El DPPH remanente fue determinado en 517 nm en un espectrofotómetro (Femto 600 Plus, Brasil). La actividad antioxidante del film, se calculó de acuerdo con la ecuación y se expresó como un porcentaje de la actividad antioxidante (AA_{DPPH}).

$$AA_{DPPH} = 100 \times \left(1 - \left(\frac{A_{muestra}}{A_{control}}\right)\right)$$

Ecuación N° 6. Determinación de DPPH en porcentaje.

Dónde:

AA_{DPPH} : actividad antioxidante por DPPH.

$A_{muestra}$: La absorbancia de la solución que contiene la muestra

$A_{control}$: La absorbancia de la solución DPPH sin adición de película.

2.4 Diseño experimental

En la figura 29, se muestran todas las operaciones y análisis que se realizaron para desarrollar y caracterizar los films de almidón de papa nativa con incorporación del extracto de propóleos verde.



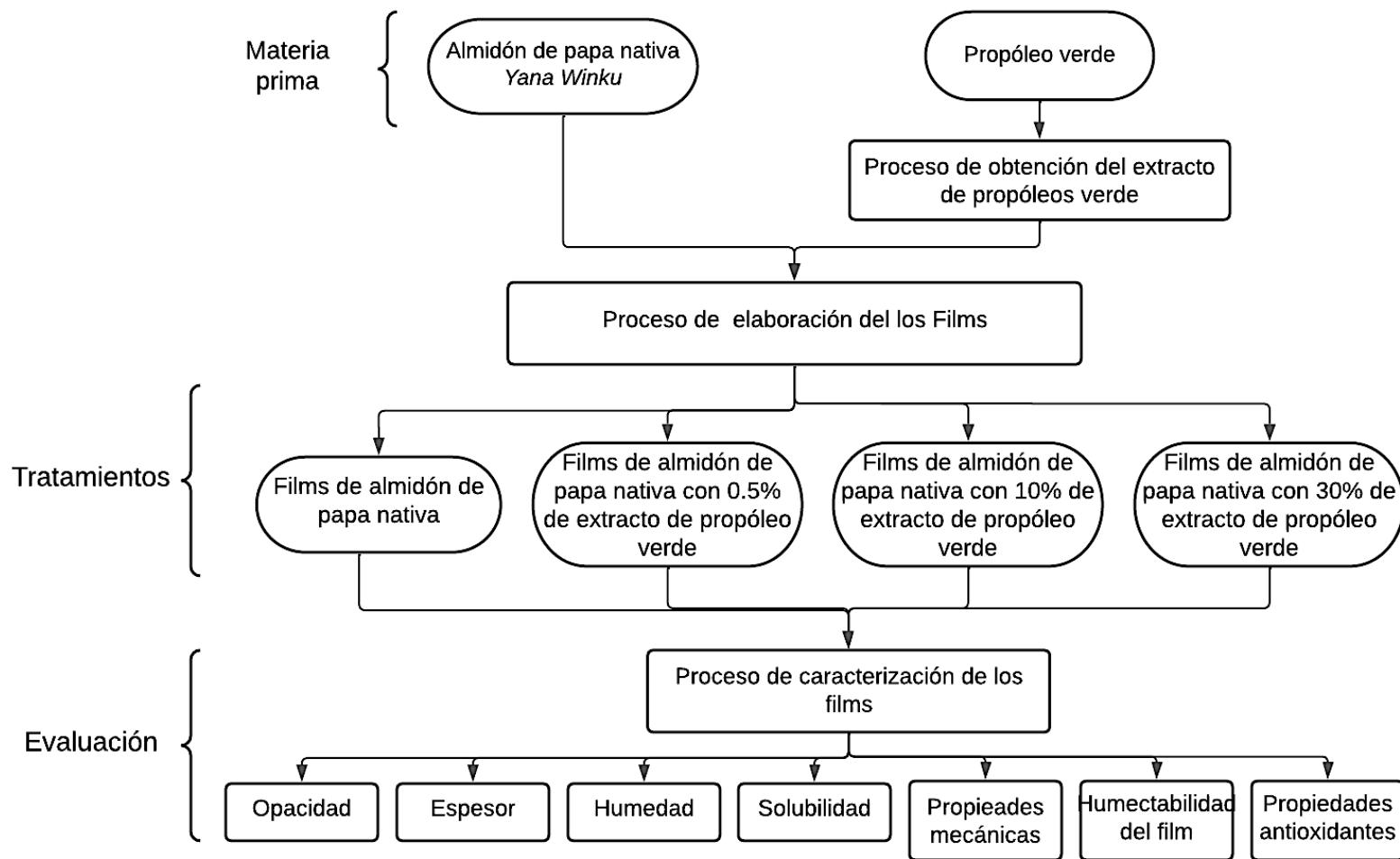


Figura N° 29. Esquema experimental general de la investigación.

2.5 Análisis Estadístico

En esta investigación se empleó un diseño completamente al azar (DCA). Los análisis se realizaron mediante el programa estadísticos Statgraphics 19. Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias se realizó mediante Tukey. Se consideró que las diferencias eran significativas en $p < 0.05$. Todos los experimentos se realizaron por triplicado a menos que se indique lo contrario. Se calcularon las medias y las desviaciones estándar.

Modelo estadístico lineal (DCA)

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

- μ = Es el efecto de la media general.
- τ_i = Efecto del i -ésima tratamiento.
- ε_{ij} = Error experimental del j -ésimo tratamiento en la j -ésima repetición.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Caracterización de películas

3.1.1 Aspecto visual y opacidad de los films

Las propiedades ópticas como el color, opacidad y transparencia del film son fundamentales debido que puede influir en el interés del consumidor en el producto final en función a su apariencia. Estas propiedades también influyen en la protección del film contra la exposición de luz que acelera la degradación de los alimentos, un mayor valor de opacidad ayuda a proteger a alimentos sensibles a la luz contribuyendo a mantener la frescura, color y calidad en general del producto alimenticio (212). La figura 28, muestra cortes representativos y los valores de la opacidad en films elaborados a partir de almidón nativo y EAP. Todos los films fueron atractivos, homogéneos, con un ligero brillo, fáciles de manejar y con ausencia de partículas insolubles observadas visualmente. La incorporación de EAP en la matriz polimérica provocó una coloración naranja profundo en los films, diferente al film de almidón que lucía transparente. A una mayor concentración EAP, se observó un aumento en la coloración naranja en los films por la presencia de pigmentos naturales como la clorofila y los carotenoides característicos del extracto de PR. Este efecto era esperado debido a que la coloración del extracto de PR va a tener influencia en la coloración del film debido a que no tiene que competir con la coloración del almidón por ser incolora (213–215). Sivarooban et al. (216), señalaron que la incorporación de extractos que poseen compuestos fenólicos, como el extracto de semilla de uva otorgan una coloración rojiza-amarillenta en los films a base de gelatina. Reyes et al. (217), indica que el extracto etanólico de propóleo rojo le otorga una coloración rojiza a films a base de gelatina, por la presencia de pigmentos rojos como retusapurina B y retusapurina A (chalcones condensadas en una isoflavona) en el extracto de PR. Farias (212), mostro que la incorporación de EAP no produjo una variación significativa en la coloración del film a base de almidón de yuca por la incorporación de harina de Nopal a la matriz polimérica, pues este tuvo mayor influencia la coloración del film. La opacidad de los films estuvo en un rango de 2.31 a 8.89, el menor valor de opacidad se encontró en el

film de almidón nativo. El aumento en la concentración de EAP provocó un aumento en la opacidad, indicándonos que podría disminuir la transparencia de los films. Se ha reportado efectos similares en films a base de polisacáridos que incorporan compuestos fenólicos naturales (21,218,219). Lopes de Paula (215), obtuvo valores más altos de opacidad con la incorporación de harina de cúrcuma por el aumento en la concentración de curcuminoides. Mironescu et al. (220) indican que la incorporación de PR en films de almidón conduce a un color más atractivo señalado por el panel sensorial, con lo cual puede ser una ventaja para la aplicabilidad del PR en la industria de empaques.

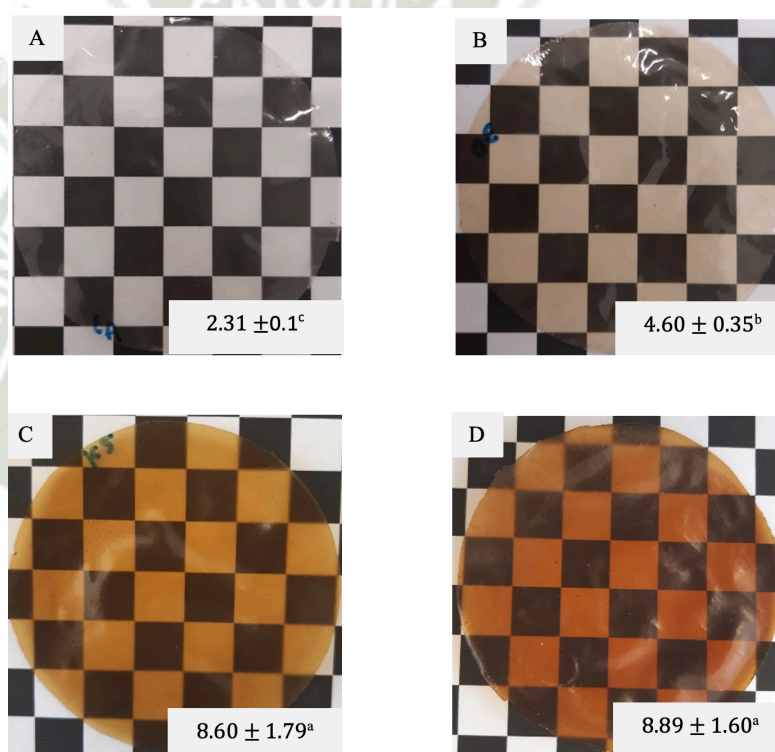


Figura N° 30. Aspecto visual y opacidad de los films, A) Almidón-0% EAP, B) Almidón-0.5% EAP, C) Almidón-10% EAP y D) Almidón-30% EAP. Opacidad se expresó en A600/mm.

*Los valores son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los superíndices diferentes en las mismas columnas indican una diferencia significativa entre los films, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.1.2 Espesor de los films

El espesor de los films se mantuvo en un rango de 0.072 – 0.090 mm, sin diferencia estadística entre los films analizados. Esto demuestra que la incorporación de EAP no tuvo ningún efecto en esta característica. Similares resultados fueron reportados por Farias (212), Oliveira (221), Bitencourt et al. (222), Kanmani & Rhim (223) y Wu et al. (146); que muestran la no interferencia de extractos vegetales (propóleos, pitangueira, guaraná, menta, cúrcuma, extracto de semilla de uva, té verde) en el espesor de los films a base de diferentes polímeros.

Tabla N° 9: Espesor en films a base de almidón y EAP.

Extracto acuoso de propóleos (%)	Espesor (mm)
0	0.081±0.01 ^a
0.5	0.072±0.02 ^a
10	0.090±0.03 ^a
30	0.085±0.01 ^a

*Los valores son la media de diez repeticiones ± desviación estándar. Los superíndices diferentes en las mismas columnas indican una diferencia significativa entre los films, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.1.1.3 Propiedades mecánicas de los films

La tabla 10, muestra el efecto de la incorporación del EAP en las propiedades mecánicas (tensión, elongación y módulo de Young) en los films a base de almidón de papa nativa.

La incorporación de EAP a concentraciones de 10 y 30%, logro afectar la tensión y elongación del material. Este comportamiento se da puesto que el extracto posee compuestos antioxidantes, fenoles y flavonoides que podrían llegar afectar las interacciones intermoleculares entre la cadena de almidón interrumpiendo su estructura cristalina. Además, el propolis es un material de naturaleza amorfa que va alterar la configuración espacial entre las cadenas de almidón del material (224,225). Similares resultados fueron reportados en otros trabajos de investigación que trabajaron con extractos naturales, señalando que posiblemente la dispersión de los componentes antioxidantes en la matriz polimérica puede haber provocado la aparición de áreas discontinuas (22,215,221). Respecto al MY, se puede apreciar

que el film que incorpora 10% de EAP es un material más rígido comparado con los otros films; mientras que el film menos rígido fue el que incorpora EAP al 0.5%. Hasta la fecha existen pocos trabajos en la literatura que hayan investigado la interacción del extracto acuoso de propóleo con diferentes matrices poliméricas. Estos resultados demuestran que la incorporación EAP en la matriz polimérica de almidón llega a tener un impacto estadísticamente significativo en las propiedades mecánicas del material, sin embargo este impacto es leve comparando a los beneficios que otorga la incorporación del extracto en mi material especialmente por sus compuestos bioactivos que son de gran interés para la industria alimentaria.

Tabla N° 10. Las propiedades mecánicas de los films con almidón y EAP (Tensión, Alargamiento y Módulo de Young).

Extracto acuoso de propóleos (%)	TS (MPa)	E (%)	MY (MPa)
0	3.94±0.22 ^a	39.43±0.46 ^a	55.43±7.70 ^{ab}
0.5	3.99±0.32 ^a	39.08±5.85 ^a	69.03±4.96 ^a
10	2.58±0.12 ^b	27.62±2.68 ^b	51.53±6.97 ^b
30	2.28±0.23 ^b	20.24±0.93 ^b	66.33±9.37 ^{ab}

*Los valores son la media de seis repeticiones ± desviación estándar. Los superíndices diferentes en las mismas columnas indican una diferencia significativa entre los films, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.1.4 Humedad y PVA de los films.

Entre los principales problemas de los films a base de polisacáridos es la sensibilidad al agua debido a que la función de los films es a menudo impedir la transferencia de humedad entre los alimentos y la atmósfera circundante, o entre dos componentes de un producto alimenticio heterogéneo. Los valores de Humedad y PVA de los films se encuentran en la tabla 11. El contenido de humedad del film de almidón nativo fue de 15.65%, similar a lo reportado en otros trabajos de investigación que utilizaron almidón de papa y almidón de yuca como matriz polimérica (212,226). El EAP en la matriz polimérica provocó una disminución

significativa ($p < 0.5$) de esta característica en función a su concentración. Posiblemente este efecto este ligado a la gran cantidad de moléculas hidrofóbicas presentes en el PR, como las ceras y aceites esenciales (91). Este resultado fue similar a lo reportado por Ismail, et al. (227), Bodini, (22); Farias (212); y Pérez-Vergara et al. (226). Se han realizado varios estudios relacionados con la disminución del contenido de humedad por el aumento de la hidrofobicidad de los films. Martins, Cerqueira, & Vicente (211) encontraron que la adición de α -tocoferol (Vitamina E) condujo a una disminución en la humedad en los films de quitosano y esta disminución de la humedad está en función a la concentración α -tocoferol; este comportamiento se atribuye a la naturaleza hidrófoba del α -tocoferol. En tanto Correa Pacheco et al. (228); menciona que la adición de EEP (10, 20 y 30%) en films de quitosano y nanopartículas de quitosano no tienen efecto significativo en el contenido humedad en los films.

Los valores de PVA de los films estuvieron en un rango de $10.99 - 15.38 \times 10^{-9}$ g.m/(min.m².Pa). La incorporación del EAP en los films no produjo cambios significativos en esta característica, probablemente por un efecto equilibrado con la adición de EAP, a pesar del carácter hidrofóbico del extracto. Hromiš et al. (229) y Bonilla et al. (230), mencionan que existen diferentes factores afectan al PVA, cuando se incorpora un componente hidrofóbico : 1) aumento de la naturaleza hidrofóbica de la matriz polimérica, 2) las interacciones polímero-lípido y 3) su efecto en las fuerzas de unión de las cadenas de la red. Puede ocurrir efectos contrarios con la adición de un compuesto hidrofóbico en una matriz polimérica de quitosano provocando la debilitación de las fuerzas de agregación de la cadena del quitosano que desemboca en la disminución de las fuerzas de cohesión de la red de polímeros y el aumento en general el carácter hidrofóbico de la matriz polimérica por la adición de este componente hidrofóbico. Si el carácter hidrofóbico de la matriz polimérica predomina sobre el efecto de la pérdida de cohesión de la matriz provoca PVA limitado. Otra posibilidad es el efecto equilibrado, en la que no se produce ningún cambio en la PVA por la adición de componentes hidrofóbicos. Bodini (22) reporto que las altas concentraciones de EEP altera la interacción de la matriz polimérica con el agua, mostrando una reducción del PVA en función de la concentración EEP en films plastificados con citrato de acetiltributilo. Del mismo modo Pastor et al. (21), indica que la incorporación de EEP en la matriz polimérica

de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), reduce el PVA. Los autores indicaron que mayor cantidad de EEP, modificaba las relaciones de agua-HPMC, por lo tanto, reducirá la capacidad de las cadenas de polímero para unirse con moléculas de agua. Mientras que una baja cantidad de EEP, la matriz polimérica era la principal responsable de la absorción de agua y no parece tener lugar las interacciones notables con los compuestos de EEP. Siripatrawan & Vitchayakitti (231) indican que la adición de EAP condujo a una disminución del PVA, esta disminución no cambio con cantidades crecientes de PR en films de quitosano. El autor también lo atribuye a la unión de los compuestos fenólicos en la matriz de quitosano limitando a la formación de enlaces con el agua.

Tabla N° 11. Humedad y la permeabilidad al vapor de agua (PVA) en films a base de almidón nativo y EAP.

Extracto acuoso de propóleos (%)	Humedad (%)	PVA
0	15.65 ± 0.96 ^a	12.84 ± 1.77 ^a
0.5	13.72 ± 1.57 ^{ab}	10.99 ± 1.23 ^a
10	9.81 ± 0.30 ^c	15.38 ± 2.84 ^a
30	11.80 ± 0.99 ^{bc}	15.09 ± 2.03 ^a

*Los valores son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los superíndices diferentes en las mismas columnas indican una diferencia significativa entre los films, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

*PVA (10^{-9} g.m/(min.m².Pa)).

3.1.5 Solubilidad de los Films

En la tabla 12, muestra la solubilidad en agua y etanol al 70% de los films a base de almidón y EAP. Generalmente, una mayor solubilidad indicaría una menor resistencia al agua. No obstante, una alta solubilidad puede ser una ventaja para algunas aplicaciones y puede ser un factor importante que determina la biodegradabilidad de los films cuando se usa como envoltura de embalaje. La solubilidad en agua del film oscilo entre 14.04 a 25.33%, la incorporación de EAP no produjo diferencia significativa entre las formulaciones, con excepción de la

concentración de EAP al 10%. Similar a lo que ocurrió en PVA, puesto que la adición de EAP en la matriz polimérica produjo un efecto equilibrado, a pesar de los compuestos hidrofóbicos que contiene el PR. Estas diferencias en la solubilidad de los films ofrecen innumerables ventajas en su aplicabilidad: para mantener la integridad del producto se requieren films con baja solubilidad y para revestimientos comestibles de productos frescos o mínimamente procesados se requerirá films alta solubilidad (232,233). Oliveira (221), evidencio que la incorporación de extractos naturales (pitangueira, guaraná, menta) no produjo ningún efecto en la solubilidad en agua del film a base de gelatina, con lo cual no contribuyeron a alterar la hidrofobicidad/hidrofilia de los films. Bodini (22), menciona que la incorporación de EEP produjo una ligera disminución de solubilidad en agua de los films a base de gelatina, lo atribuye a la distribución del extracto de PR en la matriz y las posibles interacciones de los polifenoles con la proteína. Pérez-Vergara et al. (226) mencionan la disminución de la solubilidad en agua de los films por la incorporación de componentes hidrofóbicos, por la fuerte interacción del componente hidrofóbico con la matriz polimérica y disminución por la afinidad del film hacia el agua. Similares reportes fueron encontrados mencionando la disminución de solubilidad de agua con la incorporación del componente hidrofóbico en la matriz polimérica (227,228,234).

Los films serán utilizados para recubrir productos alimenticios con lo cual es necesario evaluar su interacción con los desinfectantes, como el hipoclorito de sodio al 0.5% (NaClO) y productos a base de etanol (al menos 70%). Debido a que la mayoría de consumidores a menudo eligen con cuidado los alimentos que van a comprar, leen las etiquetas en productos embalados o los tocan cada vez que recogen un producto o devuelven productos a la estantería con lo cual es necesario su desinfección antes del consumo y más en esta situación de emergencia sanitaria. En la tabla 12, se puede observar que no existe diferencia significativa en los films que incorporación EAP a una concentración de 0.5 y 10% con respecto al film de almidón nativo. Sim embargo a una concentración de 30% si existe tal diferencia estadística, obteniéndose un aumento en la solubilidad en etanol de 19.86% a 26.09%.

Tabla N° 12. Solubilidad en agua y etanol al 70% en films a base de almidón nativo y extracto acuoso de propóleos.

Extracto acuoso de propóleos (%)	Solubilidad en agua (%)	Solubilidad en alcohol 70% (%)
0	25.33 ± 1.58 ^a	19.86 ± 0.98 ^b
0.5	23.33 ± 2.38 ^a	22.13 ± 1.20 ^b
10	14.07 ± 2.18 ^b	21.00 ± 1.58 ^b
30	22.15 ± 1.04 ^a	26.09 ± 1.58 ^a

*Los valores son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los superíndices diferentes en las mismas columnas indican una diferencia significativa entre los films, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.1.6 Ángulo de contacto de los Films

En la tabla 13, se observan los valores de ángulo de contacto en el film de almidón nativo y films que incorporan EAP. El ángulo de contacto en el film de almidón se encuentra en un valor de 44.35°, mostrando una superficie hidrofílica. La incorporación de EAP a la matriz polimérica mostró diferencias significativas entre las diferentes formulaciones de films, para la formulación de 0.5% de EAP se encontró el valor más bajo de ángulo de contacto (30.50°). Contrariamente a una concentración de 10 y 30% EAP se encontraron los valores más altos de ángulo de contacto (57.13° y 63.58°), sin diferencia estadística entre ellos. Este comportamiento se atribuye a que el EAP tiende a cambiar las propiedades superficiales de los films a dominios más hidrofóbicos por su composición (hidrofobicidad presente en las ceras) (212). En el mismo sentido se encontraron otros trabajos de investigación que reportaron el aumento de la hidrofobicidad en la superficie del film, por la incorporación de componentes hidrofóbicos en la matriz polimérica (228,235). Farias (212), reporta un incremento de 57.7° a 67.33° con la adición de 0.066 g de extracto seco de PR a la matriz polimérica de almidón de yuca. En la misma dirección Eskandarinia et al. (236), encontró un aumento de hidrofobicidad en la superficie del film de 47.30° a 73.45° en función a la concentración del EEP añadida a una matriz polimérica de almidón de maíz.

Tabla N° 13. Ángulo de contacto en films a base de almidón nativo y extracto acuosos de propóleos.

Extracto acuoso de propóleos (%)	Ángulo de Contacto (°)
0	44.35±3.91 ^b
0.5	30.50 ± 2.02 ^c
10	57.13±2.97 ^a
30	63.58±1.02 ^a

*Los valores son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los superíndices diferentes en las mismas columnas indican una diferencia significativa entre los films, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

3.1.7 Compuestos bioactivos

Los CFT de los films de almidón nativo y EEP se puede observar en la Tabla 14. Encontrándose diferencias estadísticas en las diferentes formulaciones de los films, CFT está en un rango de 5.90 - 641.64 mg GAE/ 100g film. El film de almidón nativo presento una baja concentración de compuestos fenólicos, esto se debe a la baja concentración utilizada (3%) en el film. El almidón utilizado proveniente de la papa nativa *Yana Winku* posee un alto valor de CFT (761.31 mg TE/100 g b.s). La incorporación de EAP a una concentración de 0.5% (EAP) no evidencio diferencia significativa con el film que contenía solo almidón, probablemente por la concentración baja utilizada de EAP. Contrariamente a concentraciones de 10 y 30% de EAP, donde si se encontró una diferencia significativa de CFT, su incremento estaba en función a la concentración de EAP. Similar a lo reportado por Costa et al. (237) y Siripatrawan & Vitchayakitti (231), que reportaron el aumento lineal de CFT en función a la concentración de extracto PR. El film que incorpora una concentración de 30% EAP posee el valor más alto de CFT (641.64 mg GAE/ 100g film), esto esta relaciona con la coloración tan intensa de este film. De esta manera se comprueba que la matriz polimérica fue capaz de preservar los compuestos fenólicos del EAP, durante el periodo de homogenización con temperatura (75 ° C por 30 min) y el proceso de secado (42 ° C por 20 h). García Silveira (238) señalo el fenómeno de la reducción de los CFT en el proceso de

elaboración de los films por la sensibilidad de los compuestos activos a la temperatura en la etapa de homogenización (85 ° C por 2 h).

La importancia de la incorporación de compuestos fenólicos en la matriz polimérica de los films ayuda a inhibir la reacción de oxidación lipídica que se puede producir en diversos alimentos, por las propiedades reductoras de estos compuestos que llegan a reaccionar con los radicales libres conduciendo a la inhibición de la peroxidación lipídica evitando olores rancios, sabores desagradables en el alimento, formación de aldehídos y pérdida nutricional (231,239).

Tabla N° 14. Compuestos fenólicos totales de los films.

Extracto acuoso de propóleos (%)	CFT (mg GAE/ 100g film)
0	5.90 ±2.19 ^c
0.5	38.36 ± 4.48 ^c
10	336.13 ±7.45 ^b
30	641.64 ±54.03 ^a

*Los valores son la media de tres repeticiones ± desviación estándar. Los superíndices diferentes en las mismas columnas indican una diferencia significativa entre los films, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

La actividad antioxidante de los films a base de almidón nativo con incorporación de EAP, puede ser observada en Tabla 15. Estas fueron evaluadas por las metodologías de DPPH y ABTS. Estas metodologías, aunque tienen el mismo principio de eliminación del radical poseen ciertas diferencias. El método DPPH permite solo determinar compuestos hidrofílicos diferente al método ABTS que determina compuestos hidrofílicos y lipofílicos (240). Se puede apreciar que el film de almidón de papa nativa *Yana Winku* no posee actividad antioxidante dando por ABTS como por DPPH, esto se debe principalmente a la concentración utilizada. Sin embargo al evaluar por ambos métodos la capacidad antioxidante de las diferentes formulaciones se encontró diferencias significativas en función a la concentración utilizada de EAP, obteniéndose valores más altos de capacidad antioxidante a mayor concentración de EAP.

En el caso de DPPH se expresó en porcentaje de inhibición, los resultados están en un rango de 0 - 79.23%. En el caso de la concentración de EAP de 10 y 30%, no se encontró diferencias significativas, esto se pudo deber a la interferencia de la coloración del extracto. Estos resultados eran los esperados por la elevada capacidad antioxidante presente EAP (91). Los resultados por el método ABTS se encontraron en un rango de 0-11496.00 $\mu\text{mol TE}/100\text{g film}$. La contracción de 30% EAP, presentó el valor más alto de inhibición del radical ABTS.+ . Similares resultados fueron reportados con la adición de extractos vegetales (213,214,217,240–243). Oliveira, (2017); mostro el aumento de la actividad antioxidante por ABTS y DPPH en los films que incorporan los extractos acuosos de vegetales (Pitangueira, Guaraná y Menta), este incremento en la actividad antioxidante está en función a la contracción de los extractos. Zhao & Saldaña (244); observo el aumento de la actividad antioxidante y compuestos fenólicos con la incorporación de cascara de papa en los films con almidón de descarte, en función a la cantidad de cascara añadida (CFT, aumento de 0,3 - 6,1 mg de equivalente de ácido gálico / g de film; mientras que para FRAP y DPPH aumenta en 1.1 – 73.1 mg de TE equivalente / g film y 1.5 – 93.2 mg equivalente TE / g film, respectivamente).

Tabla N° 15. Actividad antioxidante de los films

Extracto acuoso de propóleos (%)	DPPH (%)	ABTS ($\mu\text{mol TE}/100\text{g film}$)
0%	0.00 ± 0.00^c	0.00 ± 0.00^c
0.5%	31.38 ± 2.36^b	53.96 ± 10.13^c
10%	79.23 ± 2.82^a	3873.72 ± 904.46^b
30%	74.26 ± 1.06^a	11496.00 ± 247.00^a

*Los valores son la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Los superíndices diferentes en las mismas columnas indican una diferencia significativa entre los films, según la prueba de Tukey ($p < 0.05$).

CONCLUSIONES

Este trabajo de investigación demostró que la incorporación de extracto acuoso de propóleos (EAP) en films a base de almidón de papa nativa (*Yana Winku*) les confirió propiedades activas a los films (compuestos fenólicos totales y compuestos antioxidantes) debido a la presencia de compuestos fenólicos en el EAP, los cuales se mantienen en el filme.

La humedad y humectabilidad de los films tuvieron mudanzas en función a la adición del EAP, provocando el aumento de la hidrofobicidad en la superficie del film y disminuyendo la humedad causada por la presencia de ceras en el extracto de propóleo. Las propiedades mecánicas también fueron levemente afectadas a una concentración de 10 y 30% de EAP debido principalmente a la naturaleza amorfa del extracto y a los compuestos antioxidantes que pueden afectar las interacciones intermoleculares de la cadena del almidón. Las propiedades de PVA y solubilidad en agua de los films no presentaron diferencias significativas, con excepción del film con 10% de extracto EAP. Con lo cual si bien el EAP no mejoro dichas características tampoco afectó las características iniciales por su efecto equilibrado que produce con su incorporación en la matriz polimérica.

El mejor resultado se obtuvo con una formulación de 10% de EAP en la matriz polimérica; puesto que le otorgó mejores características al film de almidón: mayor ángulo de contacto (superficie más hidrofóbica); y disminución de la humedad, solubilidad en agua, y solubilidad en etanol. Asimismo, le proporciona características activas al film de almidón por los valores elevados de CFT (336.13 ± 7.45 mg GAE/ 100g film) y capacidad antioxidante (79.23 ± 2.82 % de inhibición del radical de DPPH y 11496.00 ± 247.00 $\mu\text{mol TE}/100\text{g film}$).

RECOMENDACIONES

Para dar continuidad al estudio de extracto acuoso de propóleos y almidón nativo de papa como materias primas para la elaboración de films biodegradables, son presentadas algunas sugerencias para futuros trabajos de investigación:

- Estudio de la biodegradabilidad de los films.
- Estudiar la actividad antimicrobiana de los films de almidón con extracto acuoso de propóleos contra diferentes microorganismos que afecten la industria alimentaria.
- Estudio de la aplicabilidad como cobertura de los films elaborados partir de almidón de papa nativa con incorporación de extracto de propóleos.
- Incorporación de agentes antimicrobianos en la matriz polimérica, con la finalidad de otorgar actividad antimicrobiana contra microorganismos que afectan a la industria alimentaria.
- Estudiar el efecto de la incorporación de agentes de refuerzo en la matriz polimérica, para la mejorar de las propiedades de barrera y microestructurales de los films.

REFERENCIAS

1. Bishop G, Styles D, Lens PNL. Recycling of European plastic is a pathway for plastic debris in the ocean. *Environ Int.* 2020;142(November 2019):105893.
2. Huang SJ. An Overview of Biodegradable Polymers and Biodegradation of Polymers. Em: Scott G, organizador. *Degradable Polymers*. 2 Edition. London: Springer, Dordrecht; 2002. p. 17–26.
3. Plastics Europe. *Plastics – the Facts 2019 An analysis of European plastics production, demand and waste data* [Internet]. 2019. Disponible em: <https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>
4. D.S Rosa, N.T Lotto, D.R Lopes CGFG. The use of roughness for evaluating the biodegradation of poly- β -(hydroxybutyrate) and poly- β -(hydroxybutyrate-co- β -valerate). *Polym Test.* 2004;23(1):3–8.
5. Plastics Europe. *Bio-based Plastics*. Brussels; 2018.
6. *The New Plastics Economy: Rethinking the Future of Plastics & Catalysing Action*. Ellen MacArthur Foundation. 2017.
7. Jambeck JR, Ji Q, Zhang YG, Liu D, Grossnickle DM, Luo ZX. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science (1979)*. 2015;347(6223):764–8.
8. Ren X. Biodegradable plastics: A solution or a challenge? *J Clean Prod.* 2002;11(1):27–40.
9. Aider M. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology.* 2010;43(6):837–42.
10. Li B, Kennedy JF, Peng JL, Yie X, Xie BJ. Preparation and performance evaluation of glucomannan-chitosan-nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydr Polym.* 2006;65(4):488–94.
11. Mendes JF, Paschoalin RT, Carmona VB, Sena Neto AR, Marques ACP, Marconcini JM, et al. Biodegradable polymer blends based on corn starch and thermoplastic chitosan processed by extrusion. *Carbohydr Polym.* 2016;137:452–8.

12. Shen XL, Wu JM, Chen Y, Zhao G. Antimicrobial and physical properties of sweet potato starch films incorporated with potassium sorbate or chitosan. *Food Hydrocoll.* 2010;24(4):285–90.
13. Acosta S, Chiralt A, Santamarina P, Rosello J, González-Martínez C, Cháfer M. Antifungal films based on starch-gelatin blend, containing essential oils. *Food Hydrocoll.* 2016;61:233–40.
14. Cazón P, Velazquez G, Ramírez JA, Vázquez M. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocoll.* 2017;68:136–48.
15. Silva-Weiss A, Bifani V, Ihl M, Sobral PJA, Gómez-Guillén MC. Structural properties of films and rheology of film-forming solutions based on chitosan and chitosan-starch blend enriched with murta leaf extract. *Food Hydrocoll.* 2013;31(2):458–66.
16. Jonhed A, Andersson C, Järnström L. Effects of film forming and hydrophobic properties of starches on surface sized packaging paper. *Packaging Technology and Science.* 2008;21(3):123–35.
17. Mathew S, Brahmakumar M, Abraham TE. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch–chitosan blend films. *Biopolymers.* 2006;82(2):176–87.
18. Xie F, Zhang B, Wang DK. Starch Thermal Processing: Technologies at Laboratory and Semi-Industrial Scales. *Starch-Based Materials in Food Packaging: Processing, Characterization and Applications.* Elsevier Inc.; 2017. 187–227 p.
19. Adeyeye OA, Sadiku ER, Reddy AB, Ndamase AS, Makgatho G, Sellamuthu PS, et al. The Use of Biopolymers in Food Packaging. Em: Gnanasekaran D, organizador. *Green Biopolymers and their Nanocomposites.* Department of Chemical, Metallurgical and Materials Engineering, Institute of NanoEngineering Research (INER), Tshwane University of Technology, Pretoria, South Africa: Springer Singapore; 2019. p. 137–58.
20. Zuo Y, Gu J, Yang L, Qiao Z, Zhang Y. Study on the preparation of maleated thermoplastic starch by reactive extrusion. *Journal of Thermoplastic Composite Materials.* 2016;29(3):397–409.

21. Pastor C, Sánchez-González L, Cháfer M, Chiralt A, González-Martínez C. Physical and antifungal properties of hydroxypropylmethylcellulose based films containing propolis as affected by moisture content. *Carbohydr Polym.* 11 de noviembre de 2010;82(4):1174–83.
22. Barbosa Bodini R. Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis [Dissertação de Mestrado]. [Pirassununga]: University of São Paulo; 2011.
23. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999;64(3):235–40.
24. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology.* 1998;36(4):347–63.
25. Narbona E, García-García E, Vázquez-Aráujo L, Carbonell-Barrachina AA. Volatile composition of functional “a la piedra” turrón with propolis. *Int J Food Sci Technol.* 2010;45(3):569–77.
26. Escriche I, Juan-Borrás M. Standardizing the analysis of phenolic profile in propolis. *Food Research International.* 2018;106(February):834–41.
27. Oroian M, Ursachi F, Dranca F. Influence of ultrasonic amplitude, temperature, time and solvent concentration on bioactive compounds extraction from propolis. *Ultrason Sonochem.* 2020;64(February).
28. Grommers HE, van der Krogt DA. Potato Starch: Production, Modifications and Uses. Em: *Starch.* Third Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 511–39.
29. De Haan S, Rodriguez F. Potato Origin and Production. Em: *Advances in Potato Chemistry and Technology: Second Edition.* Second Edi. Elsevier Inc.; 2016. p. 1–32.
30. Gestión. De 6,408 variedades de papa registradas en Perú, solo 729 tienen información genética completa. 2019;
31. Silveira AC, Orena S, Medel-Maraboli M, Escalona VH. Determination of some functional and sensory attributes and suitability of colored-and noncolored-flesh

- potatoes for different cooking methods. *Food Science and Technology*. 2020;40(December):395–404.
32. Campos D, Noratto G, Chirinos R, Arbizu C, Roca W, Cisneros-Zevallos L. Antioxidant capacity and secondary metabolites in four species of Andean tuber crops: native potato (*Solanum* sp.), mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón), Oca (*Oxalis tuberosa* Molina) and ulluco (*Ullucus tuberosus* Caldas). *J Sci Food Agric*. 2006;1243(February 2005):1237–43.
 33. Sampaio SL, Barreira JCM, Fernandes Â, Petropoulos SA, Alexopoulos A, Santos-Buelga C, et al. Potato biodiversity: A linear discriminant analysis on the nutritional and physicochemical composition of fifty genotypes. *Food Chem*. 2021;345(September 2020).
 34. Chen JH, Ho CT. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J Agric Food Chem*. 1997;45(7):2374–8.
 35. Jaromír L, Karel H, Matyáš O. Colored Potatoes. Em: *Advances in Potato Chemistry and Technology: Second Edition*. Second Edi. Elsevier Inc.; 2016. p. 249–81.
 36. Sampaio SL, Lonchamp J, Dias MI, Liddle C, Petropoulos SA, Glamočlija J, et al. Anthocyanin-rich extracts from purple and red potatoes as natural colourants: Bioactive properties, application in a soft drink formulation and sensory analysis. *Food Chem*. 2021;342:128526.
 37. Kita A, Bakowska-Barczak A, Lisińska G, Hamouz K, Kułakowska K. Antioxidant activity and quality of red and purple flesh potato chips. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;62(1):525–31.
 38. Lachman J, Hamouz K, Šulc M, Orsák M, Pivec V, Hejtmánková A, et al. Cultivar differences of total anthocyanins and anthocyanidins in red and purple-fleshed potatoes and their relation to antioxidant activity. *Food Chem*. 2009;114(3):836–43.
 39. Brown CR. Antioxidants in potato. *American Journal of Potato Research*. 2005;82(2):163–72.
 40. López DF, Neyra E, Martínez DS. Catálogo de familias generadas a partir de seis variedades de papas nativas con pulpa de color. 2017;

41. Roldan Agripina, Palomino Ladislao, Salas ARice. Catalog of native potato varieties from Apurimac, Cusco and Puno regions - Peru. 2019;
42. Ministerio de Agricultura del Peru. Variedad de papa : Leona Variedad de papa : Sumac Soncco. 2014;
43. Tester RF, Karkalas J, Qi X. Starch - Composition, fine structure and architecture. *J Cereal Sci.* 2004;39(2):151–65.
44. Bello Perez LA, Agama-Acevedo E. Chapter 1 - Starch. Em: Marcelo A. Villar, Silvia E. Barbosa, M. Alejandra García, Luciana A. Castillo OVL, organizador. *Starch-Based Materials in Food Packaging.* Academic Press; 2017. p. 1–18.
45. Zobel HF. Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. *Starch - Stärke.* 1988;40(2):44–50.
46. Zobel HF. Starch Crystal Transformations and Their Industrial Importance. *Starch - Stärke.* 1988;40(1):1–7.
47. Rocha TS, Demiate IM, Franco CML. Structural and physicochemical characteristics of Peruvian carrot (*Arracacia xanthorrhiza*) starch. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos.* 2008;28(3):620–8.
48. McCOMBER DR, OSMAN EM, LOHNES RA. Factors Related to Potato Mealiness. *J Food Sci.* 1988;53(5).
49. Pérez S, Baldwin PM, Gallant DJ. Structural Features of Starch Granules I. Em: *Starch.* Third Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 149–92.
50. Chaléat C, Halley PJ, Truss RW. Mechanical Properties of Starch-Based Plastics. *Starch Polymers: From Genetic Engineering to Green Applications.* 2014;187–209.
51. Schmiele M, Sampaio UM, Pedrosa Silva Clerici MT. Basic principles: Composition and properties of starch. Em: *Starches for Food Application: Chemical, Technological and Health Properties.* Elsevier Inc.; 2018. p. 1–22.
52. Araujo Farro PC. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir de derivados do grão de quinoa (*Chenopodium quinoa Willdenow*) da variedade “Real”. Universidade Estadual de Campinas; 2008.

53. Laura Martins Fonseca. Produção e caracterização de filmes biodegradáveis de amido de batata (*solanum tuberosum* l.) para aplicação em embalagens de alimentos. Universidade Federal Do Pampa; 2015.
54. Schwartz D, Whistler RL. History and future of starch. Em: Starch. Third Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 1–10.
55. Mason WR. Chapter 20 – Starch Use in Foods. Em: Starch. 2009.
56. Semeijn C, Buwalda PL. Potato Starch. Starch in Food: Structure, Function and Applications: Second Edition. Elsevier Ltd; 2018. 353–372 p.
57. Bertoft E, Blennow A. Structure of Potato Starch. Em: Advances in Potato Chemistry and Technology. Second Edi. Elsevier Inc.; 2016. p. 57–73.
58. Jane J lin. Structural Features of Starch Granules II. Em: Starch. Third Edit. Elsevier Inc.; 2009. p. 193–236.
59. Jiranuntakul W, Puttanlek C, Rungsardthong V, Pucha-Arnon S, Uttapap D. Microstructural and physicochemical properties of heat-moisture treated waxy and normal starches. J Food Eng. 2011;104(2):246–58.
60. Martínez P, Peña F, Bello-Pérez LA, Núñez-Santiago C, Yee-Madeira H, Velezmoro C. Physicochemical, functional and morphological characterization of starches isolated from three native potatoes of the Andean region. Food Chem X. 2019;2(November 2018):100030.
61. dos Santos TPR, Leonel M, Garcia ÉL, do Carmo EL, Franco CML. Crystallinity, thermal and pasting properties of starches from different potato cultivars grown in Brazil. Int J Biol Macromol. 2016;82:144–9.
62. Srichuwong S, Isono N, Mishima T, Hisamatsu M. Structure of lintnerized starch is related to X-ray diffraction pattern and susceptibility to acid and enzyme hydrolysis of starch granules. Int J Biol Macromol. 2005;37(3):115–21.
63. Cisneros FH, Zevillanos R, Figueroa M, Gonzalez G, Cisneros-Zevallos L. Characterization of Starch from Two Andean Potatoes: Ccompis (*Solanum tuberosum* spp. andigena) and Huayro (*Solanum x chaucha*). Starch/Staerke. 2018;70(3–4).

64. Pineda-Gomez P, González NM, Contreras-Jimenez B, Rodriguez-Garcia ME. Physicochemical Characterisation of Starches from Six Potato Cultivars Native to the Colombian Andean Region. *Potato Res.* 2020;
65. Xu Y. Resistant starch content, molecular structure and physicochemical properties of starches in Virginia-grown corn, potato and mungbean. *Journal of Cereals and Oilseeds.* 2013;4(1):10–8.
66. Sun T, Lærke HN, Jørgensen H, Knudsen KEB. The effect of extrusion cooking of different starch sources on the in vitro and in vivo digestibility in growing pigs. *Anim Feed Sci Technol.* 2006;131(1–2):67–86.
67. Ratnayake WS, Hoover R, Warkentin T. Pea starch: Composition, structure and properties - A review. *Starch/Staerke.* 2002;54(6):217–34.
68. Bogracheva TY, Cairns P, Noel TR, Hulleman S, Wang TL, Morris VJ, et al. Effect of mutant genes at the r, rb, rug3, rug4, rug5 and lam loci on the granular structure and physico-chemical properties of pea seed starch. *Carbohydr Polym.* 1999;39(4):303–14.
69. Singh J, McCarthy OJ, Singh H. Physico-chemical and morphological characteristics of New Zealand Taewa (Maori potato) starches. *Carbohydr Polym.* 2006;64(4).
70. Singh J, Colussi R, McCarthy OJ, Kaur L. *Potato Starch and Its Modification. Second Edi. Advances in Potato Chemistry and Technology: Second Edition.* Elsevier Inc.; 2016. 195–247 p.
71. Singh N, Singh J, Kaur L, Sodhi NS, Gill BS. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. 2003;81:1–31.
72. Singh N, Singh J, Kaur L, Sodhi NS, Gill BS. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. *Food Chem.* 1º de maio de 2003;81(2):219–31.
73. Peña E. “Extracción y caracterización fisicoquímica y funcional de almidones de cinco variedades de papas nativas procedentes de ilave (puno)”. 2017.
74. Alvani K, Qi X, Tester RF, Snape CE. Physico-chemical properties of potato starches. *Food Chem.* 2011;125(3):958–65.

75. Hoover R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: A review. *Carbohydr Polym.* 2001;45(3):253–67.
76. Blennow A, Sjöland AK, Andersson R, Kristiansson P. The distribution of elements in the native starch granule as studied by particle-induced X-ray emission and complementary methods. *Anal Biochem.* 2005;347(2):327–9.
77. Matsuda AH. Caracterização e Controle de Qualidade de própolis proveniente de diversas regiões do Brasil. Biblioteca Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo. Universidade de São Paulo; 2006.
78. Salatino A, Teixeira ÉW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* [Internet]. 2005 [citado 25 de julho de 2023];2(1):33. Disponível em: </pmc/articles/PMC1062153/>
79. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(1):69–73.
80. Chaillou LL, Nazareno MA. Bioactivity of propolis from Santiago del Estero, Argentina, related to their chemical composition. *LWT - Food Science and Technology.* 2009;42(8):1422–7.
81. Silici S, Karaman K. Inhibitory effect of propolis on patulin production of penicillium expansum in apple juice. *J Food Process Preserv.* 2013;38(3):1129–34.
82. Skowron K, Kwiecińska-Piróg J, Grudlewska K, Gryń G, Wiktorczyk N, Balcerek M, et al. Antilisterial Activity of Polypropylene Film Coated with Chitosan with Propolis and/or Bee Pollen in Food Models. *Biomed Res Int.* 2019;2019.
83. Pobiega K, Kraśniewska K, Gniewosz M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends Food Sci Technol.* 2019;83(October 2018):53–62.
84. Ristivojević P, Dimkić I, Trifković J, Berić T, Vovk I, Milojković-Opsenica D, et al. Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, bioautography and chemometrics. *PLoS One.* 2016;11(6).

85. Mello BCBS, Petrus JCC, Hubinger MD. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *J Food Eng.* 2010;96(4):533–9.
86. Zavareze EDR, Pinto VZ, Klein B, El Halal SLM, Elias MC, Prentice-Hernández C, et al. Development of oxidised and heat-moisture treated potato starch film. *Food Chem.* 2012;132(1):344–50.
87. Funari CS, Sutton AT, Carneiro RL, Fraige K, Cavalheiro AJ, da Silva Bolzani V, et al. Natural deep eutectic solvents and aqueous solutions as an alternative extraction media for propolis. *Food Research International.* 2019;125(January):108559.
88. Moura SAL, Giuseppin N, Salatino A, Lima LD da C, Dourado LPA, BarrosMendes J. Aqueous extract of Brazilian green propolis: Primary components, evaluation of inflammation and wound healing by using subcutaneous implanted sponges. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2011;2011.
89. Park YK, Ikegaki M. Preparation of Water and Ethanolic Extracts of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998;62(11):2230–2.
90. Laskar RA, Sk I, Roy N, Begum NA. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chem.* 2010;122(1).
91. Costa DJL. Otimização da extração de própolis em solução aquosa e caracterização do extrato [Doctoral dissertation]. Universidade de São Paulo; 2020.
92. Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2015;2015.
93. Pereira A dos S, Seixas FRMS, De Aquino Neto FR. Própolis: 100 Anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova.* 2002;25(2):321–6.
94. Andrade JKS, Denadai M, de Oliveira CS, Nunes ML, Narain N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. *Food Research International.* 2017;101(August):129–38.

95. Sawaya ACHF, Tomazela DM, Cunha IBS, Bankova VS, Marcucci MC, Custodio AR, et al. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. *Analyst*. 2004;129(8):739–44.
96. Sawaya ACHF, Barbosa da Silva Cunha I, Marcucci MC. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem Cent J*. 2011;5(1):1–10.
97. Kumazawa S, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2003;51(6).
98. Teixeira ÉW, Negri G, Meira RMSA, Message D, Salatino A. Plant origin of green propolis: Bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2005;2(1):85–92.
99. Simões LMC, Gregório LE, Da Silva Filho AA, De Souza ML, Azzolini AECS, Bastos JK, et al. Effect of Brazilian green propolis on the production of reactive oxygen species by stimulated neutrophils. *J Ethnopharmacol*. 2004;94(1):59–65.
100. Cavalari RI, Cruz RG da, Dupont S, de Moura Bell JMLN, Vieira TMF de S. In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food Chem X*. 2019;4(September):100054.
101. Monroy YM, Rodrigues RAF, Rodrigues MVN, Sant'Ana AS, Silva BS, Cabral FA. Brazilian green propolis extracts obtained by conventional processes and by processes at high pressure with supercritical carbon dioxide, ethanol and water. *Journal of Supercritical Fluids*. 2017;130(August):189–97.
102. Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. *J Agric Food Chem*. 2004;52(5).
103. Messerli SM, Ahn MR, Kunimasa K, Yanagihara M, Tatefuji T, Hashimoto K, et al. Artepillin C (ARC) in Brazilian green propolis selectively blocks oncogenic PAK1 signaling and suppresses the growth of NF tumors in mice. *Phytother Res*. 2009;23(3):423–427.

104. Nguyen BCQ, Taira N, Maruta H, Tawata S. Artepillin C and Other Herbal PAK1-Blockers: Effects on Hair Cell Proliferation and Related PAK1-Dependent Biological Function in Cell Culture. *Phytotherapy Research*. 2016;30(1):120–7.
105. Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2005;2(1):29–32.
106. Veiga RS, De Mendonça S, Mendes PB, Paulino N, Mimica MJ, Lagareiro Netto AA, et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J Appl Microbiol*. 2017;122(4).
107. Alvez MM, Tomás R. Embalagens Biodegradáveis. Instituto ed. Lisboa-Portugal. INSTITUTO PIAGET; 2003.
108. Carr LG, Ponce P, Parra DF, Lugão AB, Buchler PM. Influência da adição de caulim e CaCO₃ na propriedades mecânicas das espumas de amido. Em: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS DOS MATERIAIS, 17. Foz do Iguaçu; 2006.
109. Pelissari FM, Ferreira DC, Louzada LB, Dos Santos F, Corrêa AC, Moreira FKV, et al. Starch-Based Edible Films and Coatings: An Eco-friendly Alternative for Food Packaging. *Starches for Food Application: Chemical, Technological and Health Properties*. 1º de janeiro de 2019;359–420.
110. Popovic' SZ, Lazic' VL, Hromiš NM, Šuput DZ, Bulut SN. Biopolymer Packaging Materials for Food Shelf-Life Prolongation. 2018. 223–277 p.
111. Dharmalingam K, Anandalakshmi R. *Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials Advances in Sustainable Polymers*. Em: Katiyar, Vimal, Kumar, Amit, Mulchandani N, organizador. *Materials Horizons: From Nature to Nanomaterials Advances in Sustainable Polymers*. Singapore: Springer Singapore; 2020. p. 183–207.
112. Otoni CG, Avena-Bustillos RJ, Azeredo HMC, Lorevice M V., Moura MR, Mattoso LHC, et al. Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables—A Review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2017;16(5):1151–69.

113. Navneet Kumar D, Rajni D. Edible films and coatings: an update on recent advances. Em: Biopolymer-Based Formulations. Elsevier Inc.; 2020. p. 675–95.
114. Guilbert S, Gontard N, Cuq B. Technology and applications of edible protective films. Packaging Technology and Science. 1995;8(6):339–46.
115. Tharanathan RN. Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. Trends Food Sci Technol. 2003;14(3):71–8.
116. Menegalli C, Tapia R. ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES DE FARINHA DE BIRI (Canna indica L .) Margarita María Andrade Mahecha. UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS; 2009.
117. GONTARD N, DUCHEZ C, CUQ J -L, GUILBERT S. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapour permeability and other physical properties. Int J Food Sci Technol. 1994;29(1):39–50.
118. Adjoumar D, Nindjin C, Tetchi A, Dalcq C, Amani G, Sindic M. Water Vapor Permeability of Edible Films Based on Improved Cassava (Manihot esculenta Crantz) Native Starches. J Food Process Technol. 2017;08(03).
119. Bodmeier R, Paeratakul O. Plasticizer uptake by aqueous colloidal polymer dispersions used for the coating of solid dosage forms. Int J Pharm. 1997;152(1):17–26.
120. Tapia-Blácido DR. Filmes a base de derivados do amaranto para uso em alimentos. UNICAMP; 2006.
121. Koch K. Starch-Based Films. Em: Starch in Food. Elsevier Ltd; 2018. p. 747–67.
122. Vazquez A, Foresti ML, Cyras V. Production, Chemistry and Degradation of Starch-Based Polymers. Em: Biopolymers – New Materials for Sustainable Films and Coatings. First Edit. John Wiley and Sons Ltd; 2011. p. 15–39.
123. Biliaderis CG. Structural Transitions and Related Physical Properties of Starch. Third Edit. Starch. Elsevier Inc.; 2009. 293–372 p.
124. Xie F, Liu H, Chen P, Xue T, Chen L, Yu L, et al. Starch gelatinization under shearless and shear conditions. International Journal of Food Engineering. 2006;2(5).

125. Thakur R, Pristijono P, Scarlett CJ, Bowyer M, Singh SP, Vuong Q V. Starch-based films: Major factors affecting their properties Rahul. *Int J Biol Macromol.* 2019;132:1079–89.
126. Nguyen Vu HP, Lumdubwong N. Starch behaviors and mechanical properties of starch blend films with different plasticizers. *Carbohydr Polym.* 2016;154:112–20.
127. Li M, Liu P, Zou W, Yu L, Xie F, Pu H, et al. Extrusion processing and characterization of edible starch films with different amylose contents. *J Food Eng.* 2011;106(1):95–101.
128. Yu L, Christie G. Microstructure and mechanical properties of orientated thermoplastic starches. *J Mater Sci.* 2005;40(1):111–6.
129. Matignon A, Tecante A. Starch retrogradation: From starch components to cereal products. *Food Hydrocoll.* 2017;68:43–52.
130. Cano A, Chafer M, Chiralt A, Gonzalez-Martinez C. Strategies to improve the functionality of starch-based films. *Em: Handbook of Composites from Renewable Materials.* 2017. p. 311–37.
131. Chaudhary AL, Torley PJ, Halley PJ, McCaffery N, Chaudhary DS. Amylose content and chemical modification effects on thermoplastic starch from maize - Processing and characterisation using conventional polymer equipment. *Carbohydr Polym.* 2009;78(4):917–25.
132. Bae HJ, Cha DS, Whiteside WS, Park HJ. Film and pharmaceutical hard capsule formation properties of mungbean, waterchestnut, and sweet potato starches. *Food Chem.* 2008;106(1):96–105.
133. Li M, Liu P, Zou W, Yu L, Xie F, Pu H, et al. Extrusion processing and characterization of edible starch films with different amylose contents. *J Food Eng.* 2011;106(1):95–101.
134. Lourdin D, Valle G Della, Colonna P. Influence of amylose content on starch films and foams. *Carbohydr Polym.* 1995;27(4):261–70.
135. Zobel HF. Molecules to Granules: A Comprehensive Starch Review. *Starch - Stärke.* 1988;40(2).

136. Rindlav-Westling Å, Stading M, Hermansson AM, Gatenholm P. Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films. *Carbohydr Polym.* 1998;36(2–3):217–24.
137. Stading M, Rindlav-Westling Å, Gatenholm P. Humidity-induced structural transitions in amylose and amylopectin films. *Carbohydr Polym.* 2001;45(3):209–17.
138. Jiménez A, Fabra MJ, Talens P, Chiralt A. Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food Bioproc Tech.* 2012;5(6):2058–76.
139. Versino F, Lopez O V., Garcia MA, Zaritzky NE. Starch-based films and food coatings: An overview. *Starch/Staerke.* 2016;68(11–12):1026–37.
140. do Val Siqueira L, Arias CILF, Maniglia BC, Tadini CC. Starch-based biodegradable plastics: methods of production, challenges and future perspectives. *Curr Opin Food Sci.* 1º de abril de 2021;38:122–30.
141. do Val Siqueira L, Arias CILF, Maniglia BC, Tadini CC. Starch-based biodegradable plastics: methods of production, challenges and future perspectives. *Curr Opin Food Sci.* 2021;38:122–30.
142. Mali S, Grossmann MVE, Yamashita F. Filmes de amido: Produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina:Ciencias Agrarias.* 2010;31(1):137–56.
143. Samal D, Gouda S, Patra J. Food Preservatives and Their Uses: A Short Report. *Asian Journal of Biology.* 2017;4(1):1–4.
144. Marques Bitencourt C. Desenvolvimento e aplicação de filmes à base de gelatina aditivados com extrato etanólico de cúrcuma (*Curcuma longa L.*). Universidade de São Paulo; 2013.
145. Sharma S. Food Preservatives and their Harmfull Effect. *International Journal of Scientific and Research Publications.* 2015;5(4):5–6.
146. Wu J, Chen S, Ge S, Miao J, Li J, Zhang Q. Preparation, properties and antioxidant activity of an active film from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin incorporated with green tea extract. *Food Hydrocoll.* 2013;32(1).

147. Gutiérrez-del-Río I, Fernández J, Lombó F. Plant nutraceuticals as antimicrobial agents in food preservation: terpenoids, polyphenols and thiols. Vol. 52, International Journal of Antimicrobial Agents. 2018.
148. Falleh H, Ben Jemaa M, Djebali K, Abid S, Saada M, Ksouri R. Application of the mixture design for optimum antimicrobial activity: Combined treatment of *Syzygium aromaticum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Myrtus communis*, and *Lavandula stoechas* essential oils against *Escherichia coli*. J Food Process Preserv. 2019;43(12).
149. Chivandi E, Dangarembizi R, Nyakudya TT, Erlwanger KH. Use of Essential Oils as a Preservative of Meat. Em: Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. 2015.
150. López-Rubio A, Almenar E, Hernandez-Muñoz P, Lagarón JM, Catalá R, Gavara R. Overview of active polymer-based packaging technologies for food applications. Food Reviews International. 2004;20(4):357–87.
151. Yildirim S, Röcker B, Pettersen MK, Nilsen-Nygaard J, Ayhan Z, Rutkaite R, et al. Active Packaging Applications for Food. Compr Rev Food Sci Food Saf. 2018;17(1):165–99.
152. Salgado PR, Ortiz CM, Musso YS, Di Giorgio L, Mauri AN. Edible films and coatings containing bioactives. Curr Opin Food Sci. 2015;5:86–92.
153. Mehdizadeh T, Tajik H, Langroodi AM, Molaei R, Mahmoudian A. Chitosan-starch film containing pomegranate peel extract and *Thymus kotschyianus* essential oil can prolong the shelf life of beef. Meat Sci. 2020;163:108073.
154. López De Dicastillo C, Rodríguez F, Guarda A, Galotto MJ. Antioxidant films based on cross-linked methyl cellulose and native Chilean berry for food packaging applications. Carbohydr Polym. 2016;136:1052–60.
155. Kerry JP, O’Grady MN, Hogan SA. Past, current and potential utilisation of active and intelligent packaging systems for meat and muscle-based products: A review. Meat Sci. 2006;74(1):113–30.
156. Benbettaïeb N, Debeaufort F, Karbowiak T. Bioactive edible films for food applications: mechanisms of antimicrobial and antioxidant activity. Vol. 59, Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2019.

157. Benbettaïeb N, Karbowiak T, Debeaufort F. Bioactive edible films for food applications: Influence of the bioactive compounds on film structure and properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(7):1137–53.
158. Kaya M, Khadem S, Cakmak YS, Mujtaba M, Ilk S, Akyuz L, et al. Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of *Pistacia terebinthus* for active food packaging. *RSC Adv* [Internet]. 17 de janeiro de 2018 [citado 8 de setembro de 2023];8(8):3941–50. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2018/ra/c7ra12070b>
159. Dhumal CV, Pal K, Sarkar P. Characterization of Tri-Phasic Edible Films from Chitosan, Guar Gum, and Whey Protein Isolate Loaded with Plant-Based Antimicrobial Compounds. *Polymer-Plastics Technology and Materials*. 2019;58(3).
160. Gomes LP, Souza HKS, Campiña JM, Andrade CT, Silva AF, Gonçalves MP, et al. Edible chitosan films and their nanosized counterparts exhibit antimicrobial activity and enhanced mechanical and barrier properties. *Molecules*. 2019;24(1).
161. Ravishankar S, Jaroni D, Zhu L, Olsen C, McHugh T, Friedman M. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on Ham and Bologna Using Pectin-Based Apple, Carrot, and Hibiscus Edible Films Containing Carvacrol and Cinnamaldehyde. *J Food Sci*. 2012;77(7).
162. Sasaki RS, Mattoso LHC, De Moura MR. New edible bionanocomposite prepared by pectin and clove essential oil nanoemulsions. *J Nanosci Nanotechnol*. 2016;16(6).
163. Saberi B, Chockchaisawasdee S, Golding JB, Scarlett CJ, Stathopoulos CE. Characterization of pea starch-guar gum biocomposite edible films enriched by natural antimicrobial agents for active food packaging. *Food and Bioproducts Processing*. 2017;105.
164. Shojaee-Aliabadi S, Mohammadifar MA, Hosseini H, Mohammadi A, Ghasemlou M, Hosseini SM, et al. Characterization of nanobiocomposite kappa-carrageenan film with *Zataria multiflora* essential oil and nanoclay. *Int J Biol Macromol*. 2014;69.
165. Giménez B, López de Lacey A, Pérez-Santín E, López-Caballero ME, Montero P. Release of active compounds from agar and agar-gelatin films with green tea extract. *Food Hydrocoll*. 2013;30(1).

166. Siripatrawan U, Harte BR. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. *Food Hydrocoll.* 2010;24(8).
167. Moradi M, Tajik H, Razavi Rohani SM, Oromiehie AR, Malekinejad H, Aliakbarlu J, et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT.* 2012;46(2).
168. Mohsenabadi N, Rajaei A, Tabatabaei M, Mohsenifar A. Physical and antimicrobial properties of starch-carboxy methyl cellulose film containing rosemary essential oils encapsulated in chitosan nanogel. *Int J Biol Macromol.* 2018;112:148–55.
169. Clarke D, Molinaro S, Tyuftin A, Bolton D, Fanning S, Kerry JP. Incorporation of commercially-derived antimicrobials into gelatin-based films and assessment of their antimicrobial activity and impact on physical film properties. *Food Control.* 2016;64:202–11.
170. Kraśniewska K, Gniewosz M. Substances with Antibacterial Activity in Edible Films - A Review. *Pol J Food Nutr Sci.* 2012;62(4):199–206.
171. Quezada Gallo JA. Edible Films and Coatings for Food Applications. *Edible Films and Coatings for Food Applications.* 2009;315–33.
172. Wang S, Marcone M, Barbut S, Lim LT. The Impact of Anthocyanin-Rich Red Raspberry Extract (ARRE) on the Properties of Edible Soy Protein Isolate (SPI) Films. *J Food Sci.* 2012;77(4):497–505.
173. Campos CA, Gerschenson LN, Flores SK. Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food Bioproc Tech.* 2011;4(6):849–75.
174. Garcia Silveira TM. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir do resíduo da extração de corante de urucum. USP; 2017.
175. Robertson GL. *Food Packaging Principles and Practice.* Vol. third ed., IFLA Journal. CRC Press, Boca Rotan, FL, United States.; 2013.
176. Dantas EA, Costa SS, Bramont WB, Costa AS, Padilha FF, Druzian JI, et al. Caracterização e avaliação das propriedades antioxidantes de filmes biodegradáveis incorporados com polpas de frutas tropicais Characterization and evaluation of the antioxidant properties of biodegradable films incorporated. *Ciência Rural.* 2015;45(1):142–8.

177. Guilbert S, Gontard N. Agro-polymers for edible and biodegradable films. Review of agricultural polymeric materials, physical and mechanical characteristics. *Innovations in Food Packaging*. 2005;263–76.
178. Meritaine da Rocha, de Souza MM, Prentice C. Biodegradable Films: An Alternative Food Packaging. *Food Packaging and Preservation*. Elsevier Inc.; 2018. 307–342 p.
179. Siracusa V, Rocculi P, Romani S, Rosa MD. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends Food Sci Technol*. 1º de dezembro de 2008;19(12):634–43.
180. Wihodo M, Moraru CI. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: A review. *J Food Eng*. 1º de fevereiro de 2013;114(3):292–302.
181. Meritaine da Rocha, de Souza MM, Prentice C. Biodegradable Films: An Alternative Food Packaging. *Food Packaging and Preservation*. 1º de janeiro de 2018;307–42.
182. Olivas GI, Barbosa-Cánovas G V, Barbosa-C G V, Anovas J. Edible Coatings for Fresh-Cut Fruits. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 1º de outubro de 2005 [citado 16 de novembro de 2023];45(7–8):657–70. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408690490911837>
183. Hernandez-Izquierdo VM, Krochta JM. Thermoplastic processing of proteins for film formation - A review. *J Food Sci*. 2008;73(2):30–9.
184. Cruz RMS, Alves V, Khmelinskii I, Vieira MC. Chapter 2 - New Food Packaging Systems. *Food Packaging and Preservation*. Elsevier Inc.; 2018. 63–85 p.
185. Cazón P, Vázquez M. Applications of Chitosan as Food Packaging Materials. Em 2019. p. 81–123.
186. Iquiapaza IYC, Medrano JP, Aguilar GJ, Tapia-Blácido DR. Novel Starchy Materials Isolated from Andean Native Potatoes: Physical–Chemical and Functional Characterization and Application in Edible Film Production. *Starch - Stärke* [Internet]. 11 de agosto de 2023 [citado 6 de agosto de 2023];2200143. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/star.202200143>

187. Liu J, Liu S, Wu Q, Gu Y, Kan J, Jin C. Effect of protocatechuic acid incorporation on the physical, mechanical, structural and antioxidant properties of chitosan film. *Food Hydrocoll.* 2017;73:90–100.
188. ASTM. Standard test methods for moisture content of paper and paperboard by oven drying. Method D644-99. *Annual Book of ASTM Standards*, American Society for Testing and Materials. 1994;99(Reapproved).
189. ASTM. ASTM Standard D882-95: Standard Test Method for tensile properties of thin plastic sheeting. Em: *Annual book of American Standard Testing Methods*. Philadelphia; 1995.
190. Maniglia BC. *Elaboração de filmes biodegradáveis a partir do resíduo da extração do pigmento de Cúrcuma [Mestrado]*. [Sao Paulo]: Universidad de São Paulo; 2012.
191. ASTM. Standard test method of water vapor transmission of materials - E96-95. Em: *Annual book of American Standard Testing Methods*. Philadelphia: ASTM; 1995.
192. GONTARD N, GUILBERT S, CUQ J -L. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *J Food Sci.* 1992;57(1):190–5.
193. Tapia-Blácido DR, do Amaral Sobral PJ, Menegalli FC. Optimization of amaranth flour films plasticized with glycerol and sorbitol by multi-response analysis. *LWT.* 2011;44(8).
194. Cappelari E, Giordani C, Dapper STH, Masuero AB. Influência da resistência à compressão na molhabilidade superficial de concretos. *Matéria (Rio de Janeiro).* 2020;25(1).
195. Benzie IFF, Devaki M. Measurement of Antioxidant Activity & Capacity Functional Food Science and Technology series. The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay for non-enzymatic antioxidant capacity: concepts, procedures, limitations and applications. 2017. 273–283 p.
196. Chedea VS, Pop RM. Total Polyphenols Content and Antioxidant DPPH Assays on Biological Samples. 2º ed. *Polyphenols in Plants*. Elsevier Inc.; 2019. 169–183 p.

197. Chen LY, Cheng CW, Liang JY. Effect of esterification condensation on the Folin-Ciocalteu method for the quantitative measurement of total phenols. *Food Chem.* 2015;170:10–5.
198. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005;53(6):1841–56.
199. Pereira GA, Arruda HS, Pastore GM. Modification and validation of Folin-Ciocalteu assay for faster and safer analysis of total phenolic content in food samples. *Brazilian Journal of Food Research.* 2018;9(1):125.
200. Harbertson JF, Spayd S. Measuring Phenolics in the Winery. *Am J Enol Vitic.* 2006;3(57):280–8.
201. Agbor GA, Vinson JA, Donnelly PE. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Food Sci Nutr Diet.* 2014;(August):147–56.
202. Camarena DEM. “Produção e caracterização de amidos e farinhas de Tubérculos Andinos: mashua (*Tropaeolum tuberosum*) e olluco (*Ullucus tuberosus*)”. Universidad de São Paulo; 2016.
203. Hillis WE, Swain T. The phenolic constituents of *Prunus domestica*. II.—The analysis of tissues of the Victoria plum tree. *J Sci Food Agric [Internet].* 1º de fevereiro de 1959 [citado 13 de maio de 2022];10(2):135–44. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jsfa.2740100211>
204. Opitz SEW, Smrke S, Goodman BA, Yeretizian C. Methodology for the Measurement of Antioxidant Capacity of Coffee: A Validated Platform Composed of Three Complementary Antioxidant Assays. *Processing and Impact on Antioxidants in Beverages.* Elsevier; 2014. 253–264 p.
205. Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioproducts Processing.* 2011;89(3):217–33.
206. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem.* 2005;53(10):4290–302.

207. Rufino M do SM, Alves RE, Brito ES de, Morais SM de, Sampaio C de G, Pérez-Jiménez J, et al. Metodología Científica : Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre. 2007;
208. Martínez S, Valek L, Rešetić J, Ružić DF. Cyclic voltammetry study of plasma antioxidant capacity - Comparison with the DPPH and TAS spectrophotometric methods. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2006;588(1):68–73.
209. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta*. 2013;763:1–10.
210. Jennifer T del R. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.
211. Martins JT, Cerqueira MA, Vicente AA. Influence of α -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocoll*. 1º de maio de 2012;27(1):220–7.
212. Farias PMD. Nopal cladodes flour (*Opuntia ficus-indica*): characterization and application as a new reinforcement and antioxidant biopolymer on starch-based films. [Doctoral dissertation]. Universidade Federal do Ceará; 2021.
213. Bodini RB. Desenvolvimento de materiais poliméricos bioativos à base de gelatina e própolis. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; 2011.
214. Oliveira TG de. Caracterização de filmes à base de gelatina aditivados com extratos vegetais. UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO; 2017.
215. Lopes de Paula R. Filmes e c oberturas a base do resíduo da extração de corante de cúrcuma. USP; 2016.
216. Sivarooban T, Hettiarachchy NS, Johnson MG. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films. *Food Research International*. 2008;41(8).
217. Reyes LM, Landgraf M, Sobral PJA. Gelatin-based films activated with red propolis ethanolic extract and essential oils. *Food Packag Shelf Life*. 1º de março de 2021;27:100607.

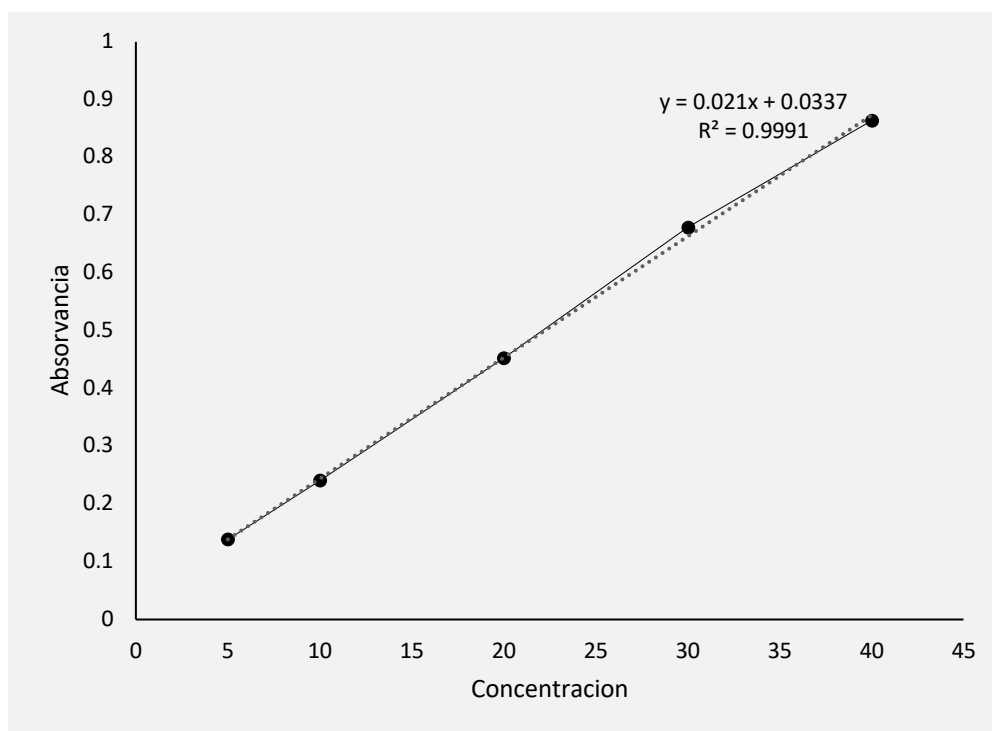
218. Moreno MA, Vallejo AM, Ballester AR, Zampini C, Isla MI, López-Rubio A, et al. Antifungal edible coatings containing Argentinian propolis extract and their application in raspberries. *Food Hydrocoll.* 2020;107:105973.
219. Qin Y, Liu Y, Yong H, Liu J, Zhang X, Liu J. Preparation and characterization of active and intelligent packaging films based on cassava starch and anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *Int J Biol Macromol.* 2019;134:80–90.
220. Mironescu M, Fratila L, Hupert A, Mironescu ID. Obtaining and Characterisation of Starch-Based Edible Films Incorporating Honey, Propolis and Bee Bread. *Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology.* 2019;23(2).
221. Oliveira TG. Caracterização de filmes à base de gelatina aditivados com extratos vegetais [Internet] [Tese de Doutorado]. USP; 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.74.2017.tde-31072017-100718>
222. Bitencourt CM, Fávaro-Trindade CS, Sobral PJA, Carvalho RA. Gelatin-based films additivated with curcuma ethanol extract: Antioxidant activity and physical properties of films. *Food Hydrocoll.* 2014;40.
223. Kanmani P, Rhim JW. Development and characterization of carrageenan/grapefruit seed extract composite films for active packaging. *Int J Biol Macromol.* 2014;68.
224. Rocha BA, Rodrigues MR, Bueno PCP, de Mello Costa-Machado AR, de Oliveira Lima Leite Vaz MM, Nascimento AP, et al. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J Therm Anal Calorim.* 2012;108(1).
225. Barud HDS, De Araújo Júnior AM, Saska S, Mestieri LB, Campos JADB, De Freitas RM, et al. Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2013;2013.
226. Pérez-Vergara LD, Cifuentes MT, Franco AP, Pérez-Cervera CE, Andrade-Pizarro RD. Development and characterization of edible films based on native cassava starch, beeswax, and propolis. *NFS Journal.* 1º de novembro de 2020;21:39–49.

227. Ismail MI, Roslan A, Saari NS, Hashim KH, Kalamullah MR. Ethanolic extract of propolis for biodegradable films packaging enhanced with chitosan. Em: AIP Conference Proceedings. 2017.
228. Correa-Pacheco ZN, Bautista-Baños S, Ramos-García M de L, Martínez-González M del C, Hernández-Romano J. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of edible propolis-chitosan nanoparticle films. Prog Org Coat. 1º de dezembro de 2019;137:105326.
229. Hromiš NM, Lazić VL, Markov SL, Vaštag ŽG, Popović SZ, Šuput DZ, et al. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. J Food Eng. 1º de agosto de 2015;158:86–93.
230. Bonilla J, Atarés L, Vargas M, Chiralt A. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. Food Hydrocoll. 1º de janeiro de 2012;26(1):9–16.
231. Siripatrawan U, Vitchayakitti W. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. Food Hydrocoll. 2016;61.
232. Pająk P, Przetaczek-Rożnowska I, Juszczak L. Development and physicochemical, thermal and mechanical properties of edible films based on pumpkin, lentil and quinoa starches. Int J Biol Macromol. 2019;138:441–9.
233. Ballesteros-Mártinez L, Pérez-Cervera C, Andrade-Pizarro R. Effect of glycerol and sorbitol concentrations on mechanical, optical, and barrier properties of sweet potato starch film. NFS Journal. 2020;20(April):1–9.
234. Gomes FK, Santos D, Nathallye De Oliveira Silva K, Davi T, Xavier N, Henrique De Lima Leite R, et al. Effect of the Addition of Carnauba Wax on Physicochemical Properties of Chitosan Films. Materials Research. 2017;20:479–84.
235. Zheng K, Li W, Fu B, Fu M, Ren Q, Yang F, et al. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films containing hardleaf oatchestnut starch and Litsea cubeba oil. Int J Biol Macromol. 2018;118:707–15.
236. Eskandarinia A, Rafienia M, Navid S, Agheb M. Physicochemical, Antimicrobial and Cytotoxic Characteristics of Corn Starch Film Containing Propolis for Wound Dressing. J Polym Environ [Internet]. 1º de agosto de 2018 [citado 28 de setembro de

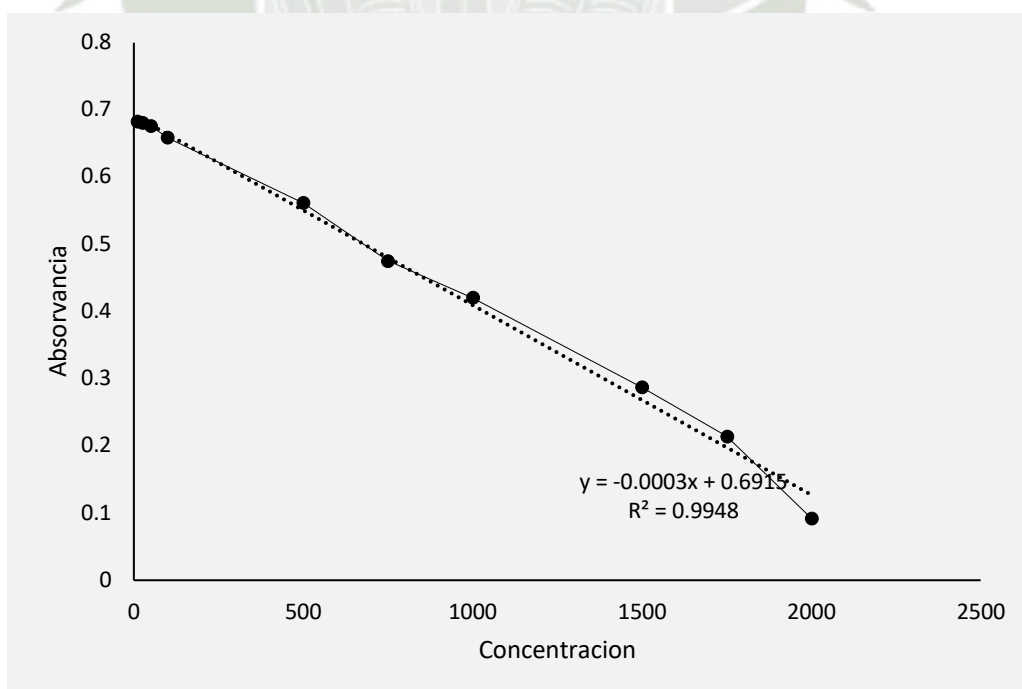
- 2022];26(8):3345–51. Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s10924-018-1216-5>
237. Costa SS, Druzian JI, Machado BAS, De Souza CO, Guimaraes AG. Bi-functional biobased packing of the cassava starch, glycerol, licuri nanocellulose and red propolis. *PLoS One*. 2014;9(11).
238. Garcia Silveira TM. Desenvolvimento de filmes biodegradáveis a partir do resíduo da extração de corante de urucum. USP;
239. Salgado PR, Di Giorgio L, Musso YS, Mauri AN. Recent Developments in Smart Food Packaging Focused on Biobased and Biodegradable Polymers. *Front Sustain Food Syst*. 2021;5(April):1–30.
240. Marques de Farias P, Barros de Vasconcelos L, da Silva Ferreira ME, Alves Filho EG, De Freitas VAA, Tapia-Blácido DR. Nopal cladode as a novel reinforcing and antioxidant agent for starch-based films: A comparison with lignin and propolis extract. *Int J Biol Macromol*. 2021;183:614–26.
241. Chang-Bravo L, López-Córdoba A, Martino M. Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. *React Funct Polym*. 2014;85:11–9.
242. Zhao Y, Saldaña MDA. Use of potato by-products and gallic acid for development of bioactive film packaging by subcritical water technology. *Journal of Supercritical Fluids*. 2019;143:97–106.
243. Bertotto C, Bilck AP, Yamashita F, Anjos O, Bakar Siddique MA, Harrison SM, et al. Development of a biodegradable plastic film extruded with the addition of a Brazilian propolis by-product. *LWT*. 2022;157:113124.
244. Zhao Y, Saldaña MDA. Use of potato by-products and gallic acid for development of bioactive film packaging by subcritical water technology. *Journal of Supercritical Fluids*. 2019;143.

ANEXOS

ANEXO N° 1. Curva estándar para la cuantificación de compuestos fenólicos expresados en ácido gálico (5-40 mg/L de ácido gálico).



ANEXO N° 2. Curva estándar para la cuantificación de actividad antioxidante por el método ABTS expresado en Trolox (10-2000 μ M trolox).



ANEXO N° 3. ANOVA para la opacidad, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	92.0414	3	30.6805	20.88	0.0004
Intra grupos	11.7538	8	1.46922		
Total (Corr.)	103.795	11			

ANEXO N° 4. Prueba de Tukey para la opacidad, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C	3	2.30799	X
A	3	4.5967	X
D	3	8.59809	X
B	3	8.89298	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B	*	-2.28871	2.28223
A - C	*	-6.2901	2.28223
A - D	*	-6.58499	2.28223
B - C	*	-4.00139	2.28223
B - D	*	-4.29629	2.28223
C - D		-0.294891	2.28223

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 5. ANOVA para el espesor, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0.000157932	3	0.000052644	0.95	0.4604
Intra grupos	0.00044237	8	0.0000552962		
Total (Corr.)	0.000600302	11			

ANEXO N° 6. Prueba de Tukey para el espesor, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C	3	0.0756667	X
A	3	0.0811111	X
D	3	0.0838333	X
B	3	0.0851111	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B		-0.00399997	0.0194364
A - C		0.00544447	0.0194364
A - D		-0.00272217	0.0194364
B - C		0.00944443	0.0194364
B - D		0.0012778	0.0194364
C - D		-0.00816663	0.0194364

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 7. ANOVA para tensión de rotura, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	131.0024	1	131.0024	0.0000	0.00006
Intra grupos	7.9981	3	2.6660		
Total (Corr.)	0.4857	9			

ANEXO N° 8. Prueba de Tukey para la tensión de rotura, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
D	3	2.2795	X
C	3	2.5829666	X
A	3	3.9449333	X
B	3	3.9892	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>- Límites</i>	<i>+ Límites</i>
------------------	-------------	-------------------	------------------	------------------

A - B		-0.04426666	-0.473367377	0.384834044
A - C	*	1.361966666	0.932865956	1.79106738
A - D	*	1.665433333	1.26404637	2.06682029
B - C	*	1.406233333	0.977132623	1.83533404
B - D	*	1.7097	1.30831304	2.11108696
C - D		0.303466666	-0.0979202943	0.704853628

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 9: ANOVA para la elongación, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	12353.5647	1	12353.5647	0.0000	0.00015
Intra grupos	905.362006	3	301.787335		
Total (Corr.)	119.209955	9			

ANEXO N° 10: Prueba de Tukey para la elongación, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
D	3	20.24	X
C	3	25.521	X
B	3	39.077	X
A	3	39.4276667	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>- Límites</i>	<i>+ Límites</i>
A - B		0.350666667	-5.93738611	6.63871944
A - C	*	13.9066667	7.18445549	20.6288778
A - D	*	19.1876667	12.4654555	25.9098778
B - C	*	13.556	7.26794723	19.8440528
B - D	*	18.837	12.5489472	25.1250528
C - D		5.281	-1.44121117	12.0032112

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 11. ANOVA para el Módulo de Young, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	46980.0324	1	46980.0324	0.0000	0.03352
Intra grupos	704.528002	3	234.842667		
Total (Corr.)	465.388675	9			

ANEXO N° 12. Prueba de Tukey para el Módulo de Young, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C	3	51.5333333	X
A	3	55.4333333	XX
D	3	66.3333333	XX
B	3	69.0325	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>- Límites</i>	<i>+ Límites</i>
A - B	*	-13.5991667	-26.0233492	-1.17498418
A - C		3.9	-9.38200977	17.1820098
A - D		-10.9	-24.1820098	2.38200977
B - C	*	17.4991667	5.07498418	29.9233492
B - D		2.69916667	-9.72501582	15.1233492
C - D	*	-14.8	-28.0820098	-1.51799023

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 13. ANOVA para humedad, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	47.2171	3	15.739	12.45	0.0034
Intra grupos	8.8466	7	1.2638		
Total (Corr.)	56.0637	10			

ANEXO N° 14. Prueba de Tukey para humedad, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Col_2</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C	2	9.81027	X
D	3	11.8004	XX
B	3	13.7163	XX
A	3	15.6466	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B		1.93023	3.03334
A - C	*	5.8363	3.39137
A - D	*	3.84617	3.03334
B - C	*	3.90606	3.39137
B - D		1.91593	3.03334
C - D		-1.99013	3.39137

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 15. ANOVA para PVA, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	37.7235	3	12.5745	2.88	0.1125
Intra grupos	30.5605	7	4.36579		
Total (Corr.)	68.2841	10			

ANEXO N° 16. Prueba de Tukey para PVA, realizado por statgraphics

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
B	3	10.9895	X
A	2	12.8399	X
D	3	15.0922	X
C	3	15.3761	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B		1.85032	6.3033
A - C		-2.53622	6.3033
A - D		-2.25232	6.3033
B - C		-4.38653	5.63784
B - D		-4.10263	5.63784
C - D		0.2839	5.63784

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 17. ANOVA para solubilidad en agua, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	216.464	3	72.1545	20.64	0.0004
Intra grupos	27.9712	8	3.49641		
Total (Corr.)	244.435	11			

ANEXO N° 18. Prueba de Tukey para solubilidad en agua, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Col_2</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C	3	14.07	X
D	3	22.1459	X
B	3	23.0287	X
A	3	25.3341	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B		2.30537	4.88742
A - C	*	11.2641	4.88742
A - D		3.18817	4.88742
B - C	*	8.95873	4.88742
B - D		0.8828	4.88742
C - D	*	-8.07593	4.88742

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 19. ANOVA para solubilidad en etanol, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	66.1924	3	22.0641	11.88	0.0026
Intra grupos	14.8612	8	1.85766		
Total (Corr.)	81.0537	11			

ANEXO N° 20. Prueba de Tukey para solubilidad en etanol, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Col_2</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
C	3	19.8565	X
D	3	20.9962	X
B	3	22.132	X
A	3	26.0907	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B		-2.27548	2.56625
A - C		-1.13967	2.56625
A - D	*	-6.23416	2.56625
B - C		1.13581	2.56625
B - D	*	-3.95868	2.56625
C - D	*	-8.07593	2.56625

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 21. ANOVA para ángulo de contacto, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	1927.74	3	642.58	87.98	0.0000
Intra grupos	58.4327	8	7.30408		
Total (Corr.)	1986.17	11			

ANEXO N° 22. Prueba de Tukey para angulo de contacto, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
B	3	30.5014	X
A	3	44.3474	X
C	3	57.1334	X
D	3	63.5818	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B	*	13.846	7.06401
A - C	*	-12.786	7.06401
A - D	*	-19.2344	7.06401
B - C	*	-26.632	7.06401
B - D	*	-33.0804	7.06401
C - D		-6.4484	7.06401

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 23. ANOVA para compuestos fenolicos realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	795166.	3	265055.	353.47	0.0000
Intra grupos	5998.88	8	749.861		
Total (Corr.)	801165.	11			

ANEXO N° 24. Prueba de Tukey para compuestos fenolicos, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A	3	5.90215	X
B	3	38.3584	X
C	3	336.126	X
D	3	641.641	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B		-32.4563	71.5746
A - C	*	-330.224	71.5746
A - D	*	-635.739	71.5746
B - C	*	-297.768	71.5746
B - D	*	-603.283	71.5746
C - D	*	-305.515	71.5746

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 25. ANOVA para actividad antioxidante por el metodo de DPPH, realizado por statgraphics.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	12695.5	3	4231.84	1154.75	0.0000
Intra grupos	29.3179	8	3.66474		
Total (Corr.)	12724.8	11			

ANEXO N° 26. Prueba de Tukey para actividad antioxidante por el metodo de DPPH, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
A	3	0	X
B	3	31.3825	X
D	3	74.2566	X
C	3	79.2253	X

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- Límites</i>
A - B	*	-31.3825	5.00369
A - C	*	-79.2253	5.00369
A - D	*	-74.2566	5.00369
B - C	*	-47.8428	5.00369
B - D	*	-42.8741	5.00369

C - D		4.9687	5.00369
-------	--	--------	---------

* indica una diferencia significativa.

ANEXO N° 27. ANOVA para actividad antioxidante por el metodo ABTS, realizado por statgraphics.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2.63082E8	3	8.76941E7	399.00	0.0000
Intra grupos	1.75829E6	8	219787.		
Total (Corr.)	2.64841E8	11			

ANEXO N° 28. Prueba de Tukey para actividad antioxidante por el metodo de ABTS, realizado por statgraphics.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Nivel	Casos	Media	Grupos Homogéneos
A	3	0	X
B	3	53.9633	X
C	3	3873.72	X
D	3	11496.0	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
A - B		-53.9633	1225.38
A - C	*	-3873.72	1225.38
A - D	*	-11496.0	1225.38
B - C	*	-3819.75	1225.38
B - D	*	-11442.0	1225.38
C - D	*	-7622.28	1225.38

* indica una diferencia significativa.