

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**“OBTENCIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES
EMPLEANDO GELATINA DE PESCADO CON EXTRACTO
DE ORÉGANO, Y UTILIZACIÓN COMO
RECUBRIMIENTO EN FILETES DE TRUCHA”**

Presentada por:

SILVIA ELVIRA PANDIA ESTRADA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Lima – Perú

2020

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

**“OBTENCIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES
EMPLEANDO GELATINA DE PESCADO CON EXTRACTO
DE ORÉGANO, Y UTILIZACIÓN COMO
RECUBRIMIENTO EN FILETES DE TRUCHA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAGISTER SCIENTIAE**

Presentada por:

SILVIA ELVIRA PANDIA ESTRADA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Mg.Sc. Beatriz Hatta Sakoda
PRESIDENTE

Ph.D. Fernando Vargas Delgado
ASESOR

M.Sc. Francisco Salas Valerio
MIEMBRO

Mg.Sc. David Roldán Acero
MIEMBRO

DEDICATORIA

*A mis padres Victoriano y Marina, por transmitirme su
inmenso amor, fortaleza, guía y apoyo incondicional;*

*A mi regalo de Dios, mi hijo Liam Emmanuel, y a mi
compañero de vida Eduard Manuel, por ser mi motor y
motivo para superarme día a día;*

*A mis hermanos Marco Antonio, Román Enrique,
Anibal Eduardo, Victor Santiago y Claudia Magda por
enseñarme el camino de la superación continua.*

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por darme la fortaleza necesaria para culminar el presente trabajo de investigación.

Al Ph.D. Fernando Vargas Delgado, asesor de la presente investigación, por el tiempo brindado, por sus acertadas correcciones y por compartir sus amplios conocimientos para fortalecer la investigación en el tema.

Al Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) por brindarme la oportunidad de la ejecución de la tesis en el Laboratorio de Físico-Química. Así mismo, agradecer a los profesionales y amigos del Laboratorio de FQ, en especial al Ing. Renzo Romero, Mg.Sc. Miguel Albrecht, Blga. Roxana Céspedes, Ing. Carlos Pariona, Dra. Maritza Barriga, Tco. Luis Quispe y Qco. Gary Alvarez.

A todas las personas que de una u otra manera me brindaron su ayuda y colaboraron para la culminación del presente trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN

SUMMARY

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.	GENERALIDADES DEL PERICO	3
2.2.	COLÁGENO	4
2.2.1.	Obtención de gelatina	5
2.3.	PELÍCULAS COMESTIBLES.....	6
2.3.1.	Definición	6
2.3.2.	Plastificantes	8
2.3.3.	Propiedades mecánicas	10
2.3.4.	Propiedades de barrera.....	10
2.3.5.	Propiedades antioxidantes y antimicrobianas	13
2.4.	EXTRACTO DE ORÉGANO	14
2.4.1.	Mecanismo de actividad	15
2.5.	DETERIORO DEL PESCADO	16
2.6.	METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA	17
2.6.1.	Selección o cribado	18
2.6.2.	Búsqueda I o de primer orden.....	18
2.6.2.1.	Diseños factoriales 2^k	18
2.6.2.2.	Diseños factoriales 2^k con punto al centro.....	19
2.6.3.	Búsqueda II o de segundo orden.....	19
2.6.3.1.	Diseños de Box-Behnken	19
2.6.3.2.	Diseño compuesto central.....	20
2.7.	OPTIMIZACIÓN MULTIRESPUESTA	22
2.7.1.	Método gráfico.....	22
2.7.2.	Método de la función de deseabilidad	22
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1.	LUGAR DE EJECUCIÓN.....	26
3.2.	MATERIALES	26
3.2.1.	Materia prima.....	26

3.2.1.1. Gelatina.....	26
3.2.1.2. Extracto de orégano	26
3.2.2. Materiales de laboratorio	27
3.2.3. Reactivos químicos	28
3.2.4. Otros.....	28
3.2.5. Equipos	29
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	30
3.3.1. ANÁLISIS REALIZADOS EN PIEL DE PERICO Y GELATINA.....	30
3.3.1.1. Composición química proximal.....	30
3.3.2. ANÁLISIS REALIZADOS EN EL EXTRACTO DE ORÉGANO.....	30
3.3.2.1. Composición de compuestos fenólicos.....	30
3.3.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos	30
3.3.2.3. Capacidad antioxidante.....	31
3.3.2.4. Actividad antimicrobiana.....	31
3.3.3. ANÁLISIS REALIZADOS DURANTE EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LAS PELÍCULAS COMESTIBLES.....	32
3.3.3.1. Resistencia a la tracción.....	32
3.3.3.2. Elongación al corte	32
3.3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PELÍCULA COMESTIBLE EN LOS NIVELES ÓPTIMOS Y CON EXTRACTO DE ORÉGANO.....	33
3.3.4.1. PROPIEDADES MECÁNICAS.....	33
a. Resistencia a la tracción.....	33
b. Elongación al corte	33
3.3.4.2. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS	33
a. Espesor	33
b. Color.....	33
c. Contenido de humedad.....	34
d. Índice de opacidad	34
e. Solubilidad en agua	34
3.3.4.3. PROPIEDADES DE BARRERA	35
a. Permeabilidad al vapor de agua	35
b. Permeabilidad al oxígeno.....	35
3.3.4.4. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS	35
a. Cuantificación de compuestos fenólicos.....	35
b. Actividad antioxidante.....	35

c. Actividad antimicrobiana	36
3.3.5. ANÁLISIS EN FILETES DE TRUCHA EN REFRIGERACIÓN	37
3.3.5.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	37
a. Composición química proximal	37
b. Determinación de pH	37
c. Determinación de color	37
d. Valor peróxido	37
e. Ácidos grasos libres	38
f. Ácido tiobarbitúrico.....	38
g. Nitrógeno de bases volátiles totales	38
3.3.5.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	39
a. Recuento de aerobios mesófilos.....	39
b. Detección de <i>Salmonella spp.</i>	39
c. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	40
d. Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	40
e. Enumeración de <i>Escherichia coli</i>	40
f. Enumeración de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	41
g. Aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i>	41
3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	41
3.4.1. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES Y CON EXTRACTO DE ORÉGANO, Y DEL RECUBRIMIENTO PARA FILETES DE TRUCHA	41
3.4.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO.....	43
3.4.2.1. Materia prima.....	43
3.4.2.2. Lavado	43
3.4.2.3. Cortado	43
3.4.2.4. Tratamiento alcalino	43
3.4.2.5. Acondicionado en medio ácido	43
3.4.2.6. Extracción de gelatina	43
3.4.2.7. Filtrado.....	44
3.4.2.8. Secado.....	44
3.4.2.9. Preparación de las soluciones formadoras de película del diseño	44
3.4.2.10. Secado.....	44
3.4.2.11. Almacenamiento	44
3.4.2.12. Caracterización	44
3.4.2.13. Preparación de la solución formadora de película óptima y con	

extractos de orégano	45
3.4.2.14. Secado	45
3.4.2.15. Almacenamiento	45
3.4.2.15. Materia prima.....	45
3.4.2.17. Fileteo	45
3.4.2.18. Lavado	46
3.4.2.19. Aplicación de las soluciones formadoras de película (SFPs) como recubrimiento	46
3.4.2.20. Drenado.....	46
3.4.2.21. Secado.....	46
3.4.2.22. Almacenamiento de filetes	46
3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	46
3.5.1. Selección o cribado	47
3.5.2. Búsqueda I o de primer orden: estimación de los modelos matemáticos de primer orden	47
3.5.2.1. Definición de la función objetivo y variables.....	47
3.5.2.2. Diseño factorial 2^k con réplica en el punto central	47
3.5.2.3. Estimación del modelo matemático de primer orden	49
a. Resistencia a la tracción	49
b. Elongación al corte	49
3.5.3. Búsqueda II: estimación de los modelos matemáticos de segundo orden	50
3.5.3.1. Diseño compuesto central (DCC).....	50
3.5.3.2. Estimación de los modelos matemáticos de segundo orden.....	52
a. Resistencia a la tracción	52
b. Elongación al corte	53
3.5.4. Optimización simultánea de las respuestas.....	54
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA PRIMA	56
4.1.1. Composición química proximal.....	56
4.2. OBTENCIÓN DE LA PELÍCULA COMESTIBLE	57
4.2.1. Efecto de las variables gelatina, glicerol, y temperatura de elaboración sobre las características mecánicas de la película.....	57
4.2.1.1. Búsqueda I o de primer orden: estimación de los modelos matemáticos de primer orden	57
a. Resistencia a la tracción	57
b. Elongación al corte	60

4.2.1.2. Búsqueda II o de segundo orden: estimación de los modelos matemáticos de segundo orden	64
a. Resistencia a la tracción	64
b. Elongación al corte	72
4.2.2. Optimización simultánea de las respuestas	79
4.2.3. Verificación de los niveles óptimos de las variables	81
4.2.3.1. Resistencia a la tracción	82
4.2.3.2. Elongación al corte	82
4.3. CARACTERÍSTICAS FENÓLICAS DEL EXTRACTO DE ORÉGANO	83
4.3.1. Composición de compuestos fenólicos del extracto de orégano	83
4.3.2. Cuantificación de polifenoles extraíbles y capacidad antioxidante del extracto de orégano	84
4.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE ORÉGANO	86
4.5. CARACTERÍSTICAS DE LAS PELÍCULAS COMESTIBLES CON EXTRACTO DE ORÉGANO	88
4.5.1. PROPIEDADES MECÁNICAS	88
4.5.1.1. Resistencia a la tracción y elongación al corte	88
4.5.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	91
4.5.2.1. Espesor	91
4.5.2.2. Color	92
4.5.2.3. Índice de opacidad	93
4.5.2.4. Contenido de humedad	94
4.5.2.5. Solubilidad en agua	95
4.5.3. PROPIEDADES DE BARRERA	97
4.5.3.1. Permeabilidad al vapor de agua	97
4.5.3.2. Permeabilidad al oxígeno	98
4.5.4. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS	100
4.5.4.1. Contenido de polifenoles extraíbles	100
4.5.4.2. Actividad antioxidante	100
4.5.4.3. Actividad antimicrobiana	103
4.6. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE FILETES DE TRUCHA RECUBIERTAS CON SOLUCIÓN FORMADORA DE PELÍCULA	105
4.6.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICOQUÍMICAS	105
4.6.1.1. Composición química proximal	105
4.6.1.2. Determinación de pH	105

4.6.1.3. Determinacion de color.....	108
4.6.1.4. Valor peróxido	114
4.6.1.5. Ácidos grasos libres	117
4.6.1.6. Ácido tiobarbitúrico.....	120
4.6.1.7. Nitrógeno de bases volátiles totales.....	123
4.6.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS	127
4.6.2.1. Recuento de aerobios mesófilos	127
4.6.2.2. Detección de <i>Salmonella spp</i>	130
4.6.2.3. Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	131
4.6.2.4. Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	132
4.6.2.5. Enumeración de <i>Escherichia coli</i>	132
4.6.2.6. Enumeración de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	134
4.6.2.7. Aislamiento e identificación de <i>Vibrio cholerae</i>	135
V. CONCLUSIONES	136
VI. RECOMENDACIONES.....	138
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139
VIII. ANEXOS	149

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades mecánicas y de barrera de algunos plásticos y películas	13
Tabla 2: Variables independientes, naturales y codificadas con sus respectivos niveles en la etapa de búsqueda I.....	48
Tabla 3: Diseño utilizado en la etapa de búsqueda I	49
Tabla 4: Variables independientes, naturales y codificadas con sus respectivos niveles en la etapa del diseño compuesto central	52
Tabla 5: Diseño utilizado en la etapa del diseño compuesto central	52
Tabla 6: Composición química proximal de la piel de perico y de la gelatina.....	57
Tabla 7: Valores experimentales de resistencia a la tracción en la etapa de búsqueda I.....	58
Tabla 8: Valores experimentales de elongación al corte en la etapa de búsqueda I.....	62
Tabla 9: Valores experimentales de la resistencia a la tracción en el DCC	65
Tabla 10: Valores experimentales de elongación al corte en el DCC	73
Tabla 11: Criterios de optimización	81
Tabla 12: Variables y respuestas estimadas en condiciones de optimización.....	82
Tabla 13: Valores estimados y observados para las respuestas en la optimización	82
Tabla 14: Compuestos fenólicos presentes en el extracto de orégano	84
Tabla 15: Polifenoles extraíbles y capacidad antioxidante del extracto de orégano	85
Tabla 16: Medida de halos de inhibición del extracto de orégano	87
Tabla 17: Valores de resistencia a la tracción y elongación al corte de las películas comestibles con extracto de orégano	89
Tabla 18: Valores de espesor de las películas comestibles con extracto de orégano	92
Tabla 19: Parámetros de color de las películas comestibles con extracto de orégano	93
Tabla 20: Índice de opacidad de las películas comestibles con extracto de orégano ..	94
Tabla 21: Valores de humedad de las películas comestibles con extracto de orégano	95
Tabla 22: Valores de solubilidad de las películas comestibles con extracto de orégano	96
Tabla 23: Valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles con extracto de orégano	97
Tabla 24: Valores de permeabilidad al oxígeno de las películas comestibles con extracto de orégano	99
Tabla 25: Polifenoles extraíbles y actividad antioxidante de películas comestibles con extracto de orégano	101

Tabla 26: Actividad antimicrobiana de las películas comestibles con extracto de orégano	103
Tabla 27: Composición proximal de filetes de trucha.....	105
Tabla 28: Valores de pH en filetes de trucha durante el almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	106
Tabla 29: Parámetros de color <i>L*</i> en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	109
Tabla 30: Parámetros de color <i>a*</i> en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	111
Tabla 31: Parámetros de color <i>b*</i> en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	113
Tabla 32: Valor peróxido (meq peróxido/kg muestra) en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	115
Tabla 33: Valores de acidez (% de ácido oleico) en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	118
Tabla 34: Valores de TBA (mg MDA/Kg muestra) en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	121
Tabla 35: Valores de N-BVT (mg BVT-N/100 g) en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	124
Tabla 36: Resultados microbiológicos de los filetes de trucha	127
Tabla 37: Recuento (UFC/ g) de aerobios mesófilos en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	128
Tabla 38: Recuento (UFC/ g) de <i>Staphylococcus aureus</i> en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C).....	131
Tabla 39: Enumeración de <i>Escherichia coli</i> en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Perico (<i>Coryphaena hippurus</i>).....	3
Figura 2: Estructura de la fibrilla de colágeno	4
Figura 3: Pieles de perico	5
Figura 4: Transferencias que pueden ser controladas por barreras comestibles.....	7
Figura 5: Esquema de los elementos de la MSR en su contexto amplio	21
Figura 6: Función de deseabilidad individual para la maximización de una respuesta.....	23
Figura 7: Función de deseabilidad individual para la minimización de una respuesta	24
Figura 8: Función de deseabilidad para la obtención de un nivel específico de una respuesta	25
Figura 9: Diagrama de flujo para la obtención de películas comestibles y con extracto de orégano y del recubrimiento para filetes de trucha.....	42
Figura 10: Superficie de respuesta para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en la búsqueda del modelo de primer orden.....	60
Figura 11: Superficie de respuesta para la elongación al corte, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en la búsqueda del modelo de primer orden.....	63
Figura 12: Contornos para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en el diseño compuesto central	66
Figura 13: Superficie de respuesta para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en el diseño compuesto central	66
Figura 14: Contornos para la resistencia a la tracción, en función a las variables glicerol (X_2) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central	68
Figura 15: Superficie de respuesta para la resistencia a la tracción, en función a las variables glicerol (X_2) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central	69
Figura 16: Contornos para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X_1) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central	70
Figura 17: Superficie de respuesta para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X_1) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central	71
Figura 18: Contornos para la elongación al corte, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en el diseño compuesto central	74

Figura 19: Superficie de respuesta para la elongación al corte, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en el diseño compuesto central.....	74
Figura 20: Contornos para la elongación al corte, en función a las variables gelatina (X_1) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central	76
Figura 21: Superficie de respuesta para la eongación al corte, en función a las variables gelatina (X_1) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central	76
Figura 22: Contornos para la elongación al corte, en función a las variables glicerol (X_2) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central	78
Figura 23: Superficie de respuesta para la eongación al corte, en función a las variables glicerol (X_2) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central	78
Figura 24: Variación del pH en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración	107
Figura 25: Variación del parámetro L^* en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración	110
Figura 26: Variación del parámetro a^* en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración	112
Figura 27: Variación del parámetro b^* en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración	114
Figura 28: Variación del valor peróxido en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración	116
Figura 29: Variación de la acidez en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración	119
Figura 30: Variación de TBA en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración	122
Figura 31: Variación de N-BVT en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración	125
Figura 32: Variación del recuento de aerobios mesófilos en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración	129

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Valores de espesor, resistencia a la tracción y elongación al corte en el diseño compuesto central	154
Anexo 2: Análisis de varianza (ANVA) de la regresión para la resistencia a la tracción y prueba de falta de ajuste en la etapa de búsqueda I.....	160
Anexo 3: Análisis de varianza (ANVA) de la regresión para la elongación al corte y prueba de falta de ajuste en la etapa de búsqueda I.....	161
Anexo 4: Análisis de varianza (ANVA) de la regresión para la resistencia a la tracción y prueba de falta de ajuste en el diseño compuesto central.....	162
Anexo 5: Análisis de varianza (ANVA) de la regresión para la elongación al corte y prueba de falta de ajuste en el diseño compuesto central.....	163
Anexo 6: Determinación de polifenoles extraíbles en películas comestibles con extracto de orégano.....	164
Anexo 7: Determinación de la actividad antioxidante en películas comestibles con extracto de orégano.....	166
Anexo 8: Composición de las soluciones formadoras de película con extracto de orégano.....	168
Anexo 9: Materias primas, productos intermedios y productos finales	169

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue obtener películas comestibles a partir de la gelatina de piel de perico (*Coryphaena hippurus*), para luego incorporar a la formulación 4 concentraciones (2, 4, 6 y 8 %) de extracto de orégano (EO) y caracterizar las películas resultantes en función a sus propiedades mecánicas, fisicoquímicas, de barrera, antioxidantes y antimicrobianas; así como el uso de la solución formadora de película con 3 concentraciones de extracto de orégano (2, 4 y 6 %) como recubrimiento en filetes de trucha para su evaluación fisicoquímica y microbiológica durante su almacenamiento en refrigeración. Se evaluaron tres variables independientes sobre las condiciones de preparación de la película comestible para optimizar el proceso en función a la resistencia a la tracción y la elongación al corte. Durante la optimización se empleó la metodología de superficie de respuesta (MSR) para estudiar el efecto de las variables independientes: gelatina (X_1) (3,1591 – 4,8409 %), glicerol (X_2) (0,1097 – 0,1602 g glicerol/g gelatina) y temperatura de elaboración (X_3) (40,032 – 69,968 °C), mediante modelos cuadráticos aplicados a cada respuesta: resistencia a la tracción (Y_1) y elongación al corte (Y_2). Se utilizó un diseño central compuesto (DCC) para ajustar cada respuesta a un modelo de segundo orden. Mediante el modelamiento se obtuvieron las ecuaciones que relacionaron cada respuesta con las variables independientes: $\hat{y}_1 = 9,94 + 0,59 x_1 - 1,35 x_2 - 1,04 x_3 + 0,38 x_1 x_2 - 0,50 x_1 x_3 + 0,43 x_2 x_3 + 0,72 x_1^2 - 0,50 x_3^2$ e $\hat{y}_2 = 86,63 - 36,01 x_1 + 55,26 x_2 + 52,17 x_3 - 38,50 x_1 x_2 + 8,75 x_1 x_3 + 13,58 x_2^2 + 21,36 x_3^2$. Los valores de las variables independientes que se utilizaron para obtener una película comestible con los valores objetivos de las respuestas (resistencia a la tracción de 9,5 MPa y elongación al corte de 150 %) fueron: 3,5 % de gelatina, 0,138 g glicerol/g gelatina de glicerol y 58 °C de temperatura de elaboración. Las películas comestibles obtenidas con extracto de orégano fueron caracterizadas y dieron los siguientes resultados: el incremento del espesor desde 0,050 – 0,063 mm desde el tratamiento control hasta la película con 6 % de extracto de orégano, el aumento de la elongación al corte desde el tratamiento control hasta la película con 6 % de extracto de orégano desde 154 – 370 %. En ambos casos, la adición de 8 % de extracto de orégano causó la disminución de sus valores. La resistencia a la tracción disminuyó de 9,33 – 0,91 MPa desde el tratamiento control hasta la película con 8 % de extracto de orégano. Respecto a las propiedades fisicoquímicas, los parámetros de color de las películas variaron respecto a la concentración del extracto de orégano incorporado en la

formulación. El índice de opacidad fluctuó entre 0,79 – 1,11 y se observó diferencia significativa entre las películas con 0, 4 y 8 % de extracto de orégano. La humedad fluctuó entre 10,69 y 12,58 % pero no se observó diferencia significativa entre todos los tratamientos. La solubilidad de las películas disminuyó con la incorporación del extracto de orégano desde 98,92 – 91,83 %, observándose diferencia significativa entre las películas con 0, 2, 4 y 8 % de extracto de orégano. Respecto a las propiedades de barrera, el incremento del extracto de orégano causó la variación de la permeabilidad al vapor de agua de 0,061 – 0,070 g-mm/m²-h-KPa, no observándose diferencia significativa entre todos los valores. La permeabilidad al oxígeno de las películas disminuyó de 2,231 a un valor menor de 0,151 cm³μm/m²-día-kPa con el incremento del extracto de orégano en la formulación, observándose diferencia significativa entre las películas con 0, 2, 4 y 8 % de extracto de orégano. Respecto a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas, la incorporación de extracto de orégano resultó en un incremento de la cantidad de polifenoles extraíbles de 30,74 – 98,98 mg eq. ácido gálico/ g de película, así como un incremento de la capacidad antioxidante de las películas de 0,77 – 2,71 eq. mM de FeSO₄.7H₂O/mg de película, observándose diferencia significativa entre todos los tratamientos de ambos análisis. Así mismo, se observó que las películas con 2, 4, 6 y 8 % de extracto de orégano mostraron actividad antimicrobiana sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Proteus vulgaris*; mientras que las películas con 6 y 8 % de extracto de orégano inhibieron el crecimiento de *Enterococcus faecalis* y *Salmonella entérica*. Sólo la película con 8 % de extracto de orégano inhibió el crecimiento de *Shigella spp*. Respecto a la utilización de la solución formadora de película como recubrimiento, según los parámetros de calidad de las pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, los filetes de trucha del tratamiento control y con 2 % de extracto de orégano tuvieron una aceptabilidad hasta los 8 días de almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C), mientras que los filetes recubiertos con 4 y 6 % de extracto de orégano mostraron una aceptabilidad hasta los 11 días de almacenamiento en refrigeración.

Palabras clave: gelatina de piel de perico, propiedades mecánicas, propiedades de barrera, metodología de superficie de respuesta, películas comestibles, extracto de orégano, recubrimientos.

SUMMARY

The objective of present investigation was to obtain edible films from mahi-mahi skin gelatin (*Coryphaena hippurus*), to then incorporate to the formulation 4 concentrations of origanum extract (2, 4, 6 y 8 %) and to characterize films obtained according to their mechanical, physicochemical, barrier, antioxidant and antimicrobial properties; thus as using the film forming solution with 3 concentrations origanum extract (2, 4 and 6%) as coating in trout fillets for its physicochemical and microbiological evaluation during storage in refrigeration. Three independent variables under edible film preparation conditions were evaluated to optimize the process according to the tensile strength and the elongation at break. During the optimization the response surface methodology (RSM) was used to study the effect of independent variables: gelatin (X_1) (3,1591 – 4,8409 %), glycerol (X_2) (0,1097 – 0,1602 g glycerol/g gelatin) and elaboration temperature (X_3) (40,032 – 69,968 °C), by applying quadratic models to each response: tensile strength (Y_1) and elongation at break (Y_2). Central composite design (CCD) was utilized to fit each response to a second order model. Through modeling we obtained the equations that relate each response with the independent variables: $\hat{y}_1 = 9,94 + 0,59 x_1 - 1,35 x_2 - 1,04 x_3 + 0,38 x_1 x_2 - 0,50 x_1 x_3 + 0,43 x_2 x_3 + 0,72 x_1^2 - 0,50 x_3^2$ and $\hat{y}_2 = 86,63 - 36,01 x_1 + 55,26 x_2 + 52,17 x_3 - 38,50 x_1 x_2 + 8,75 x_1 x_3 + 13,58 x_2^2 + 21,36 x_3^2$. The values of the independent variables used to obtain a edible film with the objectives values of the responses (tensile strength of 9,5 MPa and elongation at break of 150 %) were: gelatin 3,5 %, glycerol 0,138 g glycerol/g gelatin and elaboration temperature 58 °C. The edible films obtained with origanum extract were characterized and showed the following results: thickness increasing of 0,050 – 0,063 mm from control treatment to film with 6 % origanum extract, increasing of elongation at break of 154 – 370 % from control treatment to film with 6 % origanum extract. In both cases, the addition of 8 % extract caused the decreasing of this values. The tensile strength decreased of 9,33 – 0,91 MPa from control treatment to film with 8 % origanum extract. In all cases was observed difference significant between the treatments. Respect to physicochemical properties, color parameters of films varied with respect to extract concentration incorporated in the formulation. The opacity index fluctuated between

0,79 – 1,11 and difference significant was observed between the films with 0, 4 and 8 % origanum extract. Humidity fluctuated between 10,69 and 12,58% but there was not observed difference significative between all the treatments. The solubility of films decreased with the incorporation of origanum extract from 98,92 – 91,83%, with difference significative observed between films with 0, 2, 4 and 8 % origanum extract. Respect to the barrier properties, the increasing of extract caused the variation of water vapor permeability of 0,062 – 0,070 g-mm / m²-h-KPa, and there was no significant difference between the values. The oxygen permeability of films decreased from 2,231 to less than 0,151 cm³μm / m²-day-kPa with the increasing of origanum extract in the formulation, and there was significant difference observed between the film with 0, 2, 4 and 8 % origanum extract. Respect to antioxidant and antimicrobial properties, the incorporation of origanum extract increased the amount of extractable polyphenols of 30,74 – 98,98 mg eq. gallic acid / g of film, as well as an increase in the antioxidant capacity of films of 0,77 – 2,71 eq. mM of FeSO₄.7H₂O / mg of film. Significant difference was observed among all the treatments of both analysis. Likewise, it was observed that films with 2, 4, 6 and 8 % of origanum extract showed antimicrobial activity on the *Staphylococcus aureus* and *Proteus vulgaris* bacteria; while films with 6 and 8% EO inhibited the growth of *Enterococcus faecalis* and *Salmonella enteric*. Only the film with 8 % origanum extract inhibited the growth of *Shigella spp*. Regarding to use of film forming solution as coating, according quality parameters of physico chemical and microbiologic tests, trout steaks of treatment control and with 2 % origanum extract had acceptability until 8 days of storage in refrigeration (3 – 4 °C) , while steaks coated with 4 y 6 % origanum extract showed acceptability until 11 days storage in refrigeration.

Key words: mahi-mahi skin gelatin, mechanical properties, barrier properties, response surface methodology, edible films, origanum extract, coating.

I. INTRODUCCIÓN

El perico (*Coryphaena hippurus*) es un recurso hidrobiológico que se comercializa a nivel nacional principalmente en estado fresco con un notable incremento de su consumo en los últimos años. Se exporta mayoritariamente al mercado de Estados Unidos en presentación de congelado, representando la segunda partida más importante entre los productos pesqueros para consumo humano directo (Adex, 2018). El procesamiento de pescado genera alrededor del 30 % de subproductos conformados por pieles y huesos con alto contenido de colágeno (Gómez-Guillén *et al.*, 2002). En el caso del perico, las pieles pueden llegar a representar hasta el 12 % de su composición física (Barriga *et al.*, 2012), pudiendo variar según el tamaño y edad del espécimen. En el País, las pieles y los subproductos son procesados para la obtención de harina residual. Sin embargo, debido a que estas pieles están constituidas principalmente por proteína de tipo colagénica, tienen como característica una gran flexibilidad y resistencia, por lo que pueden ser aprovechadas para la obtención de gelatina mediante la hidrólisis parcial del colágeno. Esta gelatina puede ser empleada para la elaboración de películas comestibles con buenas propiedades estructurales y de barrera para su utilización como cubierta de productos alimenticios.

Las películas comestibles son materiales que pueden ser elaborados a partir de proteínas, carbohidratos y lípidos de origen animal o vegetal. Como regla general, las películas elaboradas a partir de grasas son utilizadas para reducir la transmisión de agua, las películas de polisacáridos para evitar la transmisión de oxígeno y otros gases y; las películas de proteínas proveen estabilidad mecánica (Dangaran *et al.*, 2009). Las películas proteicas forman y están estabilizadas a través de interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, enlaces covalentes y puentes disulfuro (Krochta *et al.*, 1994, citados por Dangaran *et al.*, 2009). Así mismo, muchos estudios han reportado que los compuestos fenólicos presentes en las especies y hierbas han contribuido significativamente a sus propiedades antioxidantes y farmacéuticas (Cai *et al.*, 2004). Por lo tanto, la incorporación de estos extractos a las películas le otorga propiedades bioactivas lo que supone una mejora en la protección de los alimentos frente al medio ambiente.

Por otro lado, la presencia de residuos plásticos en las grandes masas de agua es uno de los graves problemas globales en la actualidad debido a que estos materiales tardan miles de años en degradarse y en su composición contienen elementos tóxicos, lo cual constituye un peligro para el ecosistema acuático y afecta la inocuidad de los productos de la pesca. Las películas biodegradables representan una alternativa frente al uso de los plásticos ya que son materiales de naturaleza orgánica y por ello se degradan rápidamente.

El rápido deterioro de los filetes de trucha fresca refrigerada obedece a su naturaleza intrínseca (presencia de ácidos grasos poliinsaturados, actividad enzimática, etc.), lo cual se refleja en cambios fisicoquímicos, sensoriales y microbiológicos que se desarrollan en el producto, resultando en una pérdida de la calidad. La utilización de recubrimientos de gelatina con extractos naturales con actividad antioxidante y antimicrobiana puede retardar la alteración y pérdida de calidad de los filetes.

En el presente trabajo se plantea la utilización de gelatina de piel de perico para la obtención de películas comestibles con la incorporación de un extracto etanólico de orégano para su caracterización en función a sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas, de barrera, antioxidante y antimicrobiana. Así mismo, se plantea la utilización de la solución formadora de película con extracto de orégano como recubrimiento en filetes de trucha en refrigeración para su evaluación fisicoquímica y microbiológica.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES DEL PERICO

El perico (*Coryphaena hippurus*) es una especie epipelágica, oceánica y nerítica de aguas tropicales, de cuerpo esbelto, alargado y comprimido lateralmente, con escamas muy pequeñas que le da apariencia de “liso” (Solano-Sare *et al.*, 2008). Cuando está vivo, tiene el cuerpo de color verde azulado amarillento brillante con tintes iridiscentes, plateado a los costados tornándose dorados y cuando mueren cambian rápidamente a un color grisáceo verdoso.

El perico se encuentra en las aguas tropicales y subtropicales en los océanos Atlántico, Índico y Pacífico. Su rango latitudinal es 35° 00' N a 35° 00' S. En el Pacífico Oriental se distribuye desde San Diego – California (Estados Unidos) hasta Antofagasta (Chile), habitando el pelagial oceánico y con frecuencia se le encuentra alrededor de las islas oceánicas (FAO, 2010). En el Perú se presenta normalmente a lo largo de toda la costa asociado a la penetración de lenguas de agua subtropicales superficiales. Vive en aguas de temperatura de 21 a 30 °C, pudiendo ser aguas oceánicas o costeras. Su pesca es más intensa durante la primavera y verano y disminuye en otoño e invierno. Sus desplazamientos están asociados a movimientos de las aguas cálidas que constituyen su hábitat. Es considerado un recurso altamente migratorio, el patrón de migración no es totalmente conocido. La temperatura del agua parece ser una influencia importante en los hábitos migratorios, donde el pez prefiere aguas calientes (Solano-Sare *et al.*, 2008; FAO, 2010).



Figura 1: Perico (*Coryphaena hippurus*)

Fuente: FAO (2010)

2.2. COLÁGENO

El colágeno es una proteína constituyente de la piel, tendón y tejidos conectivos. La unidad fundamental del colágeno es la molécula de tropocolágeno. El tropocolágeno tiene un peso molecular aproximado de 285 kDa y está formada por tres cadenas polipeptídicas de igual tamaño cada una de las cuales es una hélice levógira, y las tres se enrollan para formar una superhélice dextrógira con tres residuos de aminoácidos por vuelta (Teijón, 2006). Esta estructura es el producto de una casi continua repetición de la secuencia Gly-X-Y, donde X es principalmente prolina e Y es en su mayoría hidroxiprolina y está estabilizada principalmente por enlaces hidrógeno intra e inter-cadenas, (Asghar y Henrickson, 1982, citados por Gómez-Guillén *et al.*, 2011). La superhélice de colágeno o fibrilla de colágeno está conformada por muchas triples hélices ensambladas (Nelson y Cox, 2005) tal como se observa en la Figura 2.

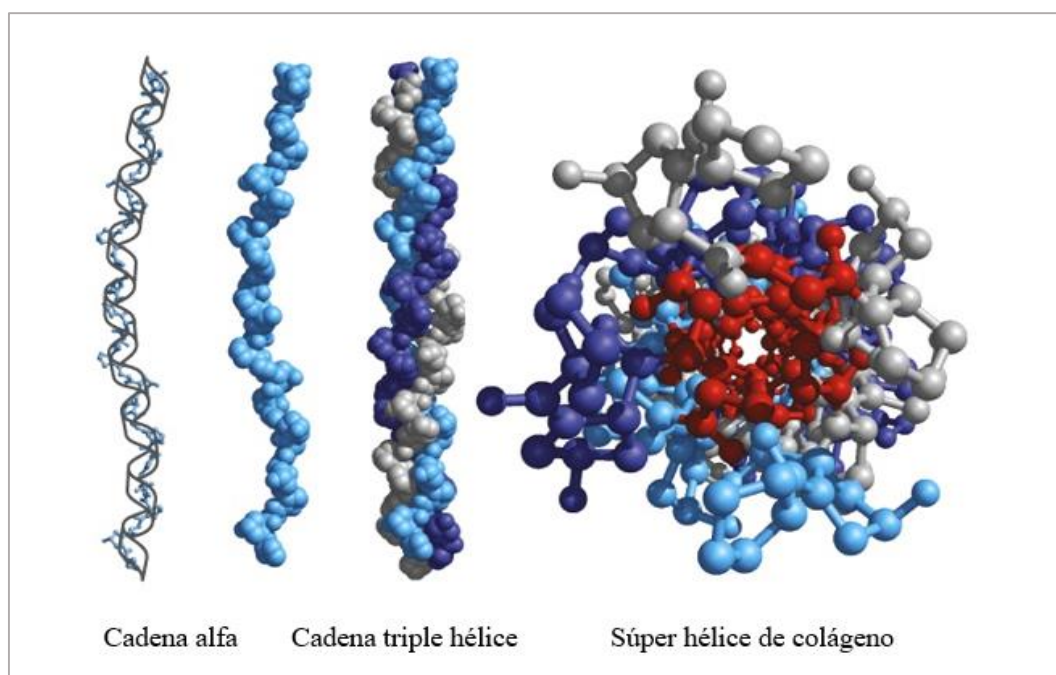


Figura 2: Estructura de la fibrilla de colágeno

Fuente: Adaptado de Nelson and Cox (Lehninger Principles of Biochemistry, 2003)

Sólo las regiones muy cortas N-y C-terminales llamadas telopéptidos (15-26 residuos aminoácidos), no forman las estructuras de triple hélice, ya que son en gran medida residuos de lisina e hidroxilisina (Hyl), así como sus derivados aldehído, unidos por enlaces cruzados covalentes intra e inter-moleculares (Bateman *et al.*, 1996, citados por Gómez-Guillén *et al.*, 2011). De 4 a 8 moléculas de la sección transversal de la molécula de colágeno son estabilizadas y reforzadas por enlaces covalentes para constituir la unidad básica de las

fibrillas de colágeno. Así, la fuerza típica, la naturaleza rígida de las pieles, tendones y huesos se debe a la estructura básica formada por muchas de estas fibrillas de colágeno reticulado (Gómez-Guillén *et al.*, 2011).



Figura 3: Pieles de perico

2.2.1. OBTENCIÓN DE GELATINA

La gelatina es derivada de la proteína fibrosa insoluble llamada colágeno. El colágeno nativo insoluble debe ser pre-tratado antes de que pueda ser convertido a una forma adecuada para la extracción, que es realizada por calentamiento en agua a temperaturas mayores de 45 °C. Un pre-tratamiento químico romperá los enlaces no covalentes para desorganizar la estructura, produciéndose así una adecuada hinchazón y solubilización del colágeno (Stainsby, 1987, citado por Gómez-Guillén *et al.*, 2011). El tratamiento térmico posterior escindirán los enlaces cruzados covalentes intra e intermoleculares y puentes de hidrógeno para desestabilizar la triple hélice, resultando en una transición de hélice a espiral y conversión a gelatina soluble (Djabourov *et al.*, 1993; citados por Karim y Bhat, 2009). La gelatina, obtenida por hidrólisis del colágeno, es una proteína con una amplia gama de funcionalidades y aplicaciones, incluida capacidad de formación de películas.

Las propiedades funcionales, termoestabilidad y la capacidad de formación de película de la gelatina dependen en gran medida de sus características, que están relacionadas con el origen de la especie (mamíferos, peces de aguas frías, peces de aguas cálidas), origen de los sub-

productos (huesos, piel), edad del animal (que afecta la reticulación del colágeno), severidad del procedimiento de extracción (valores de pH y temperatura) (Gómez-Estaca *et al.*, 2009^a).

Hasta la fecha se han realizado diversos estudios sobre obtención de gelatina a partir de piel de pescado como una alternativa a la gelatina comercial derivada de la piel y huesos de bovino y porcino. Se sabe que la gelatina forma películas claras, flexibles, fuertes e impermeables al oxígeno cuando se moldean películas a partir de soluciones acuosas en presencia de plastificantes (Gennadios *et al.*, 1994; citados por Lacroix y Dang Vu, 2014). Por ello, una de las aplicaciones que han despertado gran interés es la obtención de películas comestibles a partir de gelatina, por ejemplo, Limpisophon *et al.* (2009) obtuvieron películas comestibles a partir de gelatina de piel de tiburón azul las cuales exhibieron buena capacidad de barrera al agua y a los rayos UV. Así mismo, diversos autores han estudiado la incorporación de extractos naturales o aceites esenciales a las películas comestibles con el fin de otorgarle propiedades bioactivas (Wu *et al.*, 2014, Teixeira *et al.*, 2014, Núñez-Flores *et al.*, 2013).

2.3. PELÍCULAS COMESTIBLES

2.3.1. DEFINICIÓN

Cualquier tipo de material utilizado para recubrimiento o envoltura de distintos alimentos para prolongar la vida útil del producto que puede ser consumido junto con los alimentos con o sin la eliminación adicional, es considerado como una película comestible o recubrimiento. Las películas comestibles proporcionan reemplazo y / o fortificación de capas naturales para evitar pérdidas de humedad, permitiendo a su vez el intercambio controlado selectivo de los gases importantes, tales como el oxígeno y el dióxido de carbono. También puede proporcionar la esterilidad de la superficie y evitar la pérdida de componentes importantes (Pavlath y Orts, 2009). Las películas comestibles pueden proporcionar, recubrimientos claros o lechosos (opacos), pero los consumidores generalmente prefieren recubrimientos invisibles y claros. Los recubrimientos pueden obtenerse de diversas maneras: (1) por inmersión del producto, o por cepillado o pulverización con una solución que contiene ingredientes de la película, a fin de depositar la película directamente sobre la superficie de los alimentos (Gontard y Guilbert, 1994; citados por Pavlath y Orts, 2009), o (2) mediante la creación por sí sola de la película de solución a través de la termoformación para el posterior recubrimiento de la superficie de los alimentos. La manera más simple de aplicar una película es directamente de la solución. Dependiendo de la concentración de la

solución del recubrimiento, el producto absorberá una cantidad apropiada del recubrimiento de material necesario para formar la capa deseada, que cuando se seca, forma una capa protectora en la superficie del alimento. En la mayoría de casos, se necesita añadir algunos plastificantes a la solución de revestimiento para mantener la estructura de la película de las quebraduras. Los plastificantes de grado alimenticio son el glicerol, el manitol, el sorbitol, y la sacarosa (Pavlath y Orts, 2009). Debido a que son a la vez un envase y un componente alimenticio, las películas comestibles y los recubrimientos deben cumplir los siguientes requisitos específicos:

- Buenos atributos sensoriales (neutros o favorables al producto a recubrir)
- Alta barrera y eficiencia mecánica
- Estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiana
- Seguridad y no tóxico
- Tecnología simple
- Naturaleza no contaminante
- Bajo costo de materia prima y procesamiento

En la Figura 4 se observa la interacción entre el alimento, la película o recubrimiento y los factores externos que influyen en su deterioro.

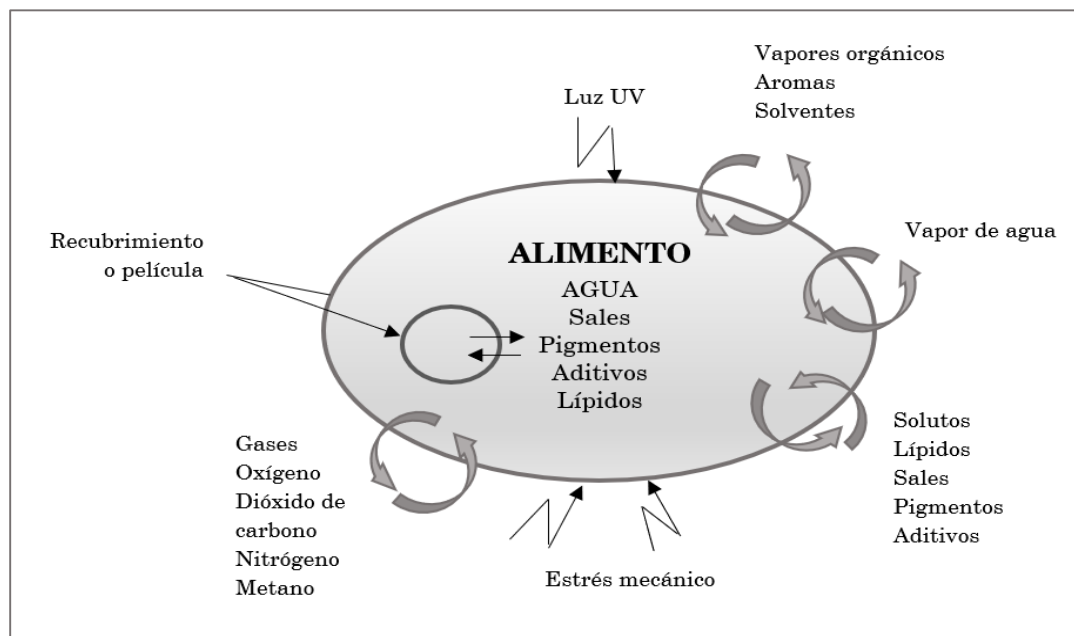


Figura 4: Transferencias que pueden ser controladas por barreras comestibles

Fuente: Adaptado de Debeaufort y Voilley (2009)

Las películas y recubrimientos comestibles son generalmente preparados obtenidos a partir de biopolímeros naturales, tales como proteínas, polisacáridos y lípidos; en consecuencia, tienen la ventaja de ser biodegradables y renovables. Las propiedades funcionales de la película resultante dependen de la naturaleza del material formador de película. Las películas de biopolímeros, compuestas de polisacáridos o proteínas son buenos formadores de película y tienen adecuadas propiedades ópticas y mecánicas y son excelentes barreras al O₂, aroma y lípidos en humedades relativas bajas y medias, pero son pobres barreras contra la humedad (Rhim and Shellhammer, 2005, citados por Pérez-Gago y Rhim, 2014). A medida que aumenta la actividad del agua (Aw), el contenido de humedad de la película también se incrementa debido a la absorción de agua, siguiendo una isoterma de absorción no lineal. Esto induce una disminución en las propiedades de barrera de vapor de agua (Guilbert *et al.*, 1997).

Los biopolímeros tienen múltiples mecanismos de formación de película, incluyendo fuerzas intermoleculares tales como enlaces covalentes (por ejemplo, enlaces disulfuro y entrecruzamiento) e interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o iónicas (Guilbert *et al.*, 1997). Según Gómez-Guillén *et al.* (2011), la distribución de pesos moleculares y la composición de aminoácidos son los principales factores que influyen sobre las propiedades estructurales y físicas de la gelatina, y estas características podrían desempeñar un papel clave en las propiedades fisicoquímicas de las películas resultantes.

2.3.2. PLASTIFICANTES

Los plastificantes son definidos como compuestos no volátiles de bajo peso molecular, agregados a los polímeros para reducir su fragilidad, impartir flexibilidad y aumentar la resistencia de las películas. Los plastificantes externos son agregados a los polímeros e interactúan interfiriendo en las interacciones polímero-polímero produciendo la hinchazón del mismo (Sothornvit y Krochta, 2005). Estos plastificantes actúan solvatando y lubricando las cadenas de proteínas, reducen la proporción de región cristalina a región amorfa y por lo tanto, disminuyen la temperatura de transición vítrea, T_g , de las proteínas e incrementan el volumen libre (Dangaran *et al.*, 2009). La T_g depende en gran medida de la composición de la película y del contenido de humedad, y puede denotar la estabilidad de una película (Sothornvit y Krochta, 2001).

La mayoría de las películas y recubrimientos a base de proteínas son muy fuertes, pero muy frágiles cuando no están plastificadas; por lo tanto, es necesario un plastificante para mejorar el potencial de aplicación de las películas de proteínas. Si bien los plastificantes pueden mejorar la flexibilidad y el alargamiento de las películas de proteínas, también afectan la permeabilidad de las películas y los recubrimientos (McHugh y Krochta, 1994; citados por Dangaran *et al.*, 2009).

Los plastificantes comunes para las películas y recubrimientos comestibles son monosacáridos, oligosacáridos, polioles, lípidos y derivados. El agua es también un plastificante importante para películas y recubrimientos comestibles. Los plastificantes más utilizados en películas y recubrimientos comestibles son típicamente polioles, incluyendo el glicerol, propilenglicol, polipropilenglicol, sorbitol y sacarosa. Los ácidos grasos también se han utilizado aunque no son tan comunes. La efectividad de un plastificante depende de tres cosas: tamaño, forma y compatibilidad con la matriz proteica. La mayoría contiene grupos hidroxilo (OH) que forman enlaces de hidrógeno con los biopolímeros, y así aumentan el volumen libre y la flexibilidad de la matriz de la película o movilidad molecular del polímero (Sothornvit y Krochta, 2005).

Los plastificantes lipídicos, como ácidos grasos y derivados, lecitina, aceites y ceras son usados con el propósito de reducir la permeabilidad al vapor de agua de la película, ya que los lípidos son de naturaleza no polar o hidrófobos, y así proporcionan una buena barrera contra la migración de humedad. Por otra parte, los lípidos pueden proporcionar brillo y mejorar la apariencia visual de los productos alimenticios. Sin embargo, exhiben propiedades mecánicas pobres debido a su falta de integridad estructural cohesiva (Gontard *et al.*, 1995; citados por Sothornvit y Krochta, 2005).

La principal ventaja del uso de plastificantes es aumentar la tenacidad o resiliencia de la película incrementando la flexibilidad, disminuyendo la resistencia a la tracción e incrementando la elongación, como se ve en la mayoría de las películas y recubrimientos comestibles. Sin embargo, también parecen tener la desventaja de aumentar la permeabilidad de la película, dependiendo del tipo de plastificante. Por ejemplo, los plastificantes hidrofílicos exhiben bajas barreras a la humedad y tienden a tener un efecto más pronunciado en el aumento de la permeabilidad al vapor de agua de la película en comparación con la permeabilidad al oxígeno. Por otro lado, los plastificantes hidrofóbicos tienen un mayor efecto en el incremento de la permeabilidad al oxígeno, aroma y aceite en comparación con

la permeabilidad al vapor de agua (Sothornvit y Krochta, 2005). Por otro lado, Lieberman y Gilbert (1973) demostraron la relación entre la permeación de los gases con la sorción de agua en películas de colágeno. Los autores concluyeron que la sorción del agua aumentó el volumen libre de la matriz de polímero con un correspondiente aumento de la permeación del gas en la fase de difusión.

2.3.3. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las películas y recubrimientos comestibles protegen los productos alimenticios envasados o recubiertos de los daños causados por impacto físico, presión, vibraciones, y otros factores mecánicos. Las pruebas mecánicas estandarizadas de las estructuras de películas comerciales son también aplicadas para evaluar la resistencia a la tracción de las películas comestibles. Tales pruebas mecánicas pueden incluir resistencia a la tracción, el alargamiento a la rotura, módulo de elasticidad, resistencia a la compresión, resistencia a la perforación, rigidez, resistencia al desgarro, explosión fuerza, resistencia a la abrasión, fuerza de adherencia, resistencia al plegado, y otros. Las películas comestibles generalmente tienen valores de resistencia a la tracción más bajos que los plásticos comunes, mientras que su elongación al corte varía ampliamente. Algunas películas comestibles tienen valores de alargamiento comparables a los de las películas de plástico comunes (Krochta, 2002).

El contenido de humedad influye considerablemente sobre las películas comestibles y materiales de recubrimiento (Krochta, 2002). Cuando las condiciones de humedad relativa se incrementan, la fuerza física de las películas disminuye, debido a que la humedad absorbida funciona como un plastificante. La temperatura es también una variable importante que afecta a las propiedades físicas y mecánicas de las películas y recubrimientos comestibles (Wu *et al.*, 2002). La resistencia física de los materiales disminuye considerablemente cuando la temperatura se incrementa por encima de la temperatura de transición vítrea. La humedad relativa alta y una gran cantidad de plastificantes disminuyen la temperatura de transición vítrea de los materiales formadores de película (Han, 2014).

2.3.4. PROPIEDADES DE BARRERA

La calidad de la mayoría de los productos alimenticios disminuye por los fenómenos de transferencia de masa. El propósito de utilizar películas es inhibir la absorción de humedad, absorción de aceite, la invasión de oxígeno, pérdida de sabor, la absorción de aromas indeseables, y la migración de los componentes del empaque en el alimento. Estos

fenómenos pueden ocurrir entre el alimento y el medio ambiente atmosférico, entre los alimentos y materiales de empaque, o entre los ingredientes heterogéneos en el mismo producto alimenticio (Krochta, 1997). Por ejemplo, la penetración de oxígeno atmosférico en los alimentos provoca la oxidación de los ingredientes; las tintas, disolventes, y aditivos monoméricos de los materiales de empaque pueden migrar a los alimentos; los sabores volátiles esenciales de las bebidas y productos de confitería pueden ser absorbidos por los materiales de empaque de plástico. Las películas y recubrimientos comestibles pueden rodear estos productos alimenticios o estar ubicados entre las fases heterogéneas de los productos alimenticios para evitar estos fenómenos de migración y el consiguiente deterioro de la calidad del producto (Krochta, 2002). Además de mejorar la calidad física y química, las películas y recubrimientos comestibles contribuyen al mantenimiento de la calidad visual, suavidad de la superficie, sabor, color comestible, y otros factores de calidad relacionados con el marketing (Krochta, 1997).

El mecanismo de permeabilidad consiste en que las moléculas permeantes como el agua y el oxígeno, chocan con la película comestible, luego se adsorben a la superficie de la película para difundirse a través de la red polimérica. Finalmente, desorben desde el otro lado de la película (Sothornvit y Krochta, 2005). Todas las propiedades de barrera de las películas y recubrimientos comestibles se ven afectadas en gran medida por composición de la película y las condiciones ambientales como la humedad relativa y la temperatura (Han, 2014). La permeabilidad de las películas hidrofílicas depende tanto de la diferencia de humedad relativa (HR) y de la humedad absoluta. Por ejemplo, para el mismo gradiente de HR, la permeabilidad aumenta con un incremento del valor de la presión de vapor. En el caso de películas hidrófilas, la permeabilidad se incrementa a niveles altos de humedad relativa y a menudo se debe a la hinchazón y plastificación de la red polimérica por absorción de humedad. Esto crea una estructura menos densa en la cual las extremidades de la cadena son más móviles. En este escenario, la difusividad del agua y la permeación el agua se vuelve más fácil (Debeaufort y Voilley, 2009).

Las películas de polisacárido y proteína son buenas barreras de gas, pero pobres barreras frente a la humedad. De manera específica, las películas obtenidas a partir de hidrocoloides (mayoría de polisacáridos y algunas proteínas como la gelatina) se utilizan para retardar la migración de grasas y aceites, pero no se utilizan cuando se requiere controlar la migración de vapor de agua (Nussinovitch, 2013). Por el contrario, las películas de lípidos puros son buena barreras frente a la humedad, pero pobres barreras al gas. Los lípidos, además de ser

una barrera contra el vapor de agua, se pueden agregar para aumentar el brillo de los productos recubiertos (Greener y Fenema, 1994; citados por Nussinovitch, 2013).

Las proteínas son buenas formadoras de película y exhiben excelentes propiedades de barrera al oxígeno, dióxido de carbono y lípidos, particularmente a baja humedad relativa con propiedades mecánicas satisfactorias (Cuq *et al.*, 1998). Sin embargo, el carácter predominantemente hidrofílico de estas proteínas (grupos -OH), da como resultado pobres características de barrera al agua (McHugh, 2000; citados por Lacroix y Cooksey, 2005). Excepto para los materiales basados en lípidos, la permeabilidad al vapor de agua de la mayor parte de películas comestibles es generalmente más alta que las de plástico común.

Algunos lípidos y sustancias hidrófobas de grado alimenticio tienen valores de permeabilidad cercanos a los de las películas plásticas, como el polietileno de baja densidad o el cloruro de polivinilo. La permeabilidad de los materiales lipídicos que tienen un alto contenido de grasa sólida suele ser mucho más bajo que de los lípidos líquidos. Sin embargo, la mayoría de las películas sólidas a base de lípidos son frágiles cuando se usan solas; por lo que a menudo son combinados con hidrocoloides para formar películas de bicapa o emulsión (Debeaufort y Voilley, 2009).

Dado que la función principal de un material de envasado de alimentos es controlar la transferencia de humedad entre el alimento y los alrededores, o entre dos componentes de un alimento heterogéneo, la permeabilidad al vapor de agua debe ser tan baja como sea posible (Gontard *et al.*, 1993), pero esto dependerá del tipo de alimento a recubrir. Durante el almacenamiento de frutas envueltas con plástico, el vapor de agua se condensa en la superficie interna de los materiales del empaque de plástico, creando así un potencial de contaminación microbiana. Por lo tanto, una película con una mayor permeabilidad al vapor de agua es deseable, aunque una permeabilidad extremadamente alta no es deseable ya que puede provocar una pérdida excesiva de humedad durante el almacenamiento (Park *et al.*, 2014). Las películas comestibles poseen una amplia gama de valores de permeabilidad de oxígeno. La permeabilidad al oxígeno es también muy sensible a la humedad relativa (Guilbert *et al.*, 1997; citados por Han, 2014). En condiciones de humedad relativa alta, la permeabilidad al oxígeno aumenta considerablemente; por lo tanto, es muy importante mantener ambientes con humedad relativa baja para maximizar la eficacia de las películas comestibles como barreras al gas (Bonilla *et al.*, 2012). Las películas de colágeno son excelentes barreras al oxígeno a una H.R de 0 %, pero la permeabilidad al oxígeno se

incrementa rápidamente con el incremento de la H.R de una manera similar al celofan (Lieberman and Gilbert, 1973; citados por Lacroix y Dang, 2014). La temperatura también es un factor importante que influye en la migración. Un incremento de la temperatura proporciona más energía a las sustancias migratorias lo cual aumenta la permeabilidad (Han, 2014).

En la Tabla 1 se presentan los valores de las propiedades mecánicas y de barrera de algunos plásticos comerciales y de una película elaborada a partir de almidón de maíz.

Tabla 1: Propiedades mecánicas y de barrera de algunos plásticos y películas

Material	Resistencia a la tracción (MPa)	Elongación al corte (%)	Permeabilidad al oxígeno (cm ³ µm/m ² .d.kPa) (23 °C, 0 % HR)	Permeabilidad al vapor de agua (g.mm/m ² .h.kPa) (37,8 °C, 90 % HR)
Polietileno de baja densidad	9-17 ¹	500 ¹	2103 ²	0,00018 ²
Polietileno de alta densidad	17-35 ¹	300 ¹	573 ²	0,000061 ²
Polipropileno	42 ¹	300 ¹	573 ²	0,000063 ²
Celofán	85,8 ± 8,9 ³	14,4 ± 2,4 ³	0,3024 ³
Almidón de maíz plastificado con glicerol	7,1 ± 0,4 ³	22,5 ± 4,2 ³	8640 ³	9,252 ³

¹: Krochta (2002)

²: Illanes (2004) ³: García *et al.* (2009)

2.3.5. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS

Las películas comestibles pueden ser utilizados como portadores de una gama de aditivos alimentarios, incluidos agentes anti oscurecimiento y antimicrobianos, colorantes, sabores, nutrientes y especias (Wong *et al.*, 1996, citados por Nussinovitch, 2013).

Un recubrimiento que contiene compuestos antimicrobianos y antioxidantes puede prevenir la rancidez y mejorar la vida útil mediante el control de la proliferación bacterial (Certel *et al.*, 2004; citados por Lacroix y Dang, 2014). Para controlar de forma más eficaz la oxidación de los alimentos y su deterioro debido a la acción de los microorganismos, existe un gran

interés en la formulación de películas activas comestibles y/o biodegradables, basadas en la incorporación de un compuesto antioxidante o antimicrobiano en la matriz polimérica (Gómez-Estaca *et al.*, 2009^a).

Los microorganismos presentes en la superficie del alimento pueden estar implicados en el deterioro, por lo tanto, la incorporación de compuestos antimicrobianos dentro de las películas comestibles proporciona una nueva forma de mejorar la seguridad y vida útil de los alimentos listos para el consumo (Cagri *et al.*, 2004; citados por Nussinovitch, 2013).

Los materiales de envasado antimicrobianos podrían ofrecer una alternativa de solución potencial para prevenir la propagación de microorganismos patógenos y de deterioro a través de los productos alimenticios de carne. En lugar de mezclar los compuestos antimicrobianos directamente con el alimento, se puede incorporarlos en las películas lo cual les permite tener su efecto funcional en la superficie del alimento donde se encuentra el mayor crecimiento microbiano (Lee *et al.*, 2003; citados por Nussinovitch, 2013). El envase antimicrobiano incluye sistemas tales como la adición de un sachet al paquete, la dispersión de agentes bioactivos en el envase mismo, el revestimiento de los agentes bioactivos en la superficie del material de envasado, o la utilización de los antimicrobianos, macromoléculas con propiedades formadoras de película o matrices comestibles (Coma, 2008; citado por Nussinovitch, 2013).

2.4. EXTRACTO DE ORÉGANO

Las hierbas, especialmente las que pertenecen a la familia Lamiácea son plantas aromáticas populares que crecen en muchas regiones del mundo. El orégano es una hierba aromática perteneciente a esta familia (Teixeira *et al.*, 2012). Muchos estudios han demostrado que las hierbas de la familia Lamiaceae tienen potentes actividades antioxidantes y antimicrobianas, debido a la cantidad y calidad de compuestos fenólicos presentes en ellos (Kosłowska *et al.*, 2015).

Klauer (2009), citado por Tellez (2017), menciona que en el Perú se cultivan principalmente 2 tipos de orégano: el orégano “zambito” comercializado en el mercado local como hierba fresca; y el denominado “Nigra”, para exportación. La variedad de oréganos que se producen en el Perú (zambito y nigra) son híbridos que provienen del cruzamiento de la mejorana (*Origanum majorana*) con las subespecies de orégano vulgaris y virens. De esta forma, el orégano “zambito” sería el *Origanum x aplii* (Domin) Boros, producto del cruzamiento de

Origanum majorana con *Origanum vulgare* ssp *vulgare*; y el orégano “nigra” sería el *Origanum x majoricum* Cambessedes, proveniente del cruzamiento de *Origanum majorana* con *Origanum vulgare* ssp. *Virens* (Di Fabio, 2000; citada por Tellez, 2017).

2.4.1. MECANISMO DE ACTIVIDAD

Cai *et al.* (2004) mencionan que en general, la actividad secuestradora de radicales libres y la actividad antioxidante de los fenoles (por ejemplo, flavonoides, ácidos fenólicos) dependen principalmente del número y posición de los grupos hidroxilo (OH·) donadores de hidrógeno en el anillo aromático de las moléculas fenólicas y también se ve afectada por otros factores, como la glicosilación de agliconas, otros grupos donadores de H (-NH, -SH), etc. Rice-Evans *et al.*, 1995; citados por Kahkonen *et al.*, 1999 mencionan que la actividad antioxidante de los fenoles se debe principalmente a sus propiedades redox, lo que les permiten actuar como agentes reductores, donadores de hidrógeno y secuestradores de oxígeno singlete. Además, tienen un potencial de quelación de metal.

Amarowicz *et al.* (2009) evaluaron la relación entre la actividad antioxidante y la capacidad secuestradora de radicales libres de extractos etanólicos de 3 hierbas incluyendo el orégano de la especie *Origanum vulgare* L. Mediante este estudio se demostró que el extracto de orégano tuvo un efecto más pronunciado en su capacidad de actuar como un aceptor de radicales libres. Esto concuerda con los estudios de otros autores que han demostrado que los polifenoles de origen vegetal tienen actividades de barrido directo contra los radicales hidroxil (OH·).

La correlación entre el contenido fenólico y la inhibición bacteriana de 46 extractos etanólicos de especies y hierbas incluyendo el orégano fue evaluada por Shan *et al.* (2007) quienes encontraron que existe una alta correlación positiva entre la actividad antibacteriana y el contenido de fenoles totales y en consecuencia con la capacidad antioxidante de los extractos. El mecanismo de inhibición bacteriana frente a los extractos de hierbas y especies podría deberse a la estructura de las bacterias. En el caso de las bacterias gram-negativas poseen una membrana externa y un único espacio periplásmico no encontrado en las bacterias gram-positivas (Nikaido, 1996; citado por Shan *et al.*, 2007). La resistencia de las bacterias gram-negativas frente a las sustancias antibacteriales está relacionada a la superficie hidrofílica de su membrana externa la cual es rica en moléculas de lipopolisacáridos, presentando una barrera a la penetración de numerosas moléculas de antibiótico y está también asociada con las enzimas en el espacio periplásmico, las cuales

son capaces de romper las moléculas introducidas desde afuera (Nikaido, 1994; citado por Shan *et al.*, 2007). Las bacterias gram-positivas no tienen una membrana externa y una estructura de pared celular de tal manera que las sustancias antibacteriales pueden fácilmente destruir la pared celular bacteriana y la membrana citoplasmática y resultar en una filtración del citoplasma y su coagulación.

2.5. DETERIORO DEL PESCADO

Diversos estudios han informado que el deterioro de músculo de pescado es una combinación de diferentes mecanismos de deterioro, incluyendo la oxidación de lípidos, microbiano y las actividades de enzimas endógenas, así como el pardeamiento enzimático. Estos eventos conducen a una disminución en la vida útil de la carne de pescado (Rodrigues *et al.*, 2013). Se sabe que los microorganismos incluyendo hongos, levaduras y bacterias son los responsables de la putrefacción y el desarrollo de mal aspecto, así como las sustancias tóxicas en los peces que son indeseables por los consumidores (Omojowo y Sogbesan, 2003; citados por Raeisi *et al.*, 2015). La rancidez oxidativa es otro aspecto importante que conduce al deterioro de la calidad de los alimentos y es una causa importante del deterioro de la calidad en el músculo de las carnes durante el procesamiento y almacenamiento.

La carne de los productos pesqueros es más susceptible a la oxidación de lípidos que el de las otras carnes debido a su alto nivel de ácidos grasos poliinsaturados y bajo contenido de antioxidantes (Pezeshk *et al.*, 2011, citados por Raeisi *et al.*, 2015). La susceptibilidad del tejido de los pescados a la oxidación depende no sólo de la cantidad de lípidos totales, sino también de la composición de ácidos grasos y su ubicación en el tejido muscular del pescado. La oxidación de lípidos en el pescado comienza en las fracciones fosfolipídicas intracelulares de las membranas celulares del músculo. El deterioro oxidativo, por lo tanto, es un problema en especies de peces tanto magras como grasas, lo que lleva al desarrollo de sabores y olores indeseables que limitan la vida útil de los productos pesqueros (Wang, 2009; citado por Raeisi *et al.*, 2016).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se oxidan más fácilmente que los ácidos grasos saturados, y por lo tanto, los productos alimenticios con mayor cantidad de PUFA ω -3 son más propensos a la oxidación de lípidos y el desarrollo de la rancidez. La oxidación lipídica típicamente resulta en una formación de aldehídos (ácidos, hidrocarburos, y epóxidos), radicales alquilo (hidrocarburos, alcoholes) y semialdehídos (oxo-ésteres). Estos productos de oxidación se generan en función de las condiciones oxidativas. Los ácidos grasos

poliinsaturados (PUFA) se oxidan más fácilmente que los ácidos grasos saturados, y por lo tanto, los productos alimenticios con ω -3 PUFA son más propensos a la oxidación de lípidos y el desarrollo de rancidez (Chen *et al.*, 2008). Las reacciones químicas y actividades de las enzimas propias de los peces son comúnmente responsables de la pérdida inicial de la frescura del pescado. En adición, las actividades metabólicas de los microorganismos se incluyen en todo el espectro del deterioro (Sallam *et al.*, 2007; citados por Raeisi *et al.*, 2015).

La calidad de la carne de trucha arco iris está parcialmente determinada por su color que está influenciada por el contenido de su pigmento carotenoide. La pigmentación de la carne de la trucha es causada por los ceto-carotenoides, astaxantina y cantaxantina, que los peces no pueden sintetizar de nuevo. Estos ceto-carotenoides contienen un sistema de dobles enlaces carbono-carbono conjugado, responsable de su color. El elevado número de dobles enlaces conjugados pueden conllevar a la oxidación en el aire lo que conduce a la decoloración del carotenoide (Liaaen- Jensen, 1971; citado por Choubert y Baccaunaud, 2006).

2.6. METODOLOGÍA DE SUPERFICIE DE RESPUESTA

La metodología de superficie de respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas útiles para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influenciada por diversas variables y donde el objetivo es optimizar esta respuesta. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable respuesta y determinar el modelo matemático que mejor se ajuste a los datos obtenidos para luego optimizar el valor de la variable respuesta. El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable respuesta (Montgomery, 2011).

En la mayoría de los problemas de superficie de respuesta, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, el primer paso en la metodología de superficie de respuesta (MSR) es encontrar una aproximación adecuada de la verdadera relación funcional entre “y” y el conjunto de variables independientes. Por lo general, se emplea un polinomio de orden inferior en alguna región de las variables independientes.

Gutiérrez y Vara (2008) proponen un esquema de la metodología de superficie de respuesta que se detalla en la Figura 5, donde se distinguen tres etapas en la búsqueda del punto óptimo,

que son: *cribado*, *búsqueda I o de primer orden* y *búsqueda II o de segundo orden*. A continuación, se describe brevemente cada una de estas etapas:

2.6.1. SELECCIÓN O CRIBADO

La optimización de un proceso se inicia con esta etapa cuando tiene muchos factores (>8) que influyen en la variable de interés. En esta etapa es necesario correr un experimento para identificar los pocos factores que tienen mayor influencia.

2.6.2. BÚSQUEDA I O DE PRIMER ORDEN

Una vez identificados los pocos factores ($k \leq 5$) que tienen una influencia efectiva en la variable respuesta se hace un estudio completo de tales factores, en el que se incluyen las interacciones y la detección de curvatura.

Esta etapa se trabaja con un modelo de primer orden y un diseño también de primer orden que permita detectar la presencia de curvatura. Por lo general se usa un diseño factorial completo 2^k o fraccionado 2^{k-p} con repeticiones al centro, los cuales permiten detectar de manera económica la presencia de curvatura. Mientras no se detecte curvatura, continúa la búsqueda con un modelo y diseño de primer orden. La presencia de curvatura puede ser un síntoma de que el punto óptimo está cerca y es el momento de pasar a la etapa de búsqueda II.

2.6.2.1. Diseños factoriales 2^k

Los diseños factoriales 2^k completos son útiles principalmente cuando el número de factores a estudiar está entre dos y cinco ($2 \leq k \leq 5$), rango en el cual su tamaño se encuentra entre 4 y 32 tratamientos. Si $k > 5$ se recomienda utilizar un diseño factorial fraccionado 2^{k-p} . Son aquellos en los que cada variable ocurre en dos niveles entendiéndose por niveles a los diferentes valores que pueden tomar los factores (Ayala y Pardo, 1995). Cuando se realiza un experimento factorial de este tipo, por lo general la relación de los factores se describirá con un modelo de primer orden:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon$$

2.6.2.2. Diseños factoriales 2^k con punto al centro

Una preocupación potencial en el uso de diseños factoriales de dos niveles es el supuesto de la **linealidad** de los efectos de los factores (Montgomery, 2011). Por lo tanto, se adicionan los puntos centrales por dos razones, la primera razón es obtener grados de libertad adicionales para el error en la tabla de ANOVA, sin perjudicar el balance en la estimación de los efectos de interés. La segunda razón, es que las repeticiones al centro permiten detectar la posible presencia de la curvatura en al menos uno de los factores objeto de estudio.

2.6.3. BÚSQUEDA II O DE SEGUNDO ORDEN

En el momento que se detecta la presencia de curvatura, las repeticiones al centro no son suficientes para saber cuáles factores causan la curvatura, y es necesario aumentar el experimento o correr uno nuevo, para poder estimar las causas de la curvatura e incluir los términos correspondientes en el modelo ajustado. En la mayoría de casos, el modelo de segundo orden es el adecuado. Estos modelos o diseños permiten estudiar, además de los efectos lineales y de interacción, a los efectos cuadráticos o de curvatura pura. Por tanto, se emplean cuando se quiere explorar una región que se espera sea más compleja o cuando se cree que el punto óptimo ya se encuentra dentro de la región experimental. Con este modelo se determinan las condiciones óptimas de operación del proceso.

El diseño debe tener al menos tres niveles en cada factor para poder estimar la curvatura de la superficie en la dirección de cada factor. El modelo de segundo orden está dado por la siguiente ecuación:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

2.6.3.1. Diseño de Box-Behnken

Este diseño se aplica cuando se tienen tres o más factores, y suelen ser eficientes en cuanto al número de corridas. Es un diseño rotatable o casi rotatable que se distingue porque no incluye como tratamientos a los vértices de la región experimental.

2.6.3.2. Diseño compuesto central

El diseño de composición central (DCC) es el más utilizado en la etapa de búsqueda de segundo orden debido a su gran flexibilidad: se puede construir a partir de un diseño factorial completo 2^k o fraccionado 2^{k-p} agregando puntos sobre los ejes y al centro. Según Montgomery (2011) el número total de pruebas experimentales que se realizará en un DCC, están dadas por la siguiente ecuación:

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad k < 5$$

Donde:

N : Número de pruebas experimentales

k : Número de factores

n_0 : Número de réplicas en el centro del diseño

El número de réplicas al centro y la distancia de los puntos axiales (α) deben escogerse de manera adecuada, dependiendo de las propiedades que se quieren en el DCC. Un diseño central compuesto se hace rotatable mediante la elección de α . El valor de α se calcula de la siguiente manera (Montgomery, 2011):

$$\alpha = (n_f)^{1/4}$$

Donde:

n_f : Número de puntos en la porción factorial del diseño

Es importante que el modelo de segundo orden proporcione buenas predicciones en toda la región de interés, lo cual significa que la varianza de la respuesta predicha es constante es la misma en todos los puntos \mathbf{x} que están a la misma distancia del centro del diseño.

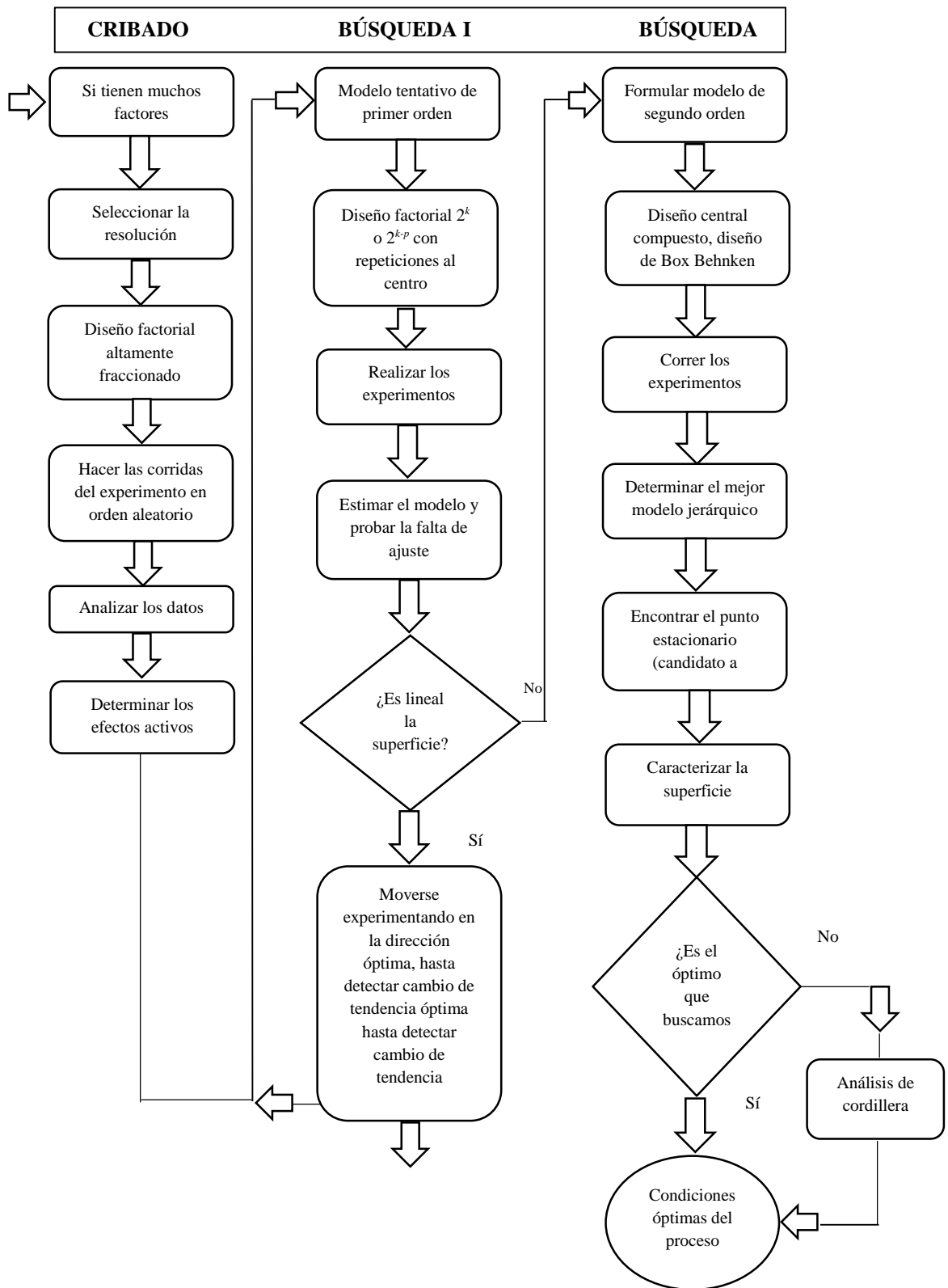


Figura 5: Esquema de los elementos de la MSR en su contexto amplio

Fuente: Gutiérrez y Vara (2008)

2.7. OPTIMIZACIÓN MULTIRESPUESTA

Es típico considerar diversas características (respuestas) para lograr productos con mejor calidad y propiedades. Si la optimización sólo se hace para una característica del producto podrían resultar condiciones inadecuadas para las otras características. Por ello es imprescindible contar con técnicas que sirvan para que, en la medida de lo posible, se optimicen simultáneamente todas las respuestas de interés (Gutiérrez y Vara, 2008). Es necesario construir primero un modelo de superficie de respuesta apropiado para cada respuesta y después intentar encontrar un conjunto de condiciones de operación que optimice en cierto sentido todas las respuestas, o que al menos las mantenga en los rangos deseados (Montgomery, 2011).

Existen dos métodos de optimización simultánea: el método gráfico y el método de la función de deseabilidad.

2.7.1. Método gráfico

El método gráfico consiste en superponer 2 curvas de nivel para cada variable de respuesta e identificar gráficamente regiones factibles donde todas las respuestas cumplen con los requerimientos (Gutiérrez y Vara, 2008).

2.7.2. Método de la función de deseabilidad

El enfoque general de este método consiste en convertir primero cada respuesta y_i en una función con condición deseable individual o de deseabilidad (d_i) que varía en el rango $0 \leq d_i \leq 1$, donde si la respuesta y_i está en su objetivo, entonces $d_i = 1$ y si la respuesta está fuera de una región aceptable $d_i = 0$. Los valores individuales de deseabilidad (d) para cada respuesta son luego combinados utilizando la media geométrica para obtener la condición de deseable global, presentada en la siguiente ecuación:

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_m)^{1/m}$$

Donde hay m respuestas

El valor D brinda una estimación total de la deseabilidad de los niveles de respuestas combinados. Claramente, el rango de los valores de D estará dentro del intervalo $[0,1]$ y D se incrementará conforme el balance de las características o respuestas se haga más

favorable. La función con condición de deseable individual a utilizar cuando se desea maximizar una respuesta es la siguiente:

$$d_i = \begin{cases} 0 & \hat{y}_i < A \\ \left(\frac{\hat{y}_i - A}{B - A}\right)^r & A \leq \hat{y}_i \leq B \\ 1 & \hat{y}_i > B \end{cases}$$

Donde B representa el objetivo de la respuesta, es decir, el valor máximo que se desea alcanzar, y A, es el mínimo valor aceptable. La representación gráfica de dicha respuesta se muestra en la Figura 6.

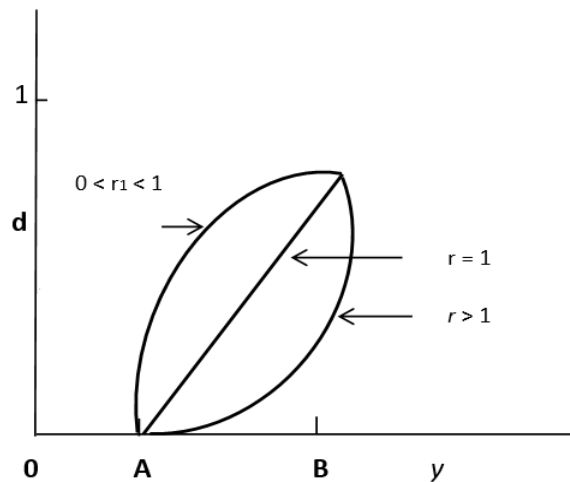


Figura 6: Función de deseabilidad individual para la maximización de una respuesta
Fuente: Montgomery (2011)

Si el objetivo es minimizar una respuesta, la función es la siguiente:

$$d_i = \begin{cases} 1 & \hat{y}_i < B \\ \left(\frac{C - \hat{y}_i}{C - B}\right)^r & B \leq \hat{y}_i \leq C \\ 0 & \hat{y}_i > C \end{cases}$$

Donde B representa el objetivo de la respuesta, es decir, el valor mínimo que se desea alcanzar, y C es el máximo valor aceptable. La representación gráfica de dicha respuesta se muestra en la Figura 7.

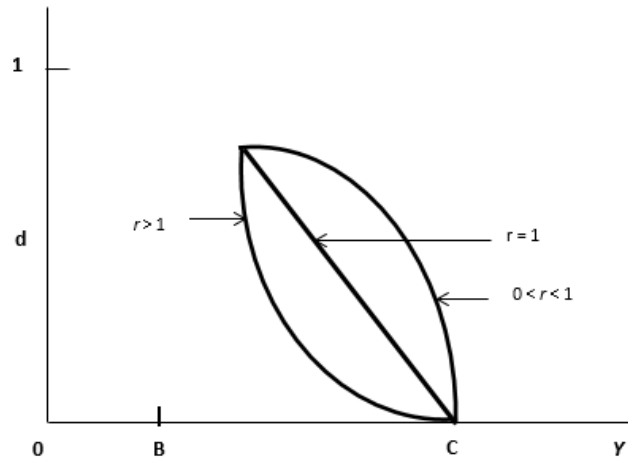


Figura 7: Función de deseabilidad individual para la minimización de una respuesta
Fuente: Montgomery (2011)

La función con condición de deseable de dos colas que se muestra en la figura 8 supone que el objetivo se localiza entre los límites inferior y superior, es decir si el objetivo es obtener una respuesta a un nivel específico, la función de deseabilidad se define como:

$$d_i = \begin{cases} 0 & \hat{y}_i < A \\ \left(\frac{\hat{y}_i - A}{B - A}\right)^{r_1} & A \leq \hat{y}_i \leq B \\ \left(\frac{C - \hat{y}_i}{C - B}\right)^{r_2} & B \leq \hat{y}_i \leq C \\ 0 & \hat{y}_i > C \end{cases}$$

Donde B representa el punto que se desea obtener, y A y C los valores mínimo aceptable y máximo aceptable, respectivamente. La representación gráfica de dicha respuesta se muestra en la Figura 8.

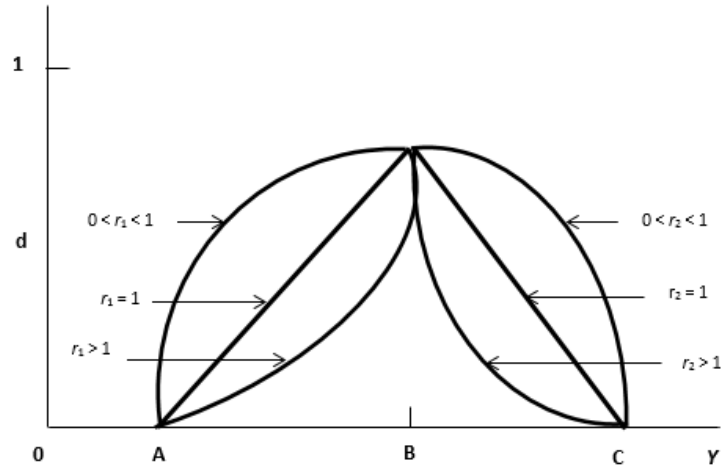


Figura 8: Función de discapacidad para la obtención de un nivel específico de una respuesta

Fuente: Montgomery (2011)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El trabajo de investigación se desarrolló en los Laboratorios de Fisicoquímica, y Microbiología; y en la Planta de Producción del Instituto Tecnológico de la Producción (ITP) de Ventanilla - Callao.

3.2. MATERIALES

3.2.1. MATERIA PRIMA

3.2.1.1. Gelatina

La gelatina empleada para la obtención de las películas comestibles y para el recubrimiento de los filetes de trucha, fue obtenida a partir de las pieles provenientes del fileteo manual del perico (*Coryphaena hippurus*) en el Mercado Mayorista Pesquero de Ventanilla. La extracción de la gelatina a partir de las pieles se realizó según el proceso optimizado descrito por Romero (2016).

3.2.1.2. Extracto de orégano

El extracto de orégano se obtuvo por maceración pasiva con etanol, de acuerdo a la metodología descrita por Hernández-Hernández *et al.* (2009), con algunas modificaciones. Las hojas de orégano fresco fueron lavadas 3 veces con abundante agua e hipoclorito y secadas (temperatura de 20 °C, tiempo de 40 horas). Las hojas secas fueron molidas y tamizadas empleando una malla de 0,25 mm hasta obtener un polvo fino con una A_w de 0,3. El orégano en polvo fue mezclado con una solución de etanol al 85 % en una relación de 1/10 p/v. La mezcla se agitó a 70 RPM durante 16 horas aproximadamente en oscuridad y luego se centrifugó a 3000 RPM durante 15 minutos. El sobrenadante se separó y el precipitado fue mezclado nuevamente con etanol al 85 %, la mezcla se agitó nuevamente por 16 horas en oscuridad. Este sobrenadante fue mezclado con el sobrenadante N° 1 y posteriormente se realizó la filtración (papel whatman N° 1). El extracto obtenido se con-

centró por evaporación al vacío y se envasó en un recipiente ambar para su posterior almacenamiento en refrigeración hasta su uso durante un período máximo de 30 días.

3.2.2. MATERIALES DE LABORATORIO

- Balones de digestión para proteína, marca Gerhardt
- Beakers de 10, 100, 250, 500 y 1000, marca Pyrex
- Bureta de vidrio de 25 ml
- Celdas de colorímetro
- Celdas de espectrofotómetro
- Crisoles de porcelana, marca Haldenwanger
- Dedal de extracción
- Discos de papel Whatman N° 4 de 6 mm de diámetro
- Espátula de drigalsky
- Fiolas de 10, 25, 50, 100 y 250 marca Schott Duran
- Frascos de vidrio ámbar
- Frascos de vidrio de 100 y 500 ml marca Kimax
- Matraces Erlenmeyer de 300 y 500 ml, marca Pyrex
- Matraz de evaporación en forma de pera de 100, 250 y 1000 ml, marca ISOLAB
- Matraz erlenmeyer de 100 y 300 ml, marca Pyrex
- Mechero tipo Bunsen
- Micropipetas digitales de 100, 1000 y 5000 ul, marca Brand
- Papel de filtro N° 1 y N° 4, marca Whatman
- Peras de decantación de 500 y 1000 ml, marca Kimax
- Pesafiltros, marca Witeg
- Pipetas graduadas de 5, 10, 25 y 50 ml, marca Brand
- Pipetas volumétricas de 5, 10 y 25 ml, marca Brand
- Placas Petri de vidrio, marca Labware
- Placas Petri descartables transparentes
- Probetas de 50, 100 y 250 ml, marca Pyrex
- Termómetros de vidrio, marca Termofix
- Tubos de centrifuga de 50 ml marca Brand
- Tubos de ensayo de 5, 10 y 25 ml

3.2.3. REACTIVOS QUÍMICOS

- Acetato de sodio trihidrato, p.a 99.9% de pureza, marca Merck
- Ácido acético glacial, 99.9 % de pureza, ACS marca Fisher Scientific
- Ácido cítrico grado alimentario, marca Bretano Corp.
- Ácido clorhídrico p.a. 37 % de pureza, marca Merck
- Ácido gálico \geq 98 % de pureza, marca Sigma Aldrich
- Acido perclórico p.a 70 % de pureza, marca Merck
- Ácido sulfúrico p.a. 95-97 % de pureza, marca Fermont
- Ácido tricloroacético, 99.5 % de pureza, grado USP, Riedel-de Haën
- Ácido 2-tiobarbitúrico, 98 % de pureza, marca Merck
- Agar Mueller Hinton, marca Merck
- Buffer de calibración de pH 4, 7 y 10 , marca Merck
- Bromuro de sodio p.a 98 % de pureza, marca Merck
- Cloroformo J.T. Baker, 99.9 % de pureza, grado ACS
- Cloruro de hierro III p.a 97 % de pureza, marca Sigma Aldrich
- Etanol p.a 99.9 % de pureza, marca Merck
- Éter dietílico p.a 99.9 % de pureza, marca Merck
- Fenoltaleína, ACS, marca Merck
- Glicerol $>$ 99.6 % pureza, marca Merck
- Hidróxido de sodio p.a. 97,0 – 98,5 % de pureza, marca Fisher Scientific.
- Reactivo 2, 4, 6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) \geq 99 % de pureza, marca Sigma Aldrich
- Reactivo de Folin Ciocalteau, marca Merck
- Sulfato de hierro II heptahidratado p.a 99.9 % de pureza, marca Merck
- Sulfato de sodio anhidro p.a. 99 % de pureza, marca Merck
- 1,1,3,3-tetraetoxipropano \geq 96 %, marca Sigma-Aldrich
- Tiosulfato de sodio pentahidratado, p.a. 98 % de pureza, marca Merck
- Yoduro de potasio, 95 % de pureza, Riedel-de Haën

3.2.4. OTROS

- Cepas microbiológicas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella entérica*, *Salmonella tiphy*, *Shigella*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomona aeuroginosa* y *Bacillus cereus*.

3.2.5. EQUIPOS

- Agitador magnético digital, marca IKA, modelo RT10
- Agitador de tubos, marca Barnstead International, modelo M16710-33
- Analizador de textura con sistema de rodillos para medir tensión en films, marca Brookfield, modelo CT 3.
- Balanza analítica digital, marca OHAUS, modelo DV214C
- Balanza de precisión, marca Kessel, modelo GF-6100
- Baño termostático con agitación, marca Memmert, modelo WNB 29
- Campana desecadora, marca Glaswerk
- Campana extractora eléctrica, marca The Barker Company
- Centrífuga Termo Electrón Corporation. Iec Centra CL2
- Colorímetro, marca Nippon Denshoku, modelo ZE 2000
- Congeladora horizontal marca MIRAY, modelo CM-420
- Equipo digestor y destilador Kjeldahl, marca Gerhardt
- Equipo Soxhlet (condensador, extractor y balón soxhlet)
- Espectrofotómetro UV/VIS, marca Perkin Elmer, modelo Lambda 950
- Estufa eléctrica, marca Binder, modelo ED115
- Estufa por convección forzada, marca MMM, modelo Venticell
- Evaporador rotatorio, marca Heidolph, modelo Laborota 4003
- Homogeneizador de muestras con hielo, marca Nissei, modelo AM-9
- Incubadora de 25 °C marca Binder, modelo BF 115
- Incubadora de 35 °C marca Memmert, modelo IN160
- Máquina selladora al vacío, marca Multivac, modelo C100
- Mezclador rotario, marca Dragon Laboratory, modelo MX-RL-Pro
- Micrómetro, marca Mitutoyo, modelo 700-118-20
- Microscopio marca Olympus, modelo CX31RBSFA
- Molino de análisis, marca IKA, modelo A11
- Molino ultra centrífugo Retsch, modelo ZM 200
- Mufla, marca Barnstead Thermolyne, modelo Furnace 48000
- Potenciómetro de mesa, marca Mettler Toledo, modelo Seven Easy
- Refrigeradora, marca Thermo Electron Corporation, modelo REVCO
- Secador de bandejas, marca Asahi. Cool Air Drying Equipment
- Selladora de impulso, marca Sealer, modelo PFS-300

- Sistema de prueba Permatran-W 3/33 (Modern Control, Inc., Minneapolis, Minn., U.S.A.) acoplado con un modulo de sensor infrarojo a 38 °C y 90 % HR.
- Sistema modular Ox-Tran 2/20 (Modern Control, Inc., Minneapolis, Minn., U.S.A.) acoplado con un sensor coulométrico a 23 °C y 0 % de HR.
- Termohigrómetro digital, marca Control Company, modelo 62344 -734

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1. ANÁLISIS REALIZADOS EN PIEL DE PERICO Y GELATINA

3.3.1.1. Composición química proximal

Los análisis de composición química proximal (humedad, grasa cruda, proteína total y ceniza) se realizaron a la piel de perico (sin carne ni escamas) y a la gelatina en polvo obtenida a partir de la piel de perico. Los análisis se realizaron siguiendo la metodología de la AOAC (2000) y por triplicado.

3.3.2. ANÁLISIS REALIZADOS EN EL EXTRACTO DE ORÉGANO

El extracto de orégano fue analizado de acuerdo a su composición y cuantificación de compuestos fenólicos, su capacidad antioxidante y actividad antimicrobiana.

3.3.2.1. Composición de compuestos fenólicos

La composición de ácidos fenólicos presentes en el extracto de orégano se determinó por HPLC-DAD de acuerdo al método adaptado de Gálvez *et al.* (2017).

3.3.2.2. Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó de acuerdo a lo descrito por Gómez-Guillén *et al.* (2007) con algunas modificaciones. El extracto de orégano fue tratado con mezcla I (metanol: HCl) y mezcla II (acetona: agua). Se tomó 1 ml de solución de extracto y se hizo reaccionar con el reactivo Folin Ciocalteu 2 N dejando reaccionar de 3 – 8 minutos para que se de la reacción, luego se agregó el agua y finalmente el Na₂CO₃ 7.5 % y se dejó reaccionar por 30 minutos. Paralelamente se preparó una curva de calibración con ácido gálico y se midieron las absorbancias a 750 nm. Los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/ ml extracto de orégano.

3.3.2.3. Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante del extracto se determinó por el método FRAP de acuerdo a lo descrito por Gómez-Guillén *et al.* (2007) con algunas modificaciones. El extracto de orégano fue diluído en agua destilada (1:2000 v/v). Se cogió una alícuota de 30 µl y se mezcló con 90 µl de agua destilada y 900 µl de reactivo FRAP (mezcla de TPTZ, FeCl₃ y buffer acetato de sodio) y se dejó en reposo en oscuridad por 30 minutos. Paralelamente se preparó una curva de calibración con FeSO₄.7H₂O (sal de Mohr) y se midieron las absorbancias a 595 nm. Los resultados se expresaron en mM equivalentes FeSO₄.7H₂O/ ml extracto de orégano.

3.3.2.4. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó siguiendo la metodología descrita por Teixeira *et al.* (2013) con algunas modificaciones. Se utilizó la técnica de difusión de disco en agar de Mueller Hinton. Se aislaron las cepas de cada microorganismo en sus respectivos medios, tomando por cada uno de 4 a 5 colonias y se colocó en 5 ml de solución salina al 0,85 %. Se ajustaron las concentraciones con el tubo N° 0,5 Mc Farland (1,5 x 10⁸ UFC/ml). Se tomó 100 µl de suspensión ajustada y se sembró en el agar Mueller Hinton para cada microorganismo, luego se colocó los discos estériles en cada placa y se embebió con 10 µl del extracto. El control negativo fue caldo de cultivo estéril. Las placas se incubaron a 35 °C durante 24 horas y posteriormente se hicieron las lecturas de los halos de inhibición (mm). Los halos de inhibición (mm) de la actividad antimicrobiana del extracto se determinaron de la siguiente manera:

$$C = A - B$$

C=Tamaño del halo de inhibición (mm)

A=Tamaño del halo + disco de papel filtro

B= Tamaño del disco de papel filtro (6mm)

3.3.3. ANÁLISIS REALIZADOS DURANTE EL PROCESO DE OBTENCIÓN DE LAS PELÍCULAS COMESTIBLES

Posteriormente a la obtención de las películas de cada tratamiento se evaluaron las siguientes propiedades mecánicas (variables respuesta) correspondientes al diseño experimental:

3.3.3.1. Resistencia a la tracción

La resistencia a la tracción se determinó de acuerdo al método utilizado por Wu *et al.* (2014) con algunas modificaciones, utilizando un analizador de textura y de acuerdo al método D882-97 (ASTM, 1999). Se prepararon seis tiras rectangulares de 20 mm x 70 mm de cada película. La separación inicial de agarre y la velocidad de la cruceta mecánica se establecieron en 20 mm y 1 mm/s, respectivamente. La resistencia a la tracción (MPa) se calculó con la siguiente ecuación:

$$RT \text{ (MPa)} = F_{\text{máx}}/A$$

Donde:

$F_{\text{máx}}$ = Carga máxima (N) necesaria para tirar de la muestra separadamente.

A = Área de sección transversal de las muestras (mm²).

El resultado promedio se determinó a partir de 6 mediciones.

3.3.3.2. Elongación al corte

La elongación al corte se determinó de acuerdo al método utilizado por Wu *et al.* (2014) con algunas modificaciones, utilizando un analizador de textura, y de acuerdo al método D882-97 (ASTM, 1999). Se prepararon seis tiras rectangulares de 20 mm x 70 mm de cada película. La separación inicial de agarre y la velocidad de la cruceta mecánica se establecieron en 20 mm y 1 mm/s, respectivamente. La elongación al corte se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$EAC = (E/20) \times 100 \%$$

Donde:

E = Elongación (mm) al momento de la ruptura

20 = Longitud de separación inicial de las muestras

El resultado promedio se determinó a partir de 6 mediciones.

3.3.4. CARACTERIZACIÓN DE LA PELÍCULA COMESTIBLE EN LOS NIVELES ÓPTIMOS Y CON EXTRACTO DE ORÉGANO

Se elaboró una película comestible control siguiendo los parámetros óptimos de la MSR en función a sus valores de resistencia a la tracción ($RT = 9,5$ MPa) y de elongación al corte ($EAC = 150$ %). Así mismo, se elaboraron películas comestibles utilizando los mismos parámetros de proceso de la MSR e incorporando en la formulación 4 concentraciones de extracto de orégano (2, 4, 6 y 8 %). Luego todas las películas fueron caracterizadas en función a sus propiedades mecánicas, fisicoquímicas, de barrera, antioxidantes y antimicrobianas. La diferencia significativa entre los valores se evaluó mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0,05 utilizando el paquete estadístico SPSS® versión 19.

3.3.4.1. PROPIEDADES MECÁNICAS

a. Resistencia a la tracción

La resistencia a la tracción de las películas comestibles se realizó de acuerdo a lo descrito en el punto 3.3.3. El resultado promedio se determinó a partir de 6 mediciones.

b. Elongación al corte

La elongación al corte de las películas comestibles se realizará de acuerdo a lo descrito en el punto 3.3.3. El resultado promedio se determinó a partir de 6 mediciones.

3.3.4.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

a. Espesor

El espesor de las películas comestibles se realizó utilizando un micrómetro. En total se realizaron 6 mediciones en una sola tira de película de 2 x 7 cm.

b. Color

Las películas comestibles se cortaron en discos de 2 cm de diámetro los cuales se colocaron en la celda del colorímetro registrándose los valores de L^* de 0 a 100 (luminosidad), a^* (intensidad de rojo) y b^* (intensidad de amarillo) de cada película. El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones por película.

c. Contenido de humedad

El contenido de humedad de las películas se determinó de acuerdo al método gravimétrico citado por Pelissari *et al.* (2013), de acuerdo al método estándar D 644-99 (ASTM, 1999) por secado de muestras a 105 °C por 24 horas. El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones.

d. Índice de opacidad

El índice de opacidad (O) de las películas se determinó de acuerdo a lo descrito por Gómez-Estaca *et al.* (2009^a). Se cortaron las películas en tiras rectangulares las cuales fueron puestas directamente dentro de una celda de espectrofotómetro usando una celda vacía como referencia. En ambos casos se midió la absorbancia a una longitud de onda (λ) de 600 nm. El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones. El índice de opacidad de la película se obtuvo según la siguiente ecuación:

$$O = \text{Abs}_{600}/x, \text{ donde:}$$

Donde:

O = Índice de opacidad

Abs₆₀₀ = Valor de la absorbancia a los 600 nm,

x: Espesor de la película (mm)

e. Solubilidad en agua

La solubilidad de las películas en agua se realizó de acuerdo a lo reportado por Wu *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Se recortaron tiras de películas de 2 cm x 2 cm las cuales fueron puestas en cápsulas de aluminio con 15 ml de agua destilada y agitadas suavemente a temperatura ambiente por 24 horas. La solución fue filtrada con papel Whatman N° 1 para recuperar los restos de película remanente, las cuales se desecaron a 100 ± 2 °C por 24 horas. El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones. La solubilidad de la película se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$S = (P_0 - P_f / P_0) * 100 \%$$

Donde:

P₀ = Peso de la muestra inicial

P_f = Peso de la muestra final

3.3.4.3. PROPIEDADES DE BARRERA

a. Permeabilidad al vapor de agua

La velocidad de transmisión del vapor de agua de las películas comestibles se midió usando un sistema de análisis Permatran-W 3/33 acoplado con un sensor infrarrojo modulado a 38 °C y 90 % de HR de acuerdo con el método F-1249 (ASTM 1995). La permeabilidad al vapor de agua se calculó dividiendo la velocidad de transmisión de vapor de agua entre la diferencia de la presión de vapor parcial atmosférica y multiplicando por el espesor promedio de la película en mm. El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones.

b. Permeabilidad al oxígeno

La velocidad de transmisión del oxígeno de las películas comestibles se midió usando un sistema modular Ox-Tran 2/20 acoplado con un sensor coulométrico a 23 ° C y 0 % de HR de acuerdo con el método D -3985 (ASTM 1995). Cada película se colocó sobre una máscara de acero inoxidable con un área de prueba abierta de 5 cm². La máscara se colocó luego en una celda de prueba, exponiéndose a un flujo de N₂/H₂ (98 %/ 2%) por un lado y un flujo de O₂ (100%) por el otro. La película se dejó equilibrar durante 10 h antes de que se registraran las medidas. La permeabilidad al oxígeno se calculó dividiendo la velocidad de transmisión de oxígeno entre la diferencia de la presión parcial de oxígeno entre celdas y multiplicando por el espesor promedio de la película. El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones.

3.3.4.4. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS

a. Cuantificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos de las películas comestibles se determinaron usando la metodología descrita por Gómez-Estaca *et al.* (2009^a) con algunas modificaciones y utilizando ácido gálico como reactivo estándar. Las lecturas se realizaron con un espectrofotómetro a 750 nm (Lambda 950 UV / Vis, PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EE. UU.). Los resultados, expresados en mg de ácido gálico / g de película. El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones.

b. Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las películas comestibles se determinó por el método FRAP

descrito por Gómez-Estaca *et al.* (2009^b) con algunas modificaciones. Las películas fueron cortadas en cuadrados de 2 x 2 cm y se disolvieron en agua destilada. Se cogió una alícuota de 30 µl de la dilución respectiva y se mezcló con 90 µl de agua destilada y 900 µl de reactivo FRAP (mezcla de TPTZ, FeCl₃ y buffer acetato de sodio) y se dejó en reposo en oscuridad por 30 minutos. Paralelamente se preparó una curva de calibración utilizando como patrón FeSO₄.7H₂O y se midieron las absorbancias a 595 nm. Los resultados se expresaron en mM equivalentes FeSO₄.7H₂O/ g de película. El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones.

c. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las películas con extracto de orégano se realizó según lo descrito por Teixeira *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Se utilizó la técnica de difusión de disco en agar Mueller Hinton. Se aislaron totalmente las cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella entérica*, *Salmonella tify*, *Shigella*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomona aeuroginosa* y *Bacillus cereus* en sus respectivos medios, tomando por cada microorganismo de 4 a 5 colonias y se colocaron en 5 ml de solución salina al 0,85 %. Se ajustaron las concentraciones con el tubo N° 0,5 Mc Farland (1,5 x 10⁸ UFC/ml). La suspensión ajustada (100 µl) se sembró sobre el agar Mueller Hinton para cada microorganismo en cada placa. Se cortaron discos circulares de 15 mm de diámetro de cada película y se colocaron sobre la superficie de las placas. Se incubaron las placas a temperatura de refrigeración (4 °C) hasta el crecimiento visible de cada bacteria. Posteriormente, se incubaron según la temperatura óptima de crecimiento para cada bacteria por 24 h. Luego se midieron los diámetros de los halos de inhibición (mm) de la actividad antimicrobiana de la siguiente manera:

$$C = A - B$$

C=Tamaño del halo de inhibición (mm)

A=Tamaño del halo + diámetro de película (mm)

B= Tamaño del diámetro de película (15 mm)

El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones.

3.3.5. ANÁLISIS EN FILETES DE TRUCHA EN REFRIGERACIÓN

Los filetes de trucha fueron recubiertos con la solución formadora de película en solución. Se evaluó el efecto del recubrimiento con 3 concentraciones de extracto de orégano (2, 4 y 6 %). Las evaluaciones se realizaron por duplicado durante un tiempo total de 11 días en un intervalo de 2 y 3 días.

3.3.5.1. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Los filetes de trucha fueron evaluados mediante las siguientes pruebas fisicoquímicas:

a. Composición química proximal

El análisis de composición química proximal en los filetes de trucha se realizó según lo detallado en el punto 3.3.1. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 3 mediciones.

b. Determinación de pH

Los análisis de pH se realizaron de acuerdo al método establecido en el Manual de Ensayos no Acreditados del Laboratorio de Físico-Química del Labs ITP (2004). Se tomaron 10 g de muestra y se mezcló con 90 ml de agua destilada hasta lograr una pasta homogénea en solución. La medición de pH se realizó directamente y el resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 3 mediciones.

c. Determinación de color

El color de los filetes se midió directamente utilizando un colorímetro. Segmentos de filetes fueron cortados, homogeneizados y puestos directamente en la celda del colorímetro registrándose los valores de L^* de 0 a 100 (luminosidad), a^* (intensidad de rojo) y b^* (intensidad de amarillo). El resultado promedio se determinó a partir de 3 mediciones por película.

d. Valor peróxido

El valor peróxido se realizó de acuerdo al método establecido en el Manual de Ensayos Acreditados del Laboratorio de Físico-Química del Labs ITP (2018). Primero se realizó la obtención de aceite a partir de los filetes de trucha realizando una mezcla de músculo con el solvente cloroformo (relación carne: solvente de 1:6) y posterior extracción. Luego se realizó

la concentración al vacío para eliminar el cloroformo y concentrar el aceite. Se cogió 10 ml de aceite, se agregó 20 ml de ácido acético glacial puro y se dejó reposar por 10 minutos, luego se le agregó 0,5 ml de yoduro de potasio y se dejó reposar 10 minutos en oscuridad. Finalmente se agregó 0,5 ml de almidón y 40 ml de agua. Luego se llevó a titulación con tiosulfato de sodio 0,01 N hasta la aparición de un color marrón en la base. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

e. Ácidos grasos libres

La medición de ácidos grasos libres se realizó de acuerdo al método establecido en el Manual de Ensayos Acreditados del Laboratorio de Físico- Química del Labs ITP (2018). Se realizó en el aceite extraído de los filetes de trucha. Se pesó alrededor de 2 g de aceite y se mezcló con 40 ml de alcohol neutralizado. Se tituló la mezcla con hidróxido de sodio 0,02 N hasta que vire a color rosado. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

f. Ácido tiobarbitúrico

La determinación del ácido tiobarbitúrico (TBA) se realizó de acuerdo al método establecido en el Manual de Ensayos no Acreditados del Laboratorio de Físico-Química del Labs ITP (2004). El ensayo se realizó directamente en los filetes de trucha pesando 5 gramos de filete y se adicionó 25 ml de TCA al 5 %, mezclándose por 1 minuto y se filtró (papel filtro N° 1). Se tomó una alícuota de 5 ml del filtrado y se agregó 5 ml de reactivo TBA, luego se incubó por 120 minutos a 90 °C. Se dejó enfriar los tubos y se realizó la lectura a una absorbancia de 532 nm. Estos valores fueron convertidos a mg de malonaldehído utilizando una curva de calibración preparada con 1,1,3,3 - tetraetoxipropano. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

g. Nitrógeno de bases volátiles totales (N-BVT)

La medición de N-BVT se realizó de acuerdo al método establecido en el Manual de Ensayos Acreditados del Laboratorio de Físico-Química del Labs ITP (2018). Se cogió $10 \pm 0,1$ g de músculo de trucha de cada tratamiento y se le agregó 90 ml de TCA al 5 %. La mezcla se homogenizó por 2 minutos y se filtró con papel Whatman N° 1. Se tomó 50 ml del filtrado, se agregó 1 gota de fenolftaleína y se destiló con 50 ml de ácido bórico al 3 % con 5 gotas de indicador Tashiro. El destilado se tituló con ácido clorhídrico 0,05 N hasta observar un

ligero cambio de color. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones. La determinación de BVN-T se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{N-BVT (expresado en mg/100g de muestra)} = \frac{(V_1 - V_0) \times 0,7 \times 2 \times 100}{M}$$

Donde:

V_1 = Volumen en mL de solución de HCl 0,05 N por muestra.

V_0 = Volumen en mL de solución de HCl 0,05 N por muestra en blanco.

M = Peso de la muestra en gramos.

3.3.5.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

Los filetes de trucha almacenados en refrigeración (3 – 4 °C) fueron evaluados a través de las siguientes pruebas microbiológicas:

a. Recuento de aerobios mesófilos

El recuento de aerobios mesófilos se realizó de acuerdo a la metodología FDA (2001). Se pesó 50 g de filete de trucha en 450 ml de diluyente (solución tamponada de Butterfield). Se prepararon diluciones decimales de 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y otras que sean necesarias a partir de la muestra, transfiriendo 1 ml de la dilución previa a 9 ml de diluyente. Se pipeteó 1 ml de cada dilución y se vertió en placas Petri por duplicado. Se añadió de 12-15 ml de Agar Plate Count. Se mezcló inmediatamente la muestra diluida y el agar de manera uniforme y completa mediante rotación alternada y movimientos hacia delante y detrás de las placas sobre una superficie plana y nivelada. Se dejó solidificar el agar y posteriormente se invirtieron las placas Petri solidificadas y se incubaron inmediatamente por 2 días a 35°C. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

b. Detección de *Salmonella spp.*

La detección de *Salmonella* se realizó de acuerdo al método horizontal para la detección de *Salmonella spp.* ISO 6579: 2002. Inicialmente se hizo un pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo mediante la inoculación de la muestra en agua bufferada tamponada (225 ml) con 25 g de muestra y se incubó a 37 °C por 18 ± 2 horas. Luego se sembró en el medio líquido de enriquecimiento selectivo Rappaport-Vassiliadis con soya ($41,5 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$

durante 24 h \pm 3 h) y el caldo Muller-Kauffmann tetracionato con novobiocina (37 °C \pm 1 °C durante 24 h \pm 3 h) con el cultivo obtenido del pre-enriquecimiento. De los cultivos obtenidos anteriormente, se inoculó en dos medios selectivos XLD (incubado a 37 °C \pm 1 °C durante 24 h \pm 3 h), y el agar SB (se incubó a 35 °C \pm 1 °C durante 48 h \pm 2 h). Para la confirmación e identificación después del sembrado en placa, las colonias presuntivas de *Salmonella* se subcultivaron y se confirmaron mediante pruebas bioquímicas y serológicas. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

c. Recuento de *Staphylococcus aureus*

El recuento de *Staphylococcus aureus* se realizó de acuerdo al método horizontal para el recuento de *Staphylococcus* coagulasa-positivos ISO 6888-1:1999. Se preparó una suspensión inicial adicionando 25 g de porción de muestra a 225 ml de diluyente. Luego se extendió 1 ml de la suspensión sobre la superficie de una placa grande de Agar Baird Parker con posterior incubación a 37 °C por 48 horas. Para la confirmación de las colonias características se utilizó pruebas bioquímicas. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

d. Identificación de *Listeria monocytogenes*

El aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* se realizó de acuerdo a USDA – FSIS. MLG (2013). Se pesó 25 g de muestra en 225 ml de diluyente (caldo de enriquecimiento selectivo para listeria UVM modificado), se incubó a 30 °C por 24 h. Luego, se transfirió 0,1 ml del caldo pre enriquecido a tubos que contengan caldo Fraser, estos se incubaron a 35 °C por 24h. Se transfirió una asada del cultivo a una placa con Agar Oxford modificado y se incubó a 35°C por 24 h. Para la confirmación se utilizó pruebas bioquímicas. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

e. Enumeración de *Escherichia coli*

Para la enumeración de *E.coli* se utilizó el método horizontal de *E. coli* β -glucuronidasa positivo. ISO/TS (2005). Para preparar la suspensión inicial, se adicionó 50 g de porción de muestra a 450 ml de diluyente. Luego se adicionó 10 ml de inóculo de la suspensión inicial a 5 tubos que contenían caldo glutamato modificado con minerales y 1 ml a 5 tubos con el mismo medio de cultivo. A continuación, se realizaron diluciones decimales de 10^{-2} o 10^{-3} las cuales fueron incubadas a 37 °C por 24 horas. De cada tubo incubado que muestra la presencia de acidez y/o turbidez, indicado por la presencia de una coloración amarilla, se

subcultivó con un asa de siembra a una placa de agar glucoronidasa triptona bilis y se estrió hasta obtener colonias aisladas incubando a 44 °C por 24 h. La presencia de colonias mostrando una sombra de color azul oscuro o claro o azul-verdoso, indican la presencia de *Escherichia coli* β-glucoronidasa positiva. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

f. Enumeración de *Vibrio parahaemolyticus*

Para la enumeración de *Vibrio parahaemolyticus* se utilizó el método FDA (2004). Para la reconstitución se pesó 25 g de muestra en 225 ml de diluyente (Buffer fosfato salino, PBS). Esto constituye la dilución 1: 10. Se preparó diluciones en PBS 1: 100 y 1:1000 y se incubó a 35°C x 8 horas. Se estrió con un asa de siembra en agar TCBS. Se incubaron las placas de TCBS a 35°C. Para la confirmación se utilizó pruebas bioquímicas. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

g. Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*

Para la detección de *Vibrio cholerae* se utilizó el método FAO (1992). Para la reconstitución, se pesó 25 g de muestra en 225 ml de diluyente (Agua Peptonada Alcalina), se incubó a 35°C x 8 horas. Después del período de incubación, se transfirieron asadas de la suspensión obtenidas a partir de la película formada sobre la superficie del medio incubado (crecimiento superficial) y se sembró sobre 3 medios diferentes: Agar TCBS, Agar Gelatina y Agar GPS. Se invirtieron las placas inoculadas y se incubaron a 35 °C por 18-24 horas. Para la confirmación se utilizó pruebas bioquímicas. El resultado promedio de cada ensayo se determinó a partir de 2 mediciones.

3.4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.4.1. OBTENCIÓN DE PELÍCULAS COMESTIBLES Y CON EXTRACTO DE ORÉGANO, Y DEL RECUBRIMIENTO PARA FILETES DE TRUCHA

El diagrama de flujo seguido para la obtención de películas comestibles y con extracto de orégano, así como del recubrimiento para filetes de trucha se muestra en la Figura 9:

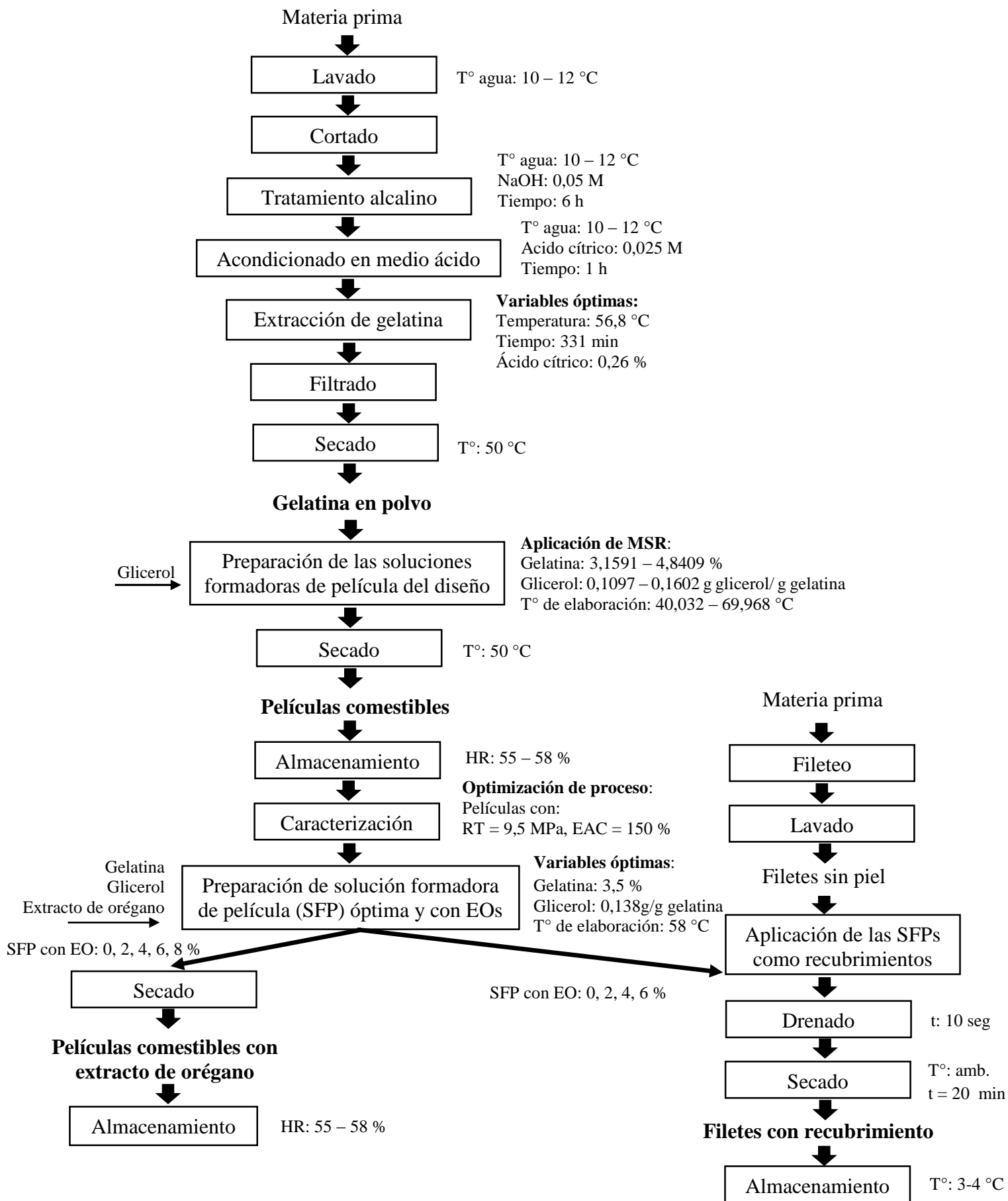


Figura 9 : Diagrama de flujo para la obtención de películas comestibles y con extracto de orégano, y del recubrimiento para filetes de trucha

3.4.2. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO

A continuación, se observa una descripción de las etapas del diagrama de flujo:

3.4.2.1. Materia prima

Se utilizaron pieles frescas de perico obtenidas después del fileteo del Mercado Mayorista Pesquero de Ventanilla. Estas pieles fueron trasladadas al Laboratorio de Físico-Química del ITP para su tratamiento.

3.4.2.2. Lavado

Las pieles fueron lavadas con agua fría (10 – 12 °C) para eliminar las impurezas como restos de sangre y materiales extraños.

3.4.2.3. Cortado

Primero se eliminaron con un cuchillo los restos de carne y escamas adheridos a la piel y luego se cortaron en cuadrados de 1 a 2 cm. Esta etapa se realizó con la finalidad de obtener las pieles a un tamaño mínimo que facilite el proceso de extracción.

3.4.2.4. Tratamiento alcalino

Esta etapa se realizó con la finalidad de eliminar la grasa remanente y de la proteína no colagénica. Las pieles fueron lavadas en una solución fría de hidróxido de sodio 0,05 M (10 – 12 °C) durante 6 horas, con un recambio a las 3 horas y en una relación de piel: solución de 1:5. Luego se enjuagaron con abundante agua fría (10 – 12 °C) hasta obtener un pH neutro y luego fueron escurridas.

3.4.2.5. Acondicionado en medio ácido

Las pieles lavadas se colocaron en recipientes con una solución fría (10 – 12 °C) de ácido cítrico 0,025 M durante 1 hora y en una relación de piel: solución de 1:5. Luego se enjuagaron con abundante agua fría (10 – 12 °C) hasta obtener un pH neutro y finalmente fueron escurridas.

3.4.2.6. Extracción de gelatina

La extracción de la gelatina se realizó bajo las condiciones: temperatura de 56,8 °C, tiempo de 331 minutos y ácido cítrico de 0,26 % según Romero (2016). El pH final fue de 4,9.

3.4.2.7. Filtrado

La solución obtenida después de la extracción se filtró (papel whatman N° 1) con la finalidad de separar y eliminar los restos de piel e impurezas como grasas suspendidas presentes en la solución de gelatina que puedan interferir en la calidad del producto final.

3.4.2.8. Secado

La gelatina en solución fue secada en una estufa por convección forzada a una temperatura de 50 °C hasta alcanzar un contenido de humedad menor a 13 %. Después del secado se obtuvieron láminas de gelatina, las cuales fueron molidas hasta obtener la gelatina en polvo.

3.4.2.9. Preparación de las soluciones formadoras de película del diseño

La preparación de las soluciones formadoras de películas se realizó de acuerdo a la metodología desarrollada por Gómez-Estaca *et al.* (2009^a) con algunas modificaciones. Se prepararon disoluciones de gelatina (3,1591 – 4,8409 %, X₁) en agua desionizada a 60 °C y se mezclaron hasta su completa solubilización. Luego se adicionó el glicerol (0,1097 – 0,1602 g glicerol/g gelatina, X₂) y se mezcló con agitación a temperaturas de elaboración (40,032 – 69,968 °C, X₃) durante 20 minutos aproximadamente.

3.4.2.10. Secado

Las soluciones formadoras de película fueron vertidas en placas de 9 cm de diámetro y se secaron en una estufa de convección por aire forzado a 50 °C por 20 horas hasta observar que las películas puedan despegarse fácilmente de las placas.

3.4.2.11. Almacenamiento

Las placas con las películas se almacenaron en un desecador con solución saturada de bromuro de sodio (55 – 58 % HR) a temperatura ambiente por un mínimo de 48 horas hasta la realización de los ensayos de caracterización.

3.4.2.12. Caracterización

Las películas de todos los tratamientos fueron caracterizadas en función a sus valores de resistencia a la tracción (RT) y elongación al corte (EAC). Con la data obtenida, se realizó la optimización multirespuesta con la finalidad de obtener los valores de las variables de

proceso que permitan obtener películas en condiciones óptimas, es decir, en función a los valores *target* u objetivo de RT = 9,5 MPa y EAC = 150 % previamente establecidos.

3.4.2.13. Preparación de solución formadora de película óptima y con extractos de orégano

Las soluciones formadoras de película fueron preparadas utilizando los valores óptimos de las variables de proceso (gelatina: 3,5 % p/v, glicerol: 0,138 g glicerol/ g gelatina y temperatura de elaboración: 58 °C) con la incorporación de 2, 4, 6 y 8 % v/v de extracto de orégano para la obtención de películas comestibles con extracto de orégano, mientras que las soluciones formadoras de película con 2, 4 y 6 % v/v de extracto de orégano se utilizaron como recubrimiento de filetes de trucha según el cuadro de composición que se detalla en el Anexo 8.

3.4.2.14. Secado

Las soluciones formadoras de película sin extracto y con 2, 4, 6 y 8 % v/v de extractos de orégano fueron vertidas en placas de 9 cm de diámetro y secadas en una estufa de convección por aire forzado a 50 °C por 20 horas hasta observar que las películas puedan despegarse fácilmente de las placas.

3.4.2.15. Almacenamiento

Las placas con las películas se almacenaron en un desecador con solución saturada de bromuro de sodio (55 – 58 % HR) a temperatura ambiente por un mínimo de 48 horas hasta la posterior realización de los ensayos de caracterización.

Paralelamente, se desarrollaron las etapas necesarias para la obtención de filetes de trucha recubiertos con las soluciones formadoras de películas con extractos de orégano:

3.4.2.16. Materia prima

Se empleó como materia prima trucha (*Oncorhynchus mykiss*) salmonada entera refrigerada, eviscerada y con piel, siendo las condiciones de recepción de materia prima: hielo de 1: 1 y una temperatura de 2 °C.

3.4.2.17. Fileteo

La trucha entera fue descabezada, las pieles fueron retiradas y luego se realizó el fileteo

mediante cortes paralelos a la columna vertebral. Los filetes obtenidos tuvieron un tamaño aproximado de 18 ± 2 cm de longitud.

3.4.2.18. Lavado

Los filetes obtenidos fueron lavados con agua refrigerada para eliminar restos de sangre y/o impurezas, así mismo el exceso de agua fue drenado antes de aplicar las soluciones de recubrimiento.

3.4.2.19. Aplicación de las soluciones formadoras de película (SFPs) como recubrimiento

Los filetes de trucha fueron recubiertos por inmersión con las soluciones formadoras de película con 2, 4 y 6 % de extracto de orégano.

3.4.2.20. Drenado

Los filetes recubiertos fueron colocados sobre bandejas de drenaje con apertura de malla de 2 mm durante 10 segundos para separar los restos de solución de recubrimiento remanentes de los filetes.

3.4.2.21. Secado

Los filetes fueron secados a temperatura ambiente durante un tiempo de 20 minutos y posteriormente envasados en bolsas de polietileno de 0,06 mm para su posterior almacenamiento.

3.4.2.22. Almacenamiento de filetes

Los filetes de trucha recubiertos y envasados fueron almacenados a temperatura de refrigeración ($3 - 4$ °C) para la posterior evaluación de sus propiedades fisicoquímicas y microbiológicas.

3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la evaluación del efecto de las variables de proceso: gelatina (X_1), glicerol (X_2) y temperatura de elaboración (X_3) sobre las variables de respuesta: resistencia a la tracción (Y_1) y elongación al corte (Y_2), así como la posterior determinación de los niveles de dichas variables que optimicen el proceso de obtención de las películas comestibles, se aplicó la

metodología de superficie de respuesta con un diseño central compuesto (DCC) (Gutiérrez y Vara, 2008).

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el Programa *Design-Expert versión 9.0*.

3.5.1. Selección o cribado

De acuerdo a Gutiérrez y Vara (2008) esta etapa sólo se lleva a cabo cuando se tiene entre 6 y 8 variables, en este caso sólo se trabajaron con 3 variables por lo que no fue necesario realizar esta etapa. El siguiente paso fue la búsqueda del modelo matemático de primer orden mediante el empleo de un diseño factorial completo con puntos al centro.

3.5.2. Búsqueda I o de primer orden: Estimación de los modelos matemáticos de primer orden

Esta etapa consistió en correr un diseño experimental de primer orden (diseño factorial) con puntos al centro que permita caracterizar de forma preliminar el tipo de superficie de respuesta y detectar la posible presencia de curvatura, así como verificar la falta de ajuste del modelo a los datos obtenidos y de acuerdo a ello pasar o no a la siguiente etapa.

3.5.2.1. Definición de la función objetivo y variables

Las funciones objetivo definidas para esta etapa fueron: resistencia a la tracción (Y_1) y elongación al corte (Y_2). Así mismo, las variables de estudio fueron gelatina (X_1), concentración de glicerol (X_2) y temperatura de elaboración (X_3). Estas variables se eligieron de acuerdo a lo reportado en estudios preliminares por otros autores. Los niveles de las variables X_1 , X_2 y X_3 se establecieron de acuerdo a los resultados obtenidos de las pruebas preliminares.

3.5.2.2. Diseño factorial 2^k con réplica en el punto central

En esta etapa se utilizó un diseño factorial (2^k) con réplicas en el punto central del diseño, debido a que éstas permiten detectar la posible presencia de curvatura (Gutiérrez y Vara, 2008). Las variables fueron codificadas en 2 niveles (-1, +1) e incluyeron un nivel para el punto central como se muestra en la Tabla 2. Así mismo, en la Tabla 3 se presenta las corridas experimentales correspondientes al diseño factorial (2^k) = 8 con 6 réplicas centrales.

Tabla 2: Variables independientes, naturales y codificadas con sus respectivos niveles en la etapa de búsqueda I

Variable	Símbolo		Niveles de las variables codificadas		
	Codificado	Natural	-1	0	1
Gelatina (%)	x_1	X_1	3,5	4,0	4,5
Glicerol (g glicerol/g gelatina)	x_2	X_2	0,12	0,135	0,15
Temperatura de elaboración (°C)	x_3	X_3	46,1	55,0	63,9

Tabla 3: Diseño utilizado en la etapa de búsqueda I

Tratamiento	X_1 : Gelatina (%)	X_2 : Glicerol (g glicerol/g gelatina)	X_3 : Temperatura de elaboración (°C)
1	3,5	0,12	46,1
2	4,5	0,12	46,1
3	3,5	0,15	46,1
4	4,5	0,15	46,1
5	3,5	0,12	63,9
6	4,5	0,12	63,9
7	3,5	0,15	63,9
8	4,5	0,15	63,9
9	4,0	0,135	55,0
10	4,0	0,135	55,0
11	4,0	0,135	55,0
12	4,0	0,135	55,0
13	4,0	0,135	55,0
14	4,0	0,135	55,0

La relación entre las variables codificadas (x_i) y naturales (X_i) es la siguiente:

Gelatina: $x_1 = (X_1 - 4) / 0,5$

Glicerol: $x_2 = (X_2 - 0,135) / 0,015$

Temperatura de elaboración: $x_3 = (X_3 - 55) / 8,9$

3.5.2.3. Estimación del modelo matemático de primer orden

a. Resistencia a la tracción

Los valores promedio de resistencia a la tracción (Y_1) observados, fueron sometidos a un análisis de regresión múltiple (método de mínimos cuadrados) y ajustados a un modelo de primer orden que describa la dependencia de dicha respuesta en función de las variables bajo estudio. Dicho polinomio correspondió a la siguiente ecuación de primer grado:

$$\hat{y}_1 = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1x_1 + \hat{\beta}_2x_2 + \hat{\beta}_3x_3$$

Donde:

\hat{y}_1 : resistencia a la tracción estimada (MPa)

$\hat{\beta}_0$: término independiente

$\hat{\beta}_1, \hat{\beta}_2, \hat{\beta}_3$: coeficientes de regresión lineal

x_1, x_2, x_3 : gelatina (%), glicerol (g glicerol/g gelatina) y temperatura de elaboración ($^{\circ}\text{C}$).

Luego se realizó el análisis de varianza para verificar la significancia del modelo estimado y de las variables en estudio, el efecto curvatura e interacción de coeficientes, y así establecer si el modelo matemático lineal fue o no suficiente para explicar las respuestas en dicha región experimental y poder asumir, de esta manera, la proximidad a la zona óptima. Se consideraron como significativas aquellas fuentes de variación cuyo valor de probabilidad p del estadístico F ($\text{prob} > F$) fueran menores al nivel de significación elegido ($\alpha = 0,05$).

La calidad del ajuste se evaluó observando la forma en que el modelo se ajustó a los datos. Para ello se calculó el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) debiendo ser el valor de cada uno de ellos cercano a 1.

b. Elongación al corte

Los valores promedio de elongación (Y_2) observados fueron sometidos a un análisis de regresión múltiple (método de mínimos cuadrados) y ajustados a un modelo de primer orden que describa la dependencia de dicha respuesta en función de las variables bajo estudio. Dicho polinomio correspondió a la siguiente ecuación de primer grado:

$$\hat{y}_2 = \hat{\beta}_0 + \hat{\beta}_1x_1 + \hat{\beta}_2x_2 + \hat{\beta}_3x_3$$

Donde:

\hat{y}_2 : elongación al corte estimada (%)

$\hat{\beta}_0$: término independiente

$\hat{\beta}_1, \hat{\beta}_2, \hat{\beta}_3$: coeficientes de regresión lineal

x_1, x_2, x_3 : gelatina (%), glicerol (g glicerol/g gelatina) y temperatura de elaboración (°C)

Luego se realizó el análisis de varianza (ANVA) para verificar la significancia del modelo estimado y de las variables en estudio, el efecto curvatura e interacción de coeficientes, y así establecer si el modelo matemático lineal fue o no suficiente para explicar las respuestas en dicha región experimental y poder asumir, de esta manera, la proximidad a la zona óptima. Se consideraron como significativas aquellas fuentes de variación cuyo valor de probabilidad p del estadístico F ($\text{prob} > F$) fueran menores al nivel de significación elegido ($\alpha = 0,05$).

La calidad del ajuste se evaluó observando la forma en que el modelo se ajustó a los datos. Para ello se calculó el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}) debiendo ser el valor de cada uno de ellos cercano a 1.

3.5.3. Búsqueda II: estimación de los modelos matemáticos de segundo orden

A través del análisis de la etapa anterior se detectó la presencia de curvatura del modelo de primer orden. En esta etapa, se completó un diseño de segundo orden para caracterizar mejor la superficie y modelar la curvatura. Una vez que se tuvo el modelo ajustado se determinaron las condiciones óptimas de operación del proceso (Gutiérrez y Vara, 2008).

3.5.3.1. Diseño compuesto central (DCC)

El análisis de superficie de respuesta de segundo orden para las respuestas resistencia a la tracción (Y_1) y elongación (Y_2) se realizó mediante un diseño central compuesto (DCC) que, según Montgomery (2011), para $k = 3$ factores consta de: 8 puntos factoriales (2^k), 6 puntos en los ejes axiales (a una distancia α) y 6 repeticiones al centro, dando un total de 20 corridas experimentales. Para determinar la ubicación de los puntos axiales se consideró $\alpha = (n_f)^{1/4} = 8^{1/4} = 1,682$, lo cual garantizó un diseño central compuesto rotatable. Las variables fueron codificadas en 5 niveles (-1,682, -1, 0, +1, +1,682). La Tabla 4 muestra los valores de cada nivel de las variables codificadas. En la Tabla 5 se presenta el diseño compuesto central (DCC) utilizado.

Tabla 4: Variables independientes, naturales y codificadas con sus respectivos niveles en la etapa del diseño compuesto central

Variable	Símbolo		Niveles de las variables codificadas				
	Codificado	Natural	-1,682	-1	0	+1	+1,682
Gelatina (%)	x_1	X_1	3,1591	3,5	4,0	4,5	4,8409
Glicerol (g glicerol/g gelatina)	x_2	X_2	0,1098	0,120	0,135	0,150	0,1602
Temperatura de elaboración (°C)	x_3	X_3	40,032	46,1	55,0	63,9	69,968

Con los valores de las variables y sus respectivos niveles se realizó la corrida en el programa *Design-Expert®*, Versión 9.

Tabla 5: Diseño utilizado en la etapa del diseño compuesto central

Tratamiento	X_1 : Gelatina (%)	X_2 : Glicerol (g/g gelatina)	X_3 : Temperatura de elaboración (°C)
1	3,5	0,120	46,1
2	4,5	0,120	46,1
3	3,5	0,150	46,1
4	4,5	0,150	46,1
5	3,5	0,120	63,9
6	4,5	0,120	63,9
7	3,5	0,150	63,9
8	4,5	0,150	63,9
9	3,1591	0,135	55,0
10	4,8409	0,135	55,0
11	4,0	0,1098	55,0
12	4,0	0,1602	55,0
13	4,0	0,135	40,032
14	4,0	0,135	69,968
15	4,0	0,135	55,0

16	4,0	0,135	55,0
17	4,0	0,135	55,0
18	4,0	0,135	55,0
19	4,0	0,135	55,0
20	4,0	0,135	55,0

3.5.3.2. Estimación de los modelos matemáticos de segundo orden

a. Resistencia a la tracción

Los valores promedio de resistencia a la tracción observados fueron sometidos a un análisis de regresión múltiple (método de mínimos cuadrados) y ajustados a un modelo de segundo orden, que incluya la curvatura de la superficie y que describa la dependencia de dicha respuesta en función de las variables de estudio. Dicho polinomio correspondió a la siguiente ecuación de segundo grado:

$$\hat{y}_1 = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \hat{\beta}_{ij} x_i x_j$$

Donde:

\hat{y}_1 : resistencia a la tracción estimada (MPa)

$\hat{\beta}_0$: término independiente

$\hat{\beta}_i$: coeficientes de regresión lineal

$\hat{\beta}_{ii}, \hat{\beta}_{ij}$: coeficientes de regresión cuadráticos

x_1, x_2, x_3 : gelatina (%), glicerol (g glicerol/g gelatina) y temperatura de elaboración (°C)

Posteriormente, se realizó el análisis de varianza y la prueba de significancia de los coeficientes del modelo estimado a un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

De acuerdo a Montgomery (2011) y Gutiérrez y Vara (2008), el análisis de varianza consiste en establecer la significancia estadística del modelo y coeficientes del mismo, además de una falta de ajuste no significativa. La significancia estadística del modelo y de los coeficientes se establecieron mediante la prueba F de Fisher, debiéndose registrar un valor de probabilidad p ($\text{prob} > F$) $< 0,05$. Por otro lado, la falta de ajuste del modelo fue también

establecida mediante esta prueba, debiendo ser su valor de probabilidad p ($\text{prob} > F$) $> 0,05$. Así mismo, la calidad del ajuste del modelo a los datos observados fue establecida mediante el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2_{aj}), debiendo ser el valor de cada uno cercano a 1.

b. Elongación al corte

Los valores promedio de elongación al corte observados, fueron sometidos a un análisis de regresión múltiple (método de mínimos cuadrados) y ajustados a un modelo de segundo orden, que incluya la curvatura de la superficie y que describa la dependencia de dicha respuesta en función de las variables de estudio. Dicho polinomio correspondió a la siguiente ecuación de segundo grado:

$$\hat{y}_2 = \hat{\beta}_0 + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_i x_i + \sum_{i=1}^k \hat{\beta}_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \hat{\beta}_{ij} x_i x_j$$

Donde:

\hat{y}_2 : elongación al corte estimada (%)

$\hat{\beta}_0$: término independiente

$\hat{\beta}_i$: coeficientes de regresión lineal

$\hat{\beta}_{ii}, \hat{\beta}_{ij}$: coeficientes de regresión cuadráticos

x_1, x_2, x_3 : gelatina (%), glicerol (g glicerol /g gelatina) y temperatura de elaboración (°C)

Posteriormente, se realizó el análisis de varianza y la prueba de significancia de los coeficientes del modelo estimado a un nivel de significación $\alpha = 0,05$.

De acuerdo a Montgomery (2011) y Gutiérrez y Vara (2008), el análisis de varianza consiste en establecer la significancia estadística del modelo y coeficientes del mismo, además de una falta de ajuste no significativa. La significancia estadística del modelo y de los coeficientes se establecieron mediante la prueba F de Fisher, debiéndose registrar un valor de probabilidad p ($\text{prob} > F$) $< 0,05$. Por otro lado, la falta de ajuste del modelo fue también establecida mediante esta prueba, debiendo ser su valor de probabilidad p ($\text{prob} > F$) $> 0,05$. Así mismo, la calidad del ajuste del modelo a los datos observados se estableció mediante el coeficiente de determinación (R^2), cuyo valor debe ser cercano a 1.

3.5.4. Optimización simultánea de las respuestas

Una vez obtenidos los modelos matemáticos de segundo orden correspondientes a cada respuesta evaluada se llevó a cabo la optimización simultánea de las respuestas, lo cual permitió encontrar las condiciones de la formulación de la película comestible que cumplieran de la mejor manera determinadas restricciones. Para ello se tuvo en cuenta el método de la función de deseabilidad, descrita por Montgomery (2011) y Gutiérrez y Vara (2008).

Para optimizar las condiciones de formulación de cada respuesta \hat{y}_i se utilizó el enfoque de la función con condición de deseable. Para ello se eligió $B = 9,5$ como el objetivo para la respuesta resistencia a la tracción, y $B = 150$ como el objetivo para la respuesta elongación al corte.

Bajo estas restricciones, para la optimización de la resistencia a la tracción y la elongación al corte se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$d_1 = \begin{cases} 0 & \hat{y}_1 < RT \text{ min} \\ \left(\frac{\hat{y}_1 - RT \text{ min}}{9,5 - RT \text{ min}} \right)^{r_1} & RT \text{ min} \leq \hat{y}_1 \leq 9,5 \\ \left(\frac{RT \text{ máx} - \hat{y}_1}{RT \text{ máx} - 9,5} \right)^{r_2} & 9,5 \leq \hat{y}_1 \leq RT \text{ máx} \\ 0 & \hat{y}_1 > RT \text{ máx} \end{cases}$$

$$d_2 = \begin{cases} 0 & \hat{y}_2 < EAC \text{ min} \\ \left(\frac{\hat{y}_2 - EAC \text{ min}}{150 - EAC \text{ min}} \right)^{r_1} & EAC \text{ min} \leq \hat{y}_2 \leq 150 \\ \left(\frac{EAC \text{ máx} - \hat{y}_2}{EAC \text{ máx} - 150} \right)^{r_2} & 150 \leq \hat{y}_2 \leq EAC \text{ máx} \\ 0 & \hat{y}_2 > EAC \text{ máx} \end{cases}$$

Donde:

d_1 : función de deseabilidad para la resistencia a la tracción

d_2 : función de deseabilidad para la elongación al corte

\hat{y}_1 : resistencia a la tracción estimada (MPa)

\hat{y}_2 : elongación al corte estimada (%)

EAC min: Elongación al corte mínima

EAC máx: Elongación al corte máxima

RT min: Resistencia a la tracción mínima

RT máx: Resistencia a la tracción máxima

El valor denominado deseabilidad global (D) representó la media geométrica de los valores de las deseabilidades individuales (d_i), es decir:

$$D = (d_1 \times d_2)^{1/2}$$

Se eligió como tratamiento óptimo aquella combinación de niveles de las variables que tuvieron el valor D más alto. Para la realización de esta optimización simultánea, se utilizó también el programa estadístico *Design Expert® versión 9.0*.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERÍSTICAS DE LA MATERIA PRIMA

4.1.1. Composición química proximal

La composición proximal de la piel de perico y de la gelatina extraída en polvo bajo condiciones óptimas se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Composición química proximal (g/100 g) de la piel de perico y de la gelatina

Componente	Piel de perico		Gelatina de piel de perico	
	Base húmeda	Base seca	Base húmeda	Base seca
Humedad	67,0 ± 0,15	-----	7,0 ± 0,05	-----
Proteína total	29,1 ± 0,12	88,2 ± 1,35	89,0 ± 0,06	95,7 ± 0,02
Grasa cruda	2,0 ± 0,28	6,1 ± 1,89	0,2 ± 0,03	0,2 ± 0,04
Ceniza	2,1 ± 0,04	6,4 ± 2,01	1,3 ± 0,05	1,4 ± 0,06

Los resultados de la Tabla 6 muestran que la piel de perico presentó una humedad de 67,0 % y contenido proteico total cercano al 30 %. Cabe indicar que los ensayos se realizaron en pieles sin restos de carne ni escamas. El alto valor del contenido proteico se debe al aporte principalmente de la proteína colagénica constituyente de las pieles. El contenido de grasa corresponde a los lípidos constituyentes de la capa fosfolipídica de las pieles mientras que el contenido de ceniza se podría deber a los restos de escamas presentes en las pieles.

En cuanto a la gelatina, se observa que el contenido de proteína es cercano al 90 %, el contenido de grasa cruda cercano al 0 % y el contenido de cenizas de 1,3 %. Estos resultados son cercanos a los valores reportados por Romero (2016), ya que se empleó los mismos parámetros de proceso de la optimización.

4.2. OBTENCIÓN DE LA PELÍCULA COMESTIBLE

4.2.1. Efecto de las variables gelatina, glicerol y temperatura de elaboración sobre las características mecánicas de la película

Para la obtención de la película comestible bajo condiciones óptimas primero se evaluó el efecto de las variables gelatina, glicerol y temperatura de elaboración sobre las características mecánicas de la película mediante etapas que incluyeron la utilización de modelos matemáticos.

4.2.1.1. Búsqueda I o de primer orden: estimación de los modelos matemáticos de primer orden

En la etapa de búsqueda I se evaluó el efecto de las variables de estudio sobre las propiedades mecánicas de la película comestible: resistencia a la tracción (RT) y elongación al corte (EAC).

a. Resistencia a la tracción

En la Tabla 7 se muestra los valores promedio experimentales de la resistencia a la tracción, de las películas comestibles para cada tratamiento analizado respecto a los efectos combinados de las variables gelatina, glicerol y temperatura de elaboración. Los valores de RT fluctuaron entre 7,6 – 13,9 MPa y a través del análisis estadístico se evaluará el efecto de las variables de estudio sobre la variable respuesta, resistencia a la tracción, de las películas.

Tabla 7: Valores experimentales de resistencia a la tracción en la etapa de búsqueda I

Tratamiento	X ₁ : Gelatina (%)	X ₂ : Glicerol (g glicerol/g gelatina)	X ₃ : Temperatura de elaboración (°C)	Y ₁ : Resistencia a la tracción (MPa) experimental
1	3,5	0,120	46,1	12,2
2	4,5	0,120	46,1	13,9
3	3,5	0,150	46,1	8,2
4	4,5	0,150	46,1	10,9
5	3,5	0,120	63,9	10,4
6	4,5	0,120	63,9	9,6
7	3,5	0,150	63,9	7,6

8	4,5	0,150	63,9	8,8
9	4,0	0,135	55,0	10,0
10	4,0	0,135	55,0	9,8
11	4,0	0,135	55,0	9,8
12	4,0	0,135	55,0	10,0
13	4,0	0,135	55,0	10,0
14	4,0	0,135	55,0	10,0

Se realizó el análisis estadístico para evaluar el efecto de las variables y el efecto combinado de éstas sobre la resistencia a la tracción (Anexo 2). El análisis de varianza (ANVA) del modelo lineal incluyó los efectos simples y de interacción y se realizó con la finalidad de determinar los efectos que contribuyeron a explicar el comportamiento de la variable respuesta: resistencia a la tracción.

Según el ANVA, el valor p ($\text{prob} > F$) del modelo fue inferior a 0,05 y 0,01, por lo tanto, al menos uno de los efectos evaluados (principales o interacciones) tuvo un efecto significativo. Gutiérrez y Vara (2008) mencionan que, si el valor p del efecto es menor que el nivel de significancia prefijado α , se concluye que el efecto es estadísticamente distinto de cero, es decir, influye de manera significativa sobre la respuesta. Además, mientras más pequeño sea el valor p o más grande sea el valor F_c de un efecto, éste es más importante sobre la respuesta.

En el ANVA se observa que para un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ los efectos que tuvieron un valor p ($\text{prob} > F$) $< 0,05$ fueron los efectos principales (x_1 , x_2 , x_3) y los efectos interacción (x_1x_2 , x_1x_3 y x_2x_3), demostrando que las tres variables estudiadas afectan el proceso significativamente, siendo el efecto principal x_2 (glicerol) el más importante sobre la respuesta por tener el mayor valor de F_c . Esta significancia obtenida coincide con la afirmación hecha por Da Silva *et al.* (2018) quienes encontraron que la concentración de gelatina y del plastificante glicerol tuvieron influencia significativa en los valores de resistencia a la tracción en películas de gelatina de pescado.

En el ANVA también se observa que el efecto de la curvatura resultó ser significativo puesto que el valor resultante de p ($\text{prob} > F$) fue $< 0,05$. Así mismo, la falta de ajuste también resultó ser significativa pues el valor de p ($\text{prob} > F$) fue $< 0,05$. Al respecto, Gutiérrez y Vara (2008) mencionan que una falta de ajuste significativa es un fuerte indicio de curvatura

mientras que Montgomery (2011) menciona que la existencia de curvatura en la superficie puede indicar al experimentador que se encuentra cerca del óptimo.

Ambos resultados indican que el modelo lineal o de primer orden es insuficiente para explicar la relación entre las variables de estudio y la variable respuesta en la región experimentada elegida, por tal razón, es necesario utilizar un modelo cuadrático o de segundo orden que explique adecuadamente la relación entre las variables de estudio y respuesta.

Luego de realizar el análisis de regresión múltiple con los valores observados, se obtuvo el siguiente modelo matemático o ecuación polinomial de primer grado, en términos de los factores codificados:

$$\hat{y}_1 = 10,09 + 0,60 x_1 - 1,33 x_2 - 1,10 x_3 + 0,38 x_1 x_2 - 0,50 x_1 x_3 + 0,43 x_2 x_3$$

Donde \hat{y}_1 representa la resistencia a la tracción estimada (MPa); y x_1 , x_2 y x_3 representan la gelatina (%), el glicerol (g glicerol/ g gelatina) y la temperatura de elaboración (°C), respectivamente, en su forma codificada.

Para medir la calidad de ajuste del modelo de regresión múltiple se utilizó el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9866$) y el coeficiente de determinación ajustado ($R^2_{aj} = 0,9752$). Montgomery (2011) menciona que ambos coeficientes sirven para cuantificar el porcentaje de variabilidad presente en los datos y que es explicado por el modelo, ambos valores deben estar entre 0 y 1 pero son deseables los valores cercanos a 1. En este caso, el valor de R^2_{aj} de 0,9752 significa que el 97,52 % de la variabilidad de los datos es explicada por el modelo lineal ajustado.

La falta de ajuste y presencia de curvatura en el modelo también puede ser observada de manera gráfica. La Figura 10 muestra la superficie de respuesta para la resistencia a la tracción en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2). La variable temperatura de elaboración ($X_3 = 55$) permaneció constante en su nivel central con la finalidad de facilitar la representación gráfica tridimensional de la superficie.

En la Figura 10 se aprecia que los puntos centrales del diseño (puntos rojos) se encontraron fuera de la superficie correspondiente a la superficie plana. Ello indica de manera gráfica, la presencia de curvatura y una falta de ajuste al modelo lineal. Con esta información, se

continuó con la siguiente etapa para estimar el modelo de segundo orden y ubicar el punto óptimo.

X1 = A: Gelatina

X2 = B: Glicerol

Actual Factor

C: Temperatura de elaboración = 55

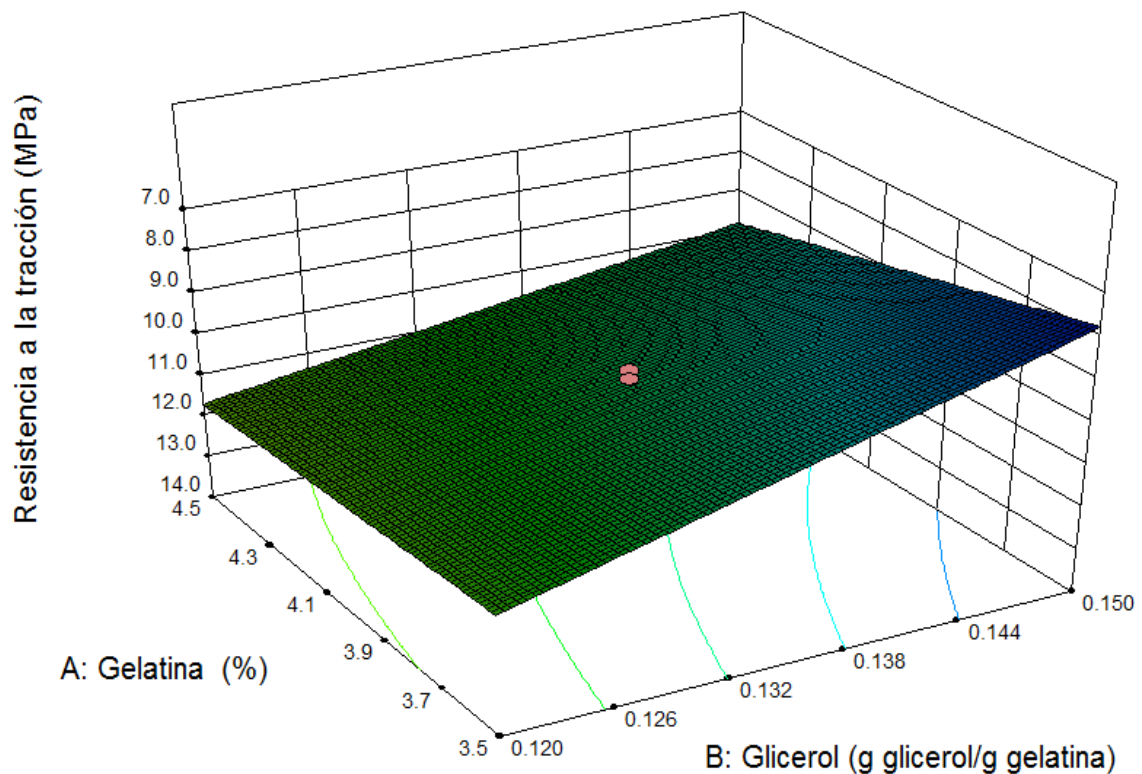


Figura 10: Superficie de respuesta para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en la búsqueda del modelo de primer orden

b. Elongación al corte

En la Tabla 8 se muestra los valores promedio experimentales de la elongación al corte de las películas comestibles para cada tratamiento analizado respecto a los efectos combinados de las variables gelatina, glicerol y temperatura de elaboración. Los valores de EAC fluctuaron entre 9 – 276 % y a través del análisis estadístico se evaluará el efecto de las variables de estudio sobre la variable respuesta, elongación al corte, de las películas.

Tabla 8: Valores experimentales de elongación al corte en la etapa de búsqueda I

Tratamiento	X ₁ : Gelatina (%)	X ₂ : Glicerol (g glicerol /g gelatina)	X ₃ : Temperatura de elaboración (°C)	Y ₂ : Elongación al corte (%) experimental
1	3,5	0,120	46,1	12
2	4,5	0,120	46,1	9
3	3,5	0,150	46,1	215
4	4,5	0,150	46,1	33
5	3,5	0,120	63,9	115
6	4,5	0,120	63,9	122
7	3,5	0,150	63,9	276
8	4,5	0,150	63,9	154
9	4,0	0,135	55,0	88
10	4,0	0,135	55,0	96
11	4,0	0,135	55,0	86
12	4,0	0,135	55,0	84
13	4,0	0,135	55,0	85
14	4,0	0,135	55,0	81

Se realizó el análisis estadístico para evaluar el efecto de las variables y el efecto combinado de estas sobre la elongación al corte (Anexo 3). El análisis de varianza (ANVA) del modelo lineal incluyó los efectos simples y de interacción y se realizó con la finalidad de determinar los efectos que contribuyeron a explicar el comportamiento de la variable respuesta: elongación al corte.

Según el ANVA, el valor p ($\text{prob} > F$) del modelo fue inferior a 0,05 y 0,01, por lo tanto, al menos uno de los efectos evaluados (principales o interacciones) tuvo un efecto significativo. Gutiérrez y Vara (2008) mencionan que, si el valor p del efecto es menor que el nivel de significancia prefijado α , se concluye que el efecto es estadísticamente distinto de cero, es decir, influye de manera significativa sobre la respuesta. Además, mientras más pequeño sea el valor p o más grande sea el valor F_c de un efecto, éste es más importante sobre la respuesta.

En el ANVA se observa que para un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ los efectos que tuvieron un valor p ($\text{prob} > F$) $< 0,05$ fueron los efectos principales (x_1 , x_2 , x_3) y los efectos interacción (x_1x_2 y x_1x_3), demostrando que las tres variables estudiadas afectan el proceso significativamente, siendo el efecto principal x_2 (glicerol) el más importante sobre la respuesta por tener el mayor valor de F_c . Por otro lado, el efecto de la interacción x_2x_3 resultó no significativo pues el valor de p ($\text{prob} > F$) fue $> 0,05$.

En el ANVA también se observa que el efecto de la curvatura resultó ser significativo puesto que el valor resultante de p ($\text{prob} > F$) fue $< 0,05$. Así mismo, la falta de ajuste también resultó ser significativa pues el valor de p ($\text{prob} > F$) fue $< 0,05$. Al respecto, Gutiérrez y Vara (2008) mencionan que una falta de ajuste significativa es un fuerte indicio de curvatura mientras que Montgomery (2011) menciona que la existencia de curvatura en la superficie puede indicar al experimentador que se encuentra cerca del óptimo.

Ambos resultados indican que el modelo lineal o de primer orden es insuficiente para explicar la relación entre las variables de estudio y la variable respuesta en la región experimentada elegida, por tal razón, es necesario utilizar un modelo de cuadrático o de segundo orden que explique adecuadamente la relación entre las variables de estudio y respuesta.

Luego de realizar el análisis de regresión múltiple con los valores observados, se obtuvo el siguiente modelo matemático o ecuación polinomial de primer grado:

$$\hat{y}_2 = 104,00 - 37,50 x_1 + 52,50 x_2 + 49,75 x_3 - 38,50 x_1x_2 + 8,75x_1x_3$$

Donde \hat{y}_2 representa la elongación al corte estimada (%); y x_1 , x_2 y x_3 la gelatina (%), el glicerol (g glicerol/ g gelatina) y la temperatura de elaboración ($^{\circ}\text{C}$), respectivamente, en su forma codificada.

Para medir la calidad de ajuste del modelo de regresión múltiple se utilizó el coeficiente de determinación ($R^2 = 0,9481$) y el coeficiente de determinación ajustado ($R^2_{aj} = 0,9036$).

Montgomery (2011) menciona que ambos coeficientes sirven para cuantificar el porcentaje de variabilidad presente en los datos y que es explicado por el modelo, ambos valores deben estar entre 0 y 1 pero son deseables los valores cercanos a 1. En este caso, el valor de R^2_{aj} de 0,9036 significa que el 90,36 % de la variabilidad de los datos es explicada por el modelo lineal ajustado. La falta de ajuste y presencia de curvatura en el modelo también puede ser

observada de manera gráfica. La Figura 11 muestra la superficie de respuesta para la resistencia a la tracción en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2). La variable temperatura de elaboración ($X_3 = 55$) permaneció constante en su nivel central con la finalidad de facilitar la representación gráfica tridimensional de la superficie.

$X_1 = A$: Gelatina
 $X_2 = B$: Glicerol

Actual Factor
C: Temperatura de elaboración = 55

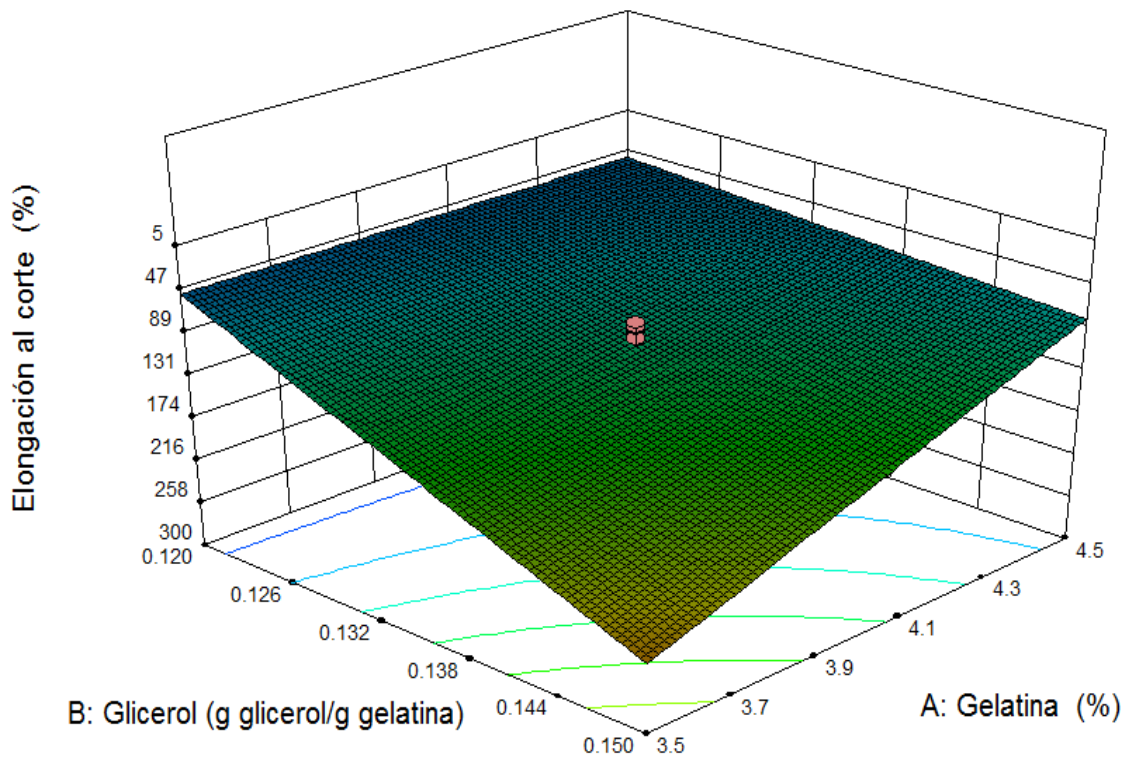


Figura 11: Superficie de respuesta para la elongación al corte, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en la búsqueda del modelo de primer orden

4.2.1.2. Búsqueda II o de segundo orden: estimación de los modelos matemáticos de segundo orden

En esta etapa se completó un diseño compuesto central a partir del modelo lineal para estimar el modelo de segundo orden y ubicar el punto óptimo para cada respuesta.

a. Resistencia a la tracción

La Tabla 9 muestra los valores promedio experimentales de la resistencia a la tracción de las películas comestibles para cada tratamiento analizado.

Tabla 9: Valores experimentales de la resistencia a la tracción en el DCC

Tratamiento	X ₁ : Gelatina (%)	X ₂ : Glicerol (g/g gelatina)	X ₃ : Temperatura de elaboración (°C)	Y ₁ : Resistencia a la tracción (MPa) experimental
1	3,5	0,120	46,1	12,2
2	4,5	0,120	46,1	13,9
3	3,5	0,150	46,1	8,2
4	4,5	0,150	46,1	10,9
5	3,5	0,120	63,9	10,4
6	4,5	0,120	63,9	9,6
7	3,5	0,150	63,9	7,6
8	4,5	0,150	63,9	8,8
9	3,1591	0,135	55,0	11,1
10	4,8409	0,135	55,0	13,0
11	4,0	0,1098	55,0	12,6
12	4,0	0,1602	55,0	7,9
13	4,0	0,135	40,032	10,2
14	4,0	0,135	69,968	7,0
15	4,0	0,135	55,0	10,0
16	4,0	0,135	55,0	9,8
17	4,0	0,135	55,0	9,8
18	4,0	0,135	55,0	10,0
19	4,0	0,135	55,0	10,0
20	4,0	0,135	55,0	10,0

Los valores de resistencia a la tracción observados fluctuaron entre 7,0 – 13,9 MPa y el mayor porcentaje de los tratamientos presentó un valor de $RT > 10$, correspondiente a la característica de marginal según la clasificación de Han (2014). En la Tabla 9 se observa que el incremento de gelatina, empleando temperaturas de elaboración menores de 50 °C, resultó en un incremento de la resistencia a la tracción; sin embargo, cuando la temperatura de elaboración se incrementó (a partir de 63,9 °C), los valores de RT fueron influenciados en mayor medida por el contenido de glicerol que por el incremento de la gelatina.

Se realizó el análisis de varianza (ANVA) del modelo cuadrático (Anexo 3) donde se incluyó los efectos simples, efectos interacción y los efectos cuadráticos, y se realizó con la finalidad de determinar la significancia de los efectos que contribuyeron a explicar el comportamiento de la resistencia a la tracción.

Según el ANVA, para un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ el modelo resultó ser significativo y los efectos que tuvieron un valor p ($\text{prob} > F$) menor a 0,05 fueron los efectos principales (x_1, x_2, x_3), los efectos interacción $x_1 x_2$, $x_1 x_3$ y $x_2 x_3$ y los efectos cuadráticos x_1^2 y x_3^2 . Sólo el efecto cuadrático x_2^2 resultó no significativo.

La falta de ajuste resultó no significativa puesto que el valor p ($\text{prob} > F = 0,0507$) es superior a 0,05. Al respecto, Gutiérrez y Vara (2008) mencionan que una falta de ajuste no significativa indica que el modelo de segundo orden se ajusta de manera conveniente a los datos.

De acuerdo al ANVA analizado, se concluye que el modelo de segundo orden propuesto es una aproximación adecuada de los datos para explicar la respuesta en la región experimental elegida. La ecuación polinomial de segundo grado que relaciona la variable respuesta con las variables de estudio viene a ser la siguiente:

$$\hat{y}_1 = 9,94 + 0,59x_1 - 1,35x_2 - 1,04x_3 + 0,38x_1x_2 - 0,50x_1x_3 + 0,43x_2x_3 + 0,72x_1^2 - 0,50x_3^2$$

En la ecuación resultante sólo se han considerado los términos significativos según el ANVA analizado.

Los contornos y superficies de respuesta presentados en las Figuras 12 a 17, muestran la influencia de dos variables de manera simultánea sobre la variable respuesta, resistencia a la tracción, RT.

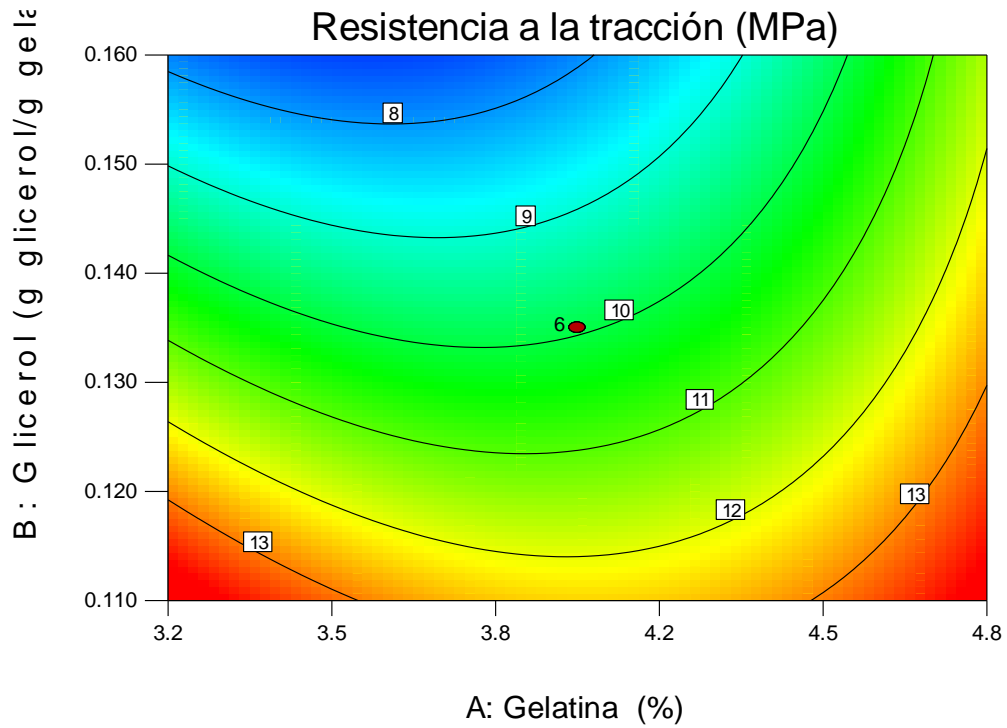


Figura 12: Contornos para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en el diseño compuesto central

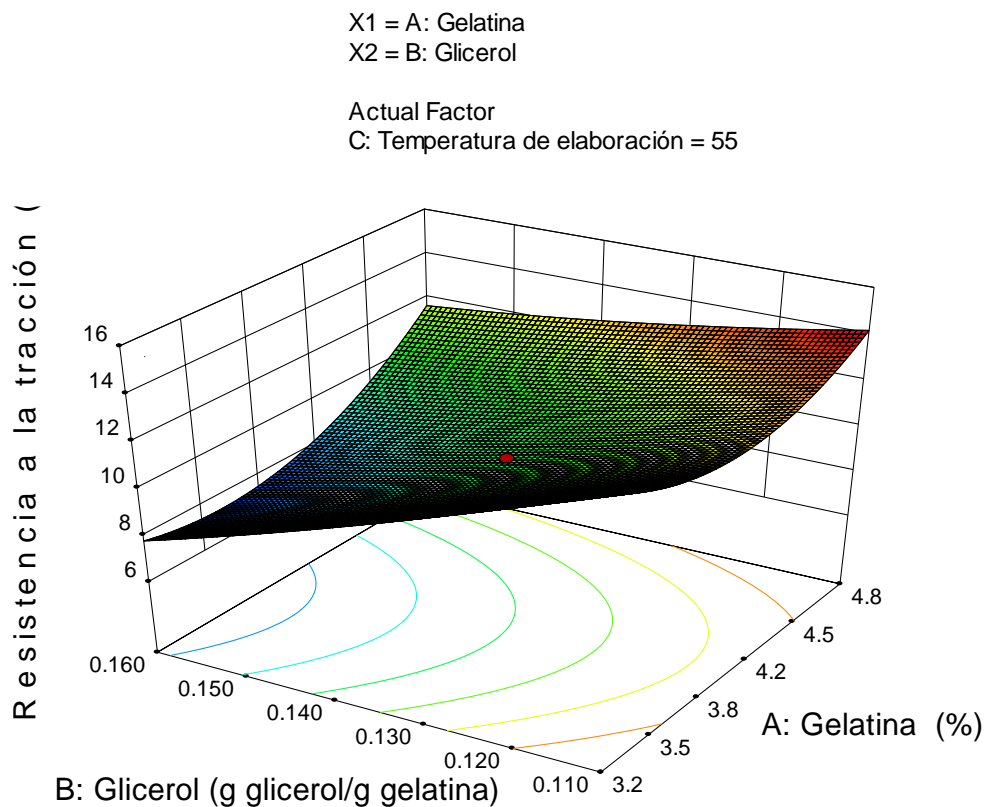


Figura 13: Superficie de respuesta para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X_1) y glicerol (X_2) en el diseño compuesto central

Las Figuras 12 y 13 muestran la variación de la resistencia a la tracción, RT, en función a la variación de la concentración de gelatina y glicerol. En la Figura 12 se observa valores específicos y constantes de RT empleando el rango de valores de estudio de gelatina con un nivel específico de glicerol. Un aumento o disminución del plastificante causó la variación de la RT de manera inversa.

Así, en la gráfica se observa que el aumento de la gelatina junto con una disminución del glicerol, dio lugar a un incremento de la RT de las películas. Al respecto, Cuq, Gontard, Cuq y Guilbert (1996) sostienen que el aumento de la RT causada por un incremento de la concentración de proteína, se debe a un aumento del número de cadenas proteicas por unidad de superficie, lo cual conlleva generalmente a un incremento en el número de interacciones intermoleculares.

Además se observa que la disminución de gelatina y el incremento del glicerol disminuyó la RT de las películas. El incremento de glicerol dio lugar a una mayor cantidad de interacciones con la proteína, resultando en películas más flexibles o con menores valores de RT. La disminución de la RT respecto al incremento del glicerol, un plastificante de bajo peso molecular, ocurre debido a la reducción de las interacciones proteína-proteína, debido a que las moléculas de glicerol compiten con las cadenas proteicas por los enlaces de hidrógeno mediante sus grupos OH y por las interacciones electrostáticas, aumentando el volumen libre y la movilidad molecular o flexibilidad de la película, por lo que, ante la aplicación de una fuerza para romper el material, éste ofrece una menor resistencia cuando tiene el plastificante. Esto está relacionado a la disminución de la proporción de región cristalina a región amorfa y una disminución de la temperatura de transición vítrea de las proteínas (Limpisophon *et al.*, 2009).

Sin embargo, también se observa que cuando ambas variables se incrementan o disminuyen, predomina el efecto del glicerol sobre la RT. Esto se debe a que el *F_c* del ANVA de la variable glicerol es mayor que el de la gelatina, lo cual indica que esta variable es más importante sobre la respuesta.

Nur Hanani *et al.* (2012) evaluaron el incremento de 4 – 8 % de gelatina de pescado, bovino y porcino de 240, 220 y 225 grados bloom respectivamente, y un nivel fijo de plastificante, sobre los valores de RT de películas comestibles. Las películas de pescado mostraron rangos de RT de 3,42 – 5,85 MPa mientras que las películas de origen bovino y porcino mostraron valores de 4,04 – 7,65 MPa y 4,46 – 10,64 MPa, respectivamente. El incremento de gelatina

causó un aumento de la RT en todas las películas, sin embargo, las películas de gelatina de pescado presentaron los menores valores de RT.

En el presente trabajo se obtuvieron valores de RT más altos, lo cual podría deberse, a la mayor fuerza de gel de la gelatina de piel de perico empleada (385 g). Esto esta relacionado con lo reportado por Ninan *et al.* (2010), quienes obtuvieron películas a partir de 5 tipos de gelatina con diferentes valores de fuerza de gel y determinaron que la película obtenida empleando la gelatina de mayor valor de fuerza de gel tuvo el valor más alto de RT.

Limpisophon *et al.* (2009) emplearon 1, 2 y 3 % de gelatina de piel de tiburón en la obtención de películas comestibles, encontrando que el aumento de la gelatina y del glicerol causó un incremento de la RT hasta la película con 2 % de proteína (máximo valor de RT) a partir del cual disminuyó. Al igual que en el presente trabajo, estos resultados muestran que la RT no dependen sólo de la concentración de proteína sino de su interacción con el glicerol. También evaluaron el incremento del glicerol sobre la RT, determinando una relación inversa.

En la Figura 12 también se observa que los niveles más bajos de glicerol dieron lugar a películas comestibles con los valores más altos de RT. Shahiri *et al.* (2017) reportaron un efecto similar en películas de gelatina de piel de tiburón blanco (*Carcharhinus dussumieri*).

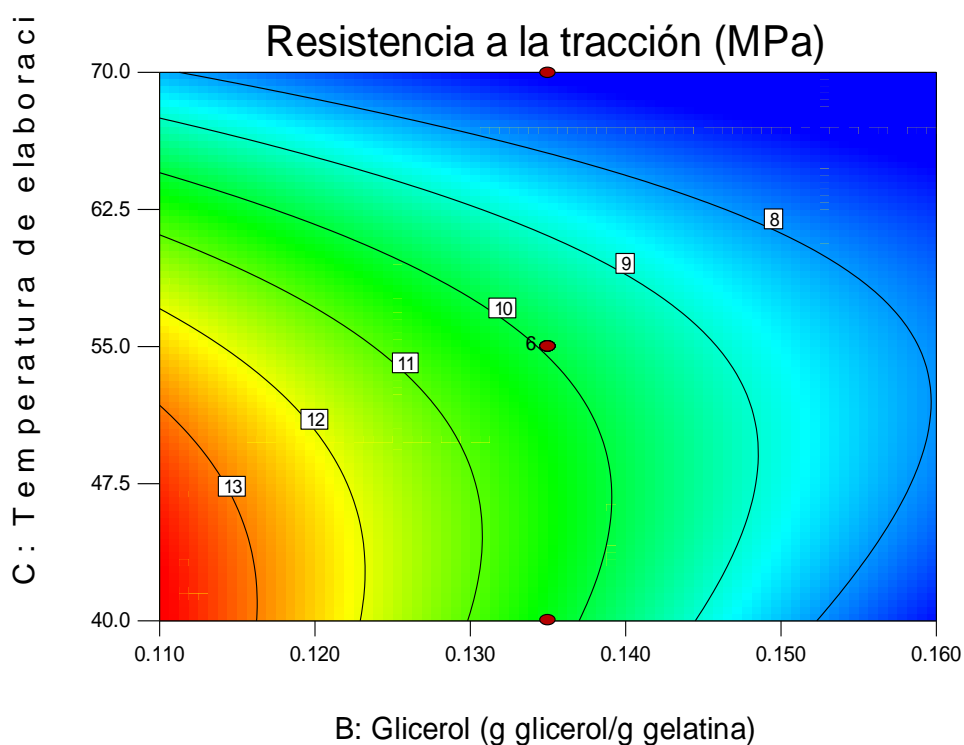


Figura 14: Contornos para la resistencia a la tracción, en función a las variables glicerol (X_2) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central

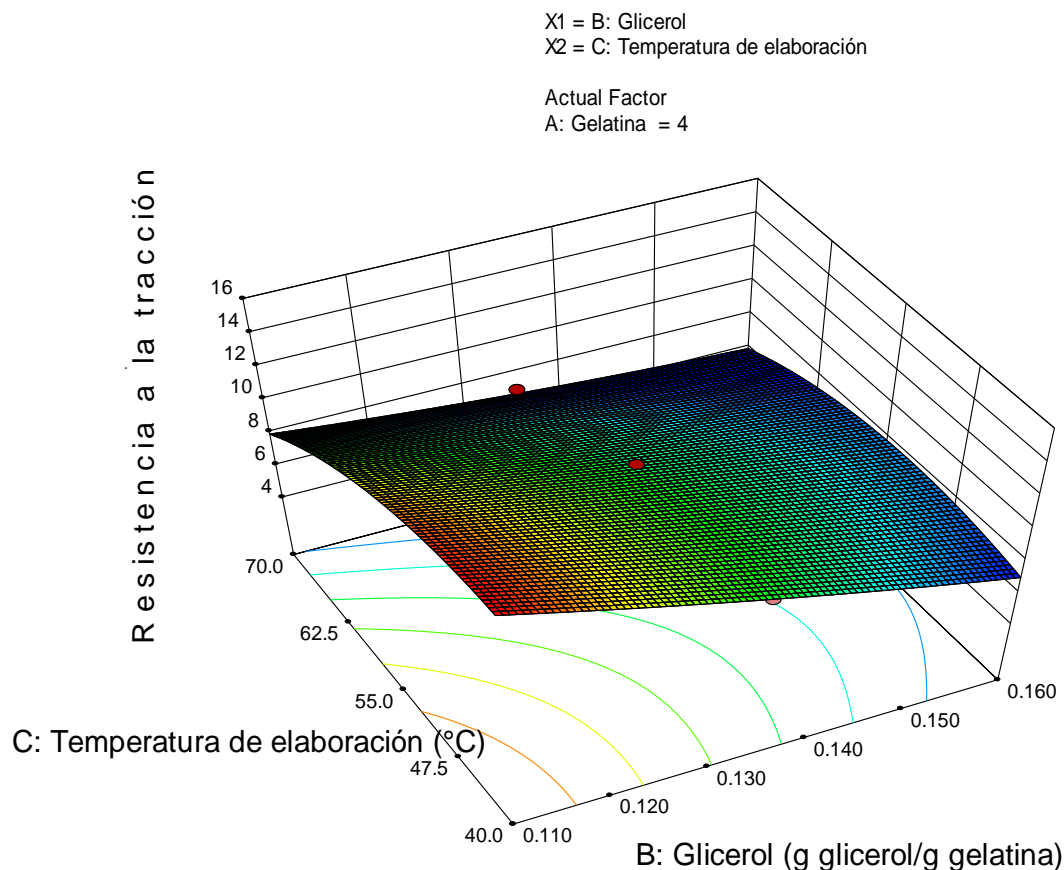


Figura 15: Superficie de respuesta para la resistencia a la tracción, en función a las variables glicerol (X_2) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central

Las Figuras 14 y 15 muestran la variación de la resistencia a la tracción, RT, en función a la variación del glicerol y la temperatura de elaboración (Te). Se observa que el incremento del glicerol y de la Te, causaron la disminución de la RT de las películas comestibles. El aumento de la Te debido al calentamiento de las soluciones formadoras de película, pudo haber causado la degradación o hidrólisis parcial de las moléculas de gelatina con la consecuente generación de subunidades de moléculas de gelatinas más cortas, péptidos y aminoácidos libres. Al respecto, Hoque *et al.* (2011^a) evaluaron la utilización de gelatina de calamar parcialmente hidrolizada con bajos grados de hidrólisis de 0,4; 0,8 y 1,2 % en la formación de películas comestibles, determinando que las películas de gelatina con grados de hidrólisis más altos exhibieron menores valores de RT.

Los autores mencionan que la hidrólisis parcial genera cadenas más cortas con interacciones cadena – cadena más débiles o menores zonas de unión (enlaces de hidrógeno), así como el incremento del número de extremos de cadena lo cual aumenta directamente la movilidad de las cadenas, teniendo como resultado una red de películas más débil o con menor RT.

Por otro lado, Peña *et al.* (2010) citados por Lin *et al.* (2017) sostienen que los grupos polares de los aminoácidos presentes en la estructura de la gelatina y las fuerzas extensivas intermoleculares como los enlaces de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, son los responsables de la fragilidad de los materiales y limitan su aplicación como materiales de empaque. Al respecto, Guilbert *et al.* (1996) citados por Han (2014), sostienen que estas fuerzas influyen sobre la fuerza mecánica de las películas, especialmente en estructuras de películas homogéneas continuas. Este aspecto puede ser mejorado mediante la adición de plastificantes en la formulación de la película para disminuir las fuerzas intermoleculares resultantes de la interacción cadena – cadena. Gontard *et al.* (1993) mencionan que las moléculas de glicerol podrían formar fácilmente enlaces de hidrógeno con la cadena proteica reduciendo así la interacción intermolecular. La reducción de estas fuerzas conlleva a un aumento de la movilidad de las cadenas de polímero (Sothornvit y Krochta, 2000).

Además, el glicerol, por ser un plastificante de naturaleza hidrofílica, liga moléculas de agua incrementando la flexibilidad de las películas. Esto fue reportado por Bergo *et al.* (2013), quienes determinaron que las películas elaboradas con glicerol absorbieron mayor cantidad de agua respecto a otros plastificantes, debido a su naturaleza hidrofílica.

Thomazine *et al.* (2005) reportaron resultados similares de la variación de RT respecto al incremento de glicerol en películas de gelatina de porcino.

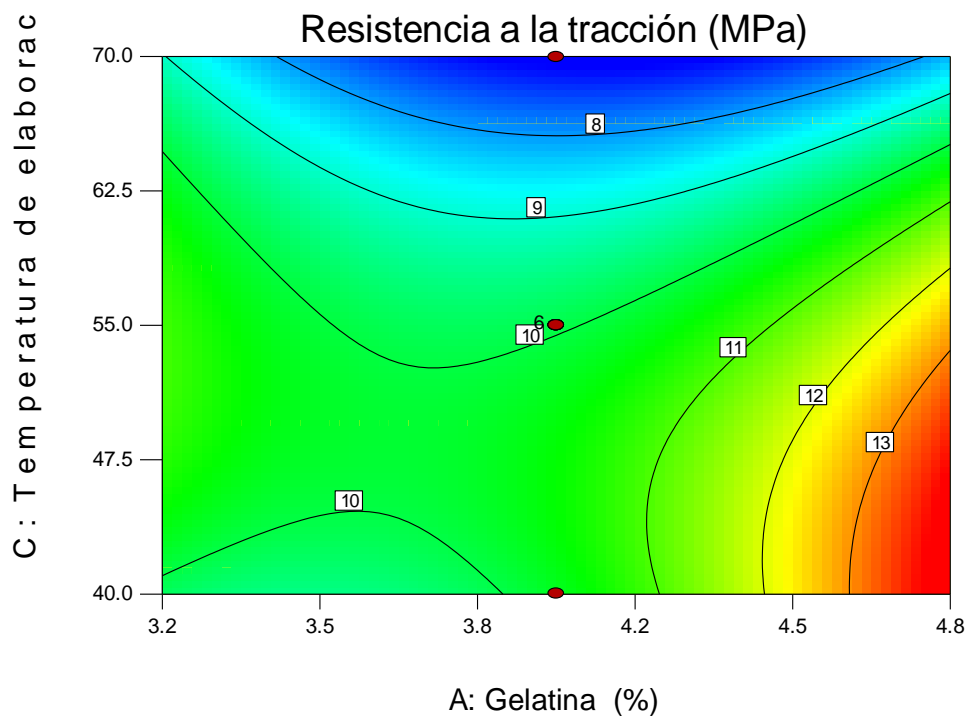


Figura 16: Contornos para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X_1) y temperatura de elaboración (X_3) en el diseño compuesto central

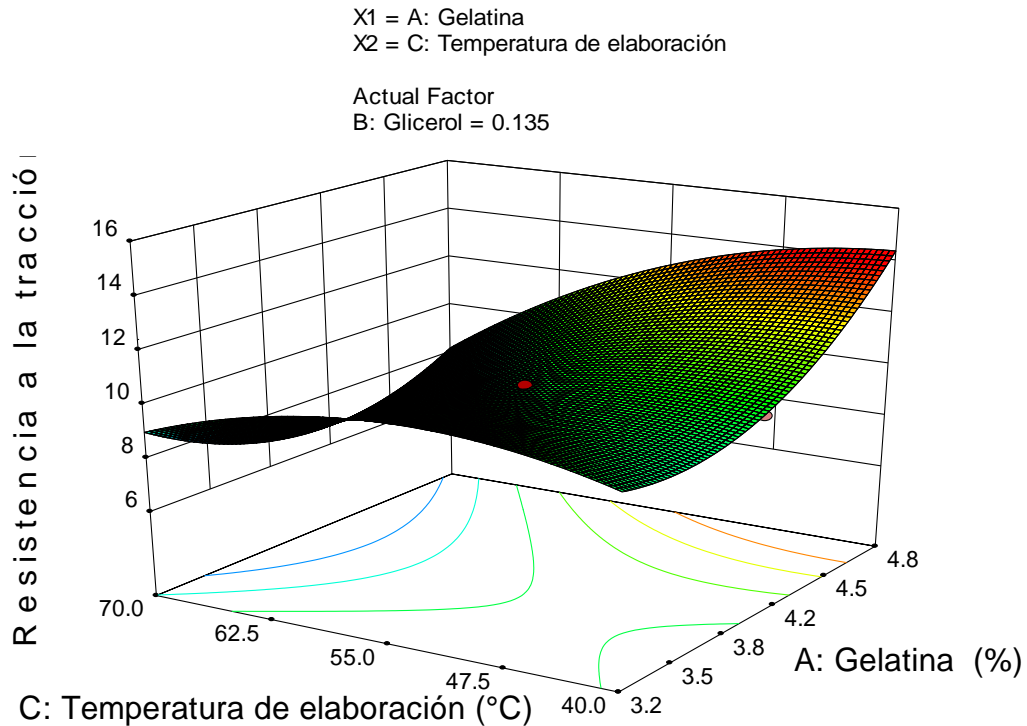


Figura 17: Superficie de respuesta para la resistencia a la tracción, en función a las variables gelatina (X₁) y temperatura de elaboración (X₃) en el diseño compuesto central

Las Figuras 16 y 17 muestran la variación de la resistencia a la tracción, RT, en función a la variación de la gelatina y temperatura de elaboración (Te). Se observa que el grafico es característico de un punto silla.

Se observa un valor de RT de 10 MPa en las películas elaboradas con bajas concentraciones de gelatina (3,2 – 3,8 %) empleando la Te más baja del diseño, 40 °C. El empleo de concentraciones de gelatina mayores a 4,2 %, causó el aumento de la RT de las películas. El mismo valor de RT de 10 MPa se observó en películas elaboradas a Te altas, alrededor de 65 °C, empleando un amplio rango de concentración de gelatina. A partir de este nivel, el incremento de la Te dio como resultado la disminución de la RT de las películas independientemente de la cantidad de gelatina empleada.

Hoque *et al.* (2010) evaluaron la influencia de Te de 40 – 90 °C sobre la variación de RT de películas de gelatina de piel de calamar (*Sephia pharaonis*) donde valores de Te de 40 – 60 °C causaron un aumento de la RT hasta un valor máximo de 9,66 MPa. El aumento hasta un valor de Te de 90 °C, causó una disminución de la RT hasta un valor mínimo de 4,99 MPa de manera similar a lo encontrado en el presente trabajo con la diferencia del empleo de rangos diferentes de temperatura.

Estas diferencias podrían deberse a la variación en la composición de aminoácidos y distribución de pesos moleculares entre la gelatina de calamar y de pescado, específicamente el perico, lo cual influye en sus propiedades mecánicas.

b. Elongación al corte

La Tabla 10 muestra los valores promedio experimentales de la elongación al corte de las películas comestibles para cada tratamiento analizado.

Tabla 10: Valores experimentales de elongación al corte en el DCC

Tratamiento	X ₁ : Gelatina (%)	X ₂ : Glicerol (g/g gelatina)	X ₃ : Temperatura de elaboración (°C)	Y ₂ : Elongación al corte (%) experimental
1	3,5	0,120	46,1	12
2	4,5	0,120	46,1	9
3	3,5	0,150	46,1	215
4	4,5	0,150	46,1	33
5	3,5	0,120	63,9	115
6	4,5	0,120	63,9	122
7	3,5	0,150	63,9	276
8	4,5	0,150	63,9	154
9	3,1591	0,135	55,0	129
10	4,8409	0,135	55,0	15
11	4,0	0,1098	55,0	25
12	4,0	0,1602	55,0	224
13	4,0	0,135	40,032	53
14	4,0	0,135	69,968	240
15	4,0	0,135	55,0	88
16	4,0	0,135	55,0	96
17	4,0	0,135	55,0	86
18	4,0	0,135	55,0	84
19	4,0	0,135	55,0	85
20	4,0	0,135	55,0	81

Según la tabla anterior, los valores de elongación al corte fluctuaron en un rango de 9 –276 %. El 55 % de los tratamientos presentó valores de elongación al corte entre 10 – 100 y el 40 %, valores mayores a 100. Al respecto, Han (2014) clasificó los materiales con estos valores de elongación al corte con características de bueno y superior, respectivamente.

Se realizó el análisis de varianza (ANVA) del modelo cuadrático el cual incluyó los efectos simples, efectos interacción y efectos cuadráticos (Anexo 4) con la finalidad de determinar la significancia de los efectos que contribuyeron a explicar el comportamiento de la elongación al corte.

Según el ANVA, para un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$ el modelo resultó ser significativo y los efectos que tuvieron un valor p ($\text{prob} > F$) menor a 0,05 fueron los efectos principales (x_1, x_2, x_3), los efectos interacción $x_1 x_2$ y $x_1 x_3$ y los efectos cuadráticos x_2^2 y x_3^2 . Tanto el efecto interacción $x_2 x_3$ como el efecto cuadrático x_1^2 resultaron no significativos.

La falta de ajuste resultó ser no significativa puesto que el valor p ($\text{prob} > F = 0,0570$) es superior a 0,05. Al respecto, Gutiérrez y Vara (2008) mencionan que una falta de ajuste no significativa indica que el modelo de segundo orden se ajusta de manera conveniente a los datos.

De acuerdo al ANVA, se concluye que el modelo de segundo orden propuesto es una aproximación adecuada de los datos para explicar la respuesta en la región experimental elegida. La ecuación polinomial de segundo grado que relaciona la variable respuesta con las variables de estudio viene a ser la siguiente:

$$\hat{y}_2 = 86,63 - 36,01x_1 + 55,26x_2 + 52,17x_3 - 38,50x_1x_2 + 8,75x_1x_3 + 13,58x_2^2 + 21,36x_3^2$$

En la ecuación resultante sólo se han considerado los términos significativos según el ANVA analizado.

Los contornos y superficies de respuesta presentados en las Figuras 18 a 23, muestran la influencia de dos variables de manera simultánea sobre la variable respuesta, elongación al corte, EAC.

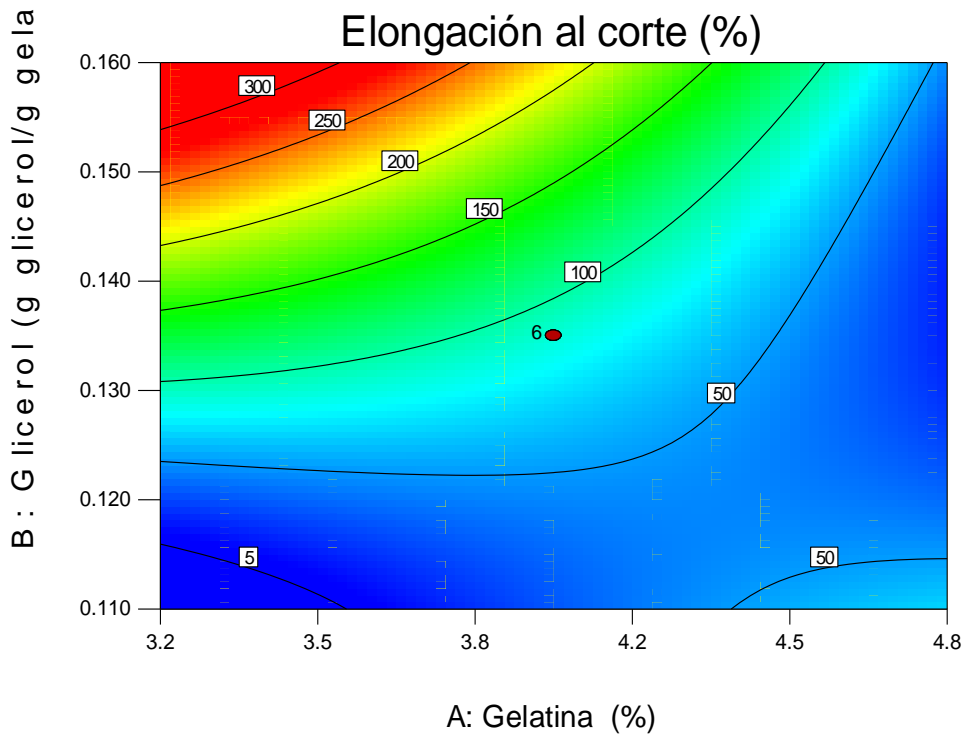


Figura 18: Contornos para la elongación al corte, en función a las variables gelatina (X₁) y glicerol (X₂) en el diseño compuesto central

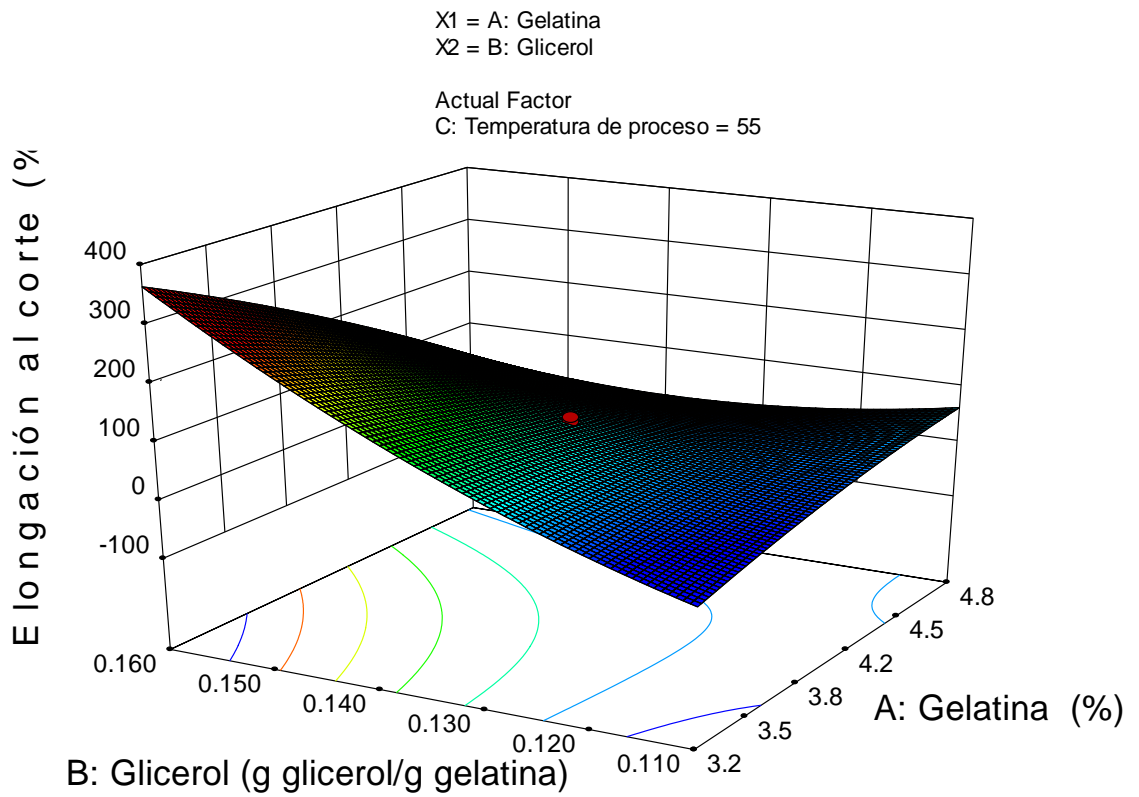


Figura 19: Superficie de respuesta para la elongación al corte, en función a las variables gelatina (X₁) y glicerol (X₂) en el diseño compuesto central

Las Figuras 18 y 19 muestran la variación de la elongación al corte, en función a la variación de gelatina y glicerol. Se observa que se trata de un gráfico tipo silla, pero se observa claramente que el aumento de glicerol causó un incremento de la EAC de las películas.

La relación directa entre la adición de glicerol en la formulación y la EAC de las películas se explica por la naturaleza del plastificante. El glicerol, al ser una molécula de bajo peso molecular, se sitúa entre las cadenas proteicas disminuyendo las interacciones proteína – proteína y establece a su vez interacciones, enlaces de hidrógeno, con los grupos amino de los residuos de aminoácidos de la cadena de gelatina a través de su grupo hidroxil, lo cual resulta en una disminución de la interacción intermolecular (Gontard *et al.*, 1993; citados por Limpisophon *et al.*, 2009). De esta forma, se incrementa el volumen libre del sistema y la movilidad molecular del polímero, tal como se detalló anteriormente. Esto resulta en un incremento de la flexibilidad de la película lo cual se observa cuando el material se elonga más ante la aplicación de una misma fuerza de tracción. Otros autores han reportado resultados similares del efecto del incremento del glicerol sobre el aumento de la EAC de las películas (Bergo *et al.*, 2013, Carvalho *et al.*, 2008, Thomazine *et al.*, 2005).

El efecto de la gelatina no se distingue claramente debido al tipo de gráfico obtenido, sin embargo, se puede notar que para una mínima concentración de glicerol y a concentraciones bajas de gelatina se tiene un valor bajo de EAC, y cuando la concentración de gelatina se incrementa junto con el glicerol, la EAC aumenta. Con el incremento del glicerol y, a medida que la concentración de gelatina disminuye, la EAC de las películas se incrementa. Al disminuir la concentración de gelatina, se reducen las cadenas proteicas por unidad de superficie, reduciéndose el número de interacciones intermoleculares (Cuq, Gontard, Cuq y Gilbert, 1996) lo cual conlleva a una mayor flexibilidad de la película o aumento de la EAC.

Por el contrario, Limpisophon *et al.* (2009) y Nur-Hanani *et al.* (2012) determinaron que manteniendo niveles constantes de glicerol, el incremento de la gelatina causó un aumento de la EAC de las películas obtenidas. Esto, según Jongjareonrak *et al.* (2006) podría deberse a una mayor agregación de proteínas para formar la película, lo que resulta en una flexibilidad mejorada.

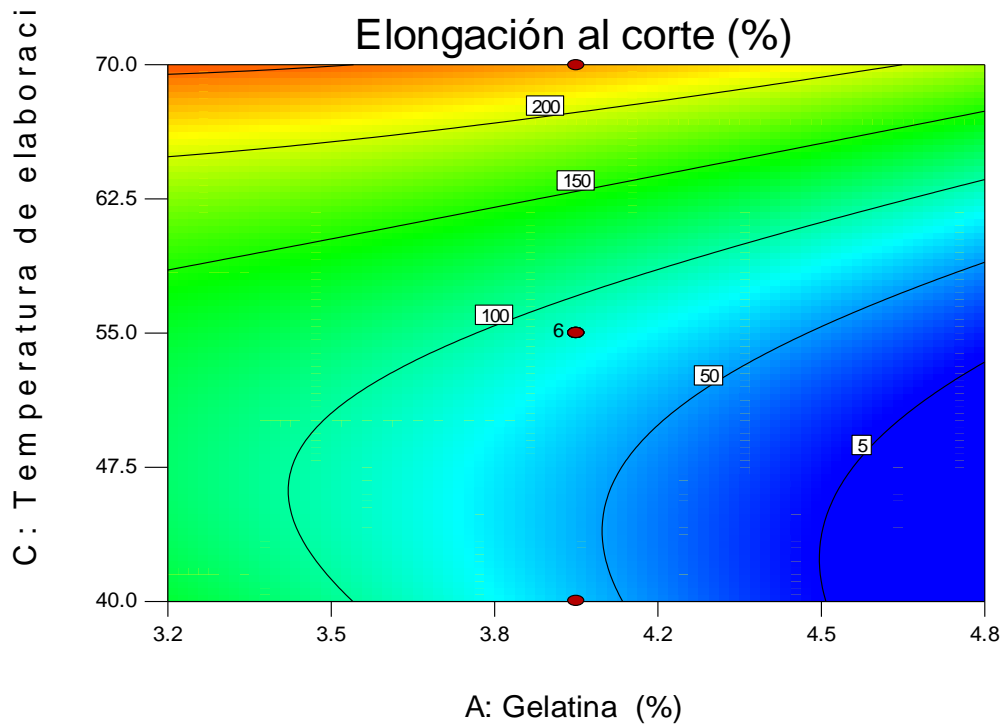


Figura 20: Contornos para la elongación al corte, en función a las variables gelatina (X₁) y temperatura de elaboración (X₃) en el diseño compuesto central

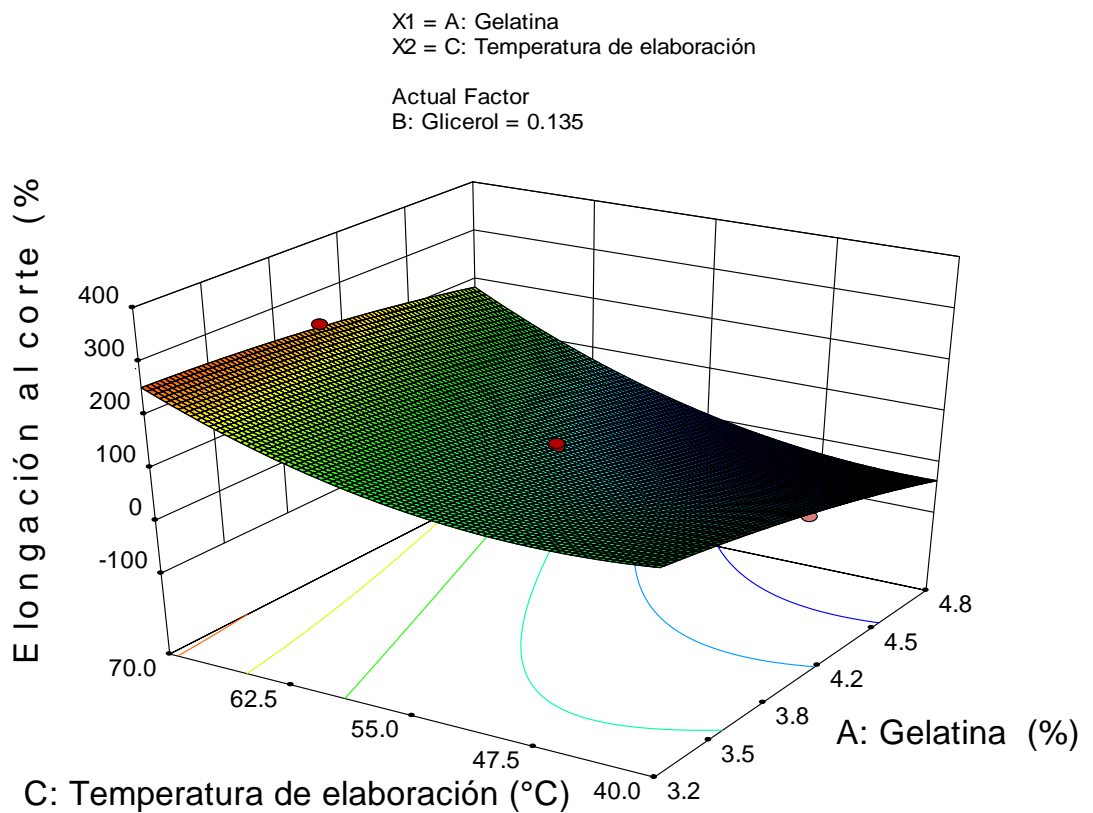


Figura 21: Superficie de respuesta para la elongación al corte, en función a las variables gelatina (X₁) y temperatura de elaboración (X₃) en el diseño compuesto central

Las Figuras 20 y 21 muestran la variación de la elongación al corte de las películas, en función a la variación de gelatina y temperatura de elaboración (Te). En las figuras se observa que el aumento de gelatina dio lugar a una disminución de la EAC, mientras que el aumento de la Te causó el incremento de la EAC. La relación entre la gelatina y la EAC ya fue discutido en las Figuras 18 y 19 mientras que la relación entre la Te y la EAC puede ser explicada por la formación de cadenas más cortas con interacciones cadena – cadena más débiles y al incremento de la movilidad de las cadenas, resultando en películas más frágiles.

Cuando la estructura de la proteína cambia haciéndose menos compacta a causa de factores como la hidrólisis, adición de plastificantes, disminución de la concentración de gelatina, etc. ocurre una disminución de la resistencia del material a la deformación, lo cual resulta en un incremento de la EAC. Las gráficas de EAC y de RT muestran que ambas propiedades se relacionan inversamente.

Al respecto, Hoque *et al.* (2011^a) reportaron que la hidrólisis de gelatina de piel de calamar (0,4 – 1,2 % de grado de hidrólisis) causó la disminución de la EAC de las películas resultantes; mientras que Hoque *et al.* (2010) reportaron una relación directa entre la Te de 40 – 60 °C empleada y la EAC de películas de gelatina de calamar y una relación inversa entre la Tp de 70 – 90 °C y la EAC de las películas. A diferencia de lo reportado por Hoque *et al.* (2011^a) la hidrólisis de la solución de gelatina pudo ser causada por el calentamiento de la misma.

Las películas de gelatina están estabilizadas principalmente por enlaces débiles como los enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (Hoque *et al.*, 2010). Estos enlaces dependen de la distribución de pesos moleculares y de la composición de aminoácidos de la gelatina lo cual depende del tipo de materia prima y de las condiciones de extracción. Carvalho *et al.* (2008) y Gómez-Guillén *et al.* (2009) demostraron que la RT y EAC, dependen de la distribución de pesos moleculares de la gelatina.

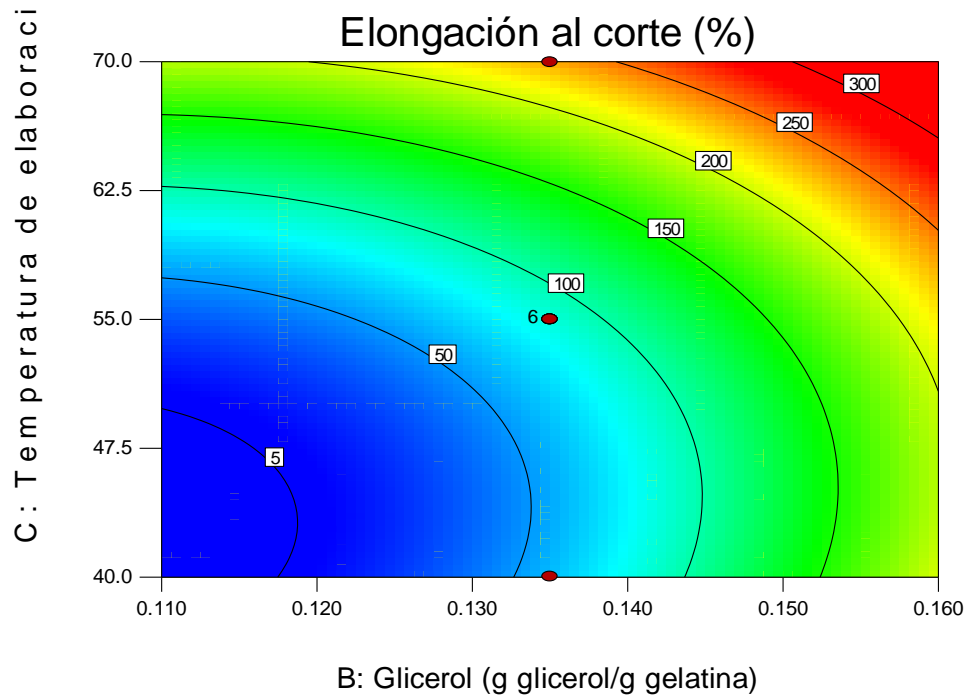


Figura 22: Contornos para la elongación al corte, en función a las variables glicerol (X₂) y temperatura de elaboración (X₃) en el diseño compuesto central

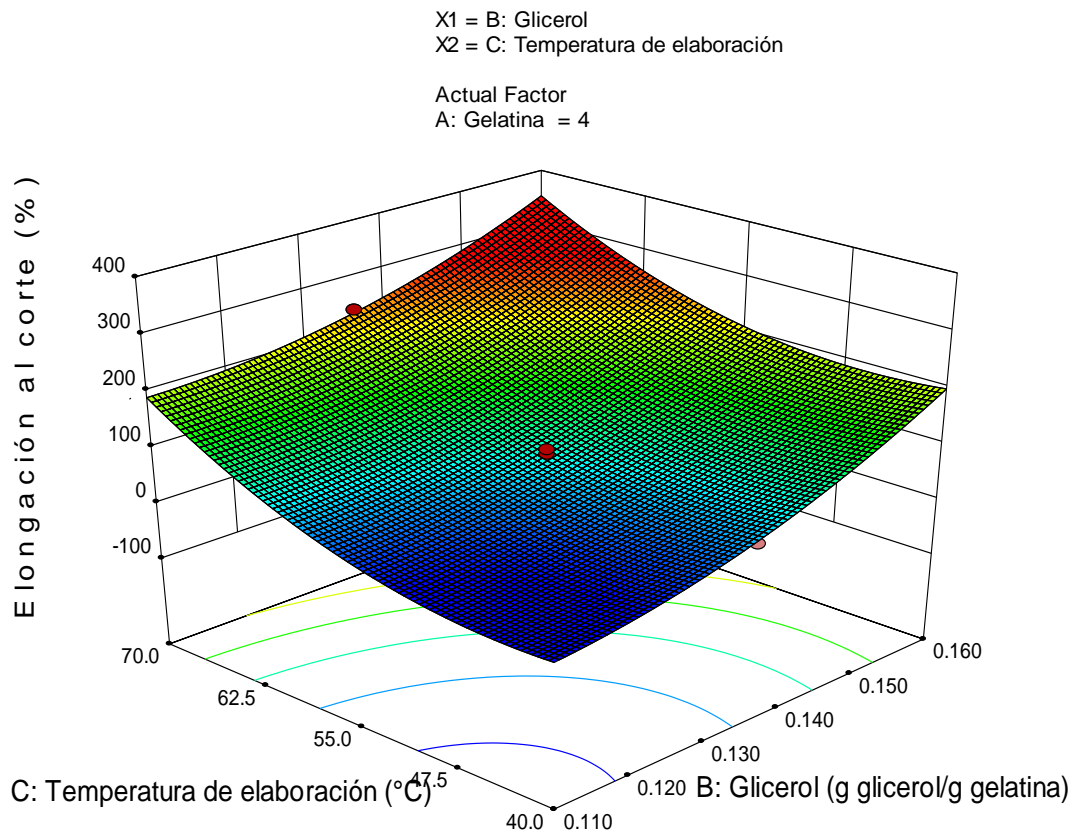


Figura 23: Superficie de respuesta para la elongación al corte, en función a las variables glicerol (X₂) y temperatura de elaboración (X₃) en el diseño compuesto central

Las Figuras 22 y 23 muestran la variación de la elongación al corte, en función a la variación del glicerol y la temperatura de elaboración, T_e . Se observa que el incremento tanto del glicerol como de la T_e causaron un aumento de la EAC de las películas. Además, se observa que el incremento de glicerol en pequeñas concentraciones dio como resultado aumentos significativos de la EAC.

Como ya se detalló anteriormente, el incremento de la T_e posiblemente dio lugar a la formación de cadenas más cortas con mayor movilidad y con enlaces más débiles, dando lugar a un incremento de la flexibilidad de la película incrementando su EAC.

La molécula de glicerol interfirió en las interacciones proteicas e incrementó el volumen libre de las estructuras poliméricas incrementando la movilidad molecular del polímero. Además, este tipo de plastificante de naturaleza hidrofílica e higroscópica tiene la capacidad de atraer moléculas de agua y formar un gran complejo agua – plastificante, incrementando de esta forma la EAC de la película. Limpisophon *et al.* (2009) reportaron un efecto similar del glicerol sobre la EAC de las películas.

4.2.2. Optimización simultánea de las respuestas

La optimización simultánea de las respuestas se llevó a cabo luego de haber obtenido los modelos matemáticos de segundo orden, correspondientes a cada respuesta evaluada teniendo en cuenta el método de la función de deseabilidad, descrita por Montgomery (2011) y Gutiérrez y Vara (2008). De acuerdo a esta teoría, se obtuvo una función de deseabilidad para cada respuesta implicada y, posteriormente, un valor de deseabilidad global.

Las restricciones para ambas respuestas se establecieron a partir de los resultados obtenidos en el diseño experimental y en base a criterio propio, donde según la evaluación individual, las películas con mejores características de resistencia y flexibilidad fueron las que tuvieron valores de RT alrededor de 9,5 MPa y elongación al corte de 150 %. Por ello se utilizó la función *target* u objetivo como parámetro de optimización:

- Resistencia a la tracción (\hat{y}_1): 9,5 MPa
- Elongación al corte (\hat{y}_2): 150 %

Reemplazando los valores *target* en las funciones de deseabilidad definidas cuando el objetivo es obtener una respuesta a un nivel específico, se tiene lo siguiente:

$$d_1 = \begin{cases} 0 & \hat{y}_1 < 7,0 \\ \left(\frac{\hat{y}_1 - 7,0}{9,5 - 7,0}\right)^1 & 7,0 \leq \hat{y}_1 \leq 9,5 \\ \left(\frac{13,9 - \hat{y}_1}{13,9 - 9,5}\right)^1 & 9,5 \leq \hat{y}_1 \leq 13,9 \\ 0 & \hat{y}_1 > 13,9 \end{cases}$$

$$d_2 = \begin{cases} 0 & \hat{y}_2 < 96 \\ \left(\frac{\hat{y}_2 - 96}{150 - 96}\right)^1 & 96 \leq \hat{y}_2 \leq 150 \\ \left(\frac{154 - \hat{y}_2}{154 - 150}\right)^1 & 150 \leq \hat{y}_2 \leq 154 \\ 0 & \hat{y}_2 > 154 \end{cases}$$

Donde:

d_1 : función de deseabilidad para la resistencia a la tracción

d_2 : función de deseabilidad para la elongación al corte

\hat{y}_1 : resistencia a la tracción (MPa)

\hat{y}_2 : elongación al corte (%)

Los valores de resistencia a la tracción de 7,0 MPa y 13,9 MPa corresponden a los valores mínimo y máximo de la resistencia a la tracción obtenidos en el DCC (Tabla 9), mientras que 96 y 154 % corresponden a los valores de elongación al corte en el DCC (Tabla 10), los cuales fueron escogidos como los valores límites mínimo y máximo por sus características intrínsecas según criterio propio. En la Tabla 11 se observa el criterio seguido para cada respuesta evaluada en la etapa de optimización simultánea de las respuestas.

Tabla 11: Criterios de optimización

Nombre	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Importancia
Gelatina (%)	En rango	3,5	4,5	3
Glicerol (g glicerol/g gelatina)	En rango	0,12	0,15	3
Temperatura de elaboración (°C)	En rango	46,1	63,9	3
Resistencia a la tracción (MPa)	Objetivo = 9,5	7	13,9	3
Elongación al corte (%)	Objetivo= 150	96	154	3

La Tabla 12 muestra la solución de optimización elegida, las respuestas estimadas y el valor de deseabilidad global obtenido.

Tabla 12: Variables y respuestas estimadas en condiciones de optimización

Valores de optimización			Respuestas estimadas		Deseabilidad
Gelatina (X_1)	Glicerol (X_2)	Temperatura de elaboración (X_3)	Resistencia a la tracción (\hat{y}_1)	Elongación al corte (\hat{y}_2)	D = 1,00
3,5 %	0,138 g glicerol/g gelatina	58 °C	9,5 MPa	150 %	

La deseabilidad individual obtenida del programa *Design Expert* en base a los criterios de optimización escogidos para cada respuesta fue 1 y, por lo tanto, el valor de la deseabilidad global también fue 1. Esta respuesta teórica se corrobora de forma gráfica (figura 8) y matemática, ya que cuando el valor de cada respuesta \hat{y} se reemplaza en la función de deseabilidad respectiva (d_1 y d_2), desde su valor mínimo, el cual se va incrementando hasta el valor *target* u objetivo, la deseabilidad también se incrementa de 0 a 1 siendo exactamente 1 cuando el valor de la respuesta llega a ser igual que el valor *target*; a partir de este punto, cuando los valores de la respuesta se van alejando del valor *target*, es decir, se van incrementando hacia el valor máximo, la deseabilidad empieza a disminuir desde 1 hasta 0.

4.2.3. Verificación de los niveles óptimos de las variables

En la Tabla 13 se muestra la comparación de las respuestas observadas (resistencia a la tracción y elongación al corte) durante la obtención de películas comestibles bajo condiciones de optimización, con sus respectivos valores estimados obtenidos de los modelos.

Tabla 13: Valores estimados y observados para las respuestas en la optimización

Respuestas	Valores	
	Estimados	Observados
Y ₁ : Resistencia a la tracción (MPa)	9,5	9,38 ± 0,50
Y ₂ : Elongación al corte (%)	150	160 ± 5,80

En la Tabla 13 se observan los resultados teóricos y experimentales (promedio de 3 repeticiones) de la resistencia a la tracción y la elongación al corte de las películas obtenidas empleando las variables de proceso obtenidas por optimización.

Los resultados indican que los valores observados y estimados en el punto óptimo fueron cercanos entre sí. A partir de esta información, se puede afirmar que los modelos empíricos obtenidos por la metodología de superficie de respuesta, pueden ser utilizados para describir de forma adecuada la relación entre las variables y respuestas dentro de la zona experimental evaluada.

4.2.3.1. Resistencia a la tracción

Según los resultados de resistencia a la tracción mostrados en la Tabla 13, la película comestible de gelatina de piel de perico bajo condiciones óptimas presentó un valor de RT de 9,38 MPa. Este valor, según Han (2014), se clasifica como marginal (RT: 1 – 10) pero es cercano a bueno (RT: 10 – 100).

Diversos autores han reportado resultados menores y mayores de RT, que lo encontrado en el presente trabajo, en películas comestibles elaboradas con gelatinas de origen marino, bovino y porcino. Por ejemplo, Teixeira *et al.* (2014) reportaron un valor de RT de 6,1 MPa en películas de proteína de *Merluccius capensis* mientras que Nur-Hanani *et al.* (2012) reportaron valores comprendidos entre 3,42 – 4,46 MPa en películas elaboradas con 4 % de gelatina de piel de pescado, bovino y porcino.

Hoque *et al.* (2010) reportaron valores de RT de 9,66 MPa en películas de gelatina de piel de calamar mientras que Jongjareonrak *et al.* (2008) reportaron valores de RT de 42,63 y 56,20 MPa en películas de gelatina de pargo ojo grande y pargo rojo raya marrón, respectivamente.

4.2.3.2. Elongación al corte

Según los resultados de elongación al corte mostrados en la Tabla 13, la película comestible de gelatina de piel de perico obtenida bajo condiciones óptimas presentó un valor de EAC experimental de 160 %. Este valor fue similar a lo encontrado por Teixeira *et al.* (2014) quienes reportaron 147,9 % de elongación al corte en películas de proteína.

Otros autores reportaron valores más bajos de EAC, por ejemplo, Nur-Hanani *et al.* (2012) reportaron 53,05 % en películas de pescado mientras que Hoque *et al.* (2010) reportaron

15,56 % en películas de gelatina de piel de calamar. Jongjareonrak *et al.* (2008) reportaron valores de EAC comprendidos entre 7,95 y 30,90 % en películas de pargo ojo grande y pargo rojo raya marrón, respectivamente.

Las diferencias en los valores de RT y EAC del presente trabajo con lo reportado por otros autores podrían deberse al tipo de gelatina utilizada, a la composición de la película, a las condiciones de obtención de la película, etc.

4.3. CARACTERÍSTICAS FENÓLICAS DEL EXTRACTO DE ORÉGANO

4.3.1. Composición de compuestos fenólicos del extracto de orégano

La composición de compuestos fenólicos totales presentes en el extracto de orégano, EO, se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14: Compuestos fenólicos presentes en el extracto de orégano

Compuesto fenólico	Contenido (mg/g)
Derivado de ácido protocatéquico	4,68
Ácido rosmarínico	16,03
Derivado de ácido cafeico	0,50
Derivado de ácido cafeico	0,06
Total	21,27

El extracto de orégano fue de color verde oscuro y de aroma característico acentuado. Como se observa en la Tabla 14, el porcentaje total de ácidos fenólicos y de sus derivados presentes fue de 21,27 %, siendo el ácido rosmarínico el compuesto fenólico mayoritario. El ácido rosmarínico es un compuesto fenólico conocido por sus múltiples propiedades biológicas, tales como antioxidante, antiinflamatoria, antibacteriana y anticancerígena. Este resultado es similar a lo reportado por Hernández *et al.* (2009), quienes determinaron que el ácido rosmarínico es el principal componente fenólico del extracto etanólico de orégano, el cual puede prevenir el deterioro del color. Por otro lado, Martins *et al.* (2014) analizaron un extracto hidroalcohólico de orégano, en el que reportaron la identificación de 22 compuestos,

6 de ellos ácidos fenólicos derivados, siendo el ácido rosmarínico el más abundante (14,62 mg/g), un valor muy cercano a lo alcanzado en el presente trabajo (16,03 mg/g).

Así mismo, Gómez-Estaca *et al.* (2009^b) encontraron que el polifenol más abundante en el extracto acuoso de orégano fue el ácido rosmarínico con una concentración de 177 µg/ml y, en menor cantidad ácido protocatéquico con una concentración de 75 µg/ml. Por otro lado, Fujie *et al.* (2003) reportaron la presencia de ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido protocatéquico y ácido láctico en un extracto etanólico de orégano antes y después de su ebullición siendo el ácido rosmarínico, el ácido cafeico encontrado en mayor cantidad en ambos procedimientos (6,41 y 6,75 mg/g), respectivamente.

Por otro lado, Kozłowska *et al.* (2015) determinaron que el extracto etanólico de orégano mostró un contenido de ácido rosmarínico de 25,02 mg/g, un valor superior al encontrado en el presente trabajo, y un contenido de ácido cafeico de 1,43 mg/g.

La diferencias encontradas en el contenido de ácido rosmarínico por los diversos autores podría deberse a la variedad de orégano, región de cosecha, procedimiento de extracción, etc.

4.3.2. Cuantificación de polifenoles extraíbles y capacidad antioxidante del extracto de orégano

La cantidad de polifenoles extraíbles y la capacidad antioxidante determinados en el extracto de orégano se muestran en la Tabla 15:

Tabla 15: Polifenoles extraíbles y capacidad antioxidante del extracto de orégano

Análisis	Valor
Compuestos fenólicos extraíbles (mg equivalentes ácido gálico/ ml extracto)	86,613 ± 3,261
Capacidad antioxidante - FRAP 30 min (mM equivalentes FeSO ₄ .7H ₂ O/ml extracto)	1251,814 ± 8,925

Los valores que se muestran en la Tabla 15 corresponderían a la variedad híbrida denominada *Origanum x aplii* (Domin) Boros conocida comúnmente como “zambito”, producto del cruzamiento de *Origanum majorana* con *Origanum vulgare ssp vulgare*, de acuerdo a lo mencionado por Di Fabio (2000); citado por Tellez (2017). El contenido de

compuestos fenólicos extraíbles fue alto comparado con otros extractos de orégano obtenidos bajo diferentes métodos de extracción. Gómez-Estaca *et al.* (2009^a) obtuvieron extractos de hojas de orégano empleando agua como solvente a 45 °C durante 10 minutos reportando un contenido de polifenoles de 2080 µg de eq. ácido cafeico/ml extracto mientras que Karimi *et al.* (2015) determinaron que los compuestos fenólicos extraíbles presentes en los extractos etanólicos de orégano mediterráneo y mexicano fueron de 33,2 y 102,6 mg eq. ácido gálico/g m.s, respectivamente.

La capacidad antioxidante medida por el método FRAP de esta variedad de orégano también fue significativamente mayor, respecto a lo reportado por otros autores. Así mismo, la relación entre los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante en diversas especies ha sido estudiada por diversos autores y se ha demostrado que hay una correlación positiva entre ambos análisis. La actividad antioxidante de las plantas se debe principalmente a la presencia de compuestos fenólicos, los cuales son potentes secuestradores de especies reactivas de oxígeno y además son capaces de inhibir a enzimas productoras de radicales libres.

Shan *et al.* (2005) demostraron que hay una alta correlación lineal positiva entre la actividad antioxidante y el contenido de fenoles totales en 26 especies y hierbas incluido el orégano de la especie *Origanum vulgare* L, siendo el componente mayoritario el ácido rosmarínico, compuesto fenólico al que se le atribuye la capacidad secuestradora de radicales libres más alta. Así mismo, mencionan que el contenido fenólico de extractos de plantas debería usarse como un índice indirecto adecuado para estimar la capacidad antioxidante.

Por otro lado, Karimi *et al.* (2014) determinaron que la capacidad antioxidante tuvo una fuerte correlación con el contenido de fenoles totales en 2 especies diferentes de orégano seco. Además, indicaron que las especies, técnicas de extracción, tipo de solvente y la proporción de disolvente: agua tuvo una influencia significativa en la variación del contenido de polifenoles totales.

Así mismo, se han realizado diversos estudios acerca del efecto del método de extracción sobre el contenido de polifenoles y la capacidad antioxidante. Teixeira *et al.* (2013) reportaron que el EO obtenido utilizando agua en ebullición mostró el mayor contenido de polifenoles (17,8 mg eq. ácido gálico/ g m.s), seguido de la extracción con etanol (13,5 mg eq. ácido gálico/ g m.s) y agua fría (6,4 mg eq. ácido gálico/ g m.s) mientras que la capacidad antioxidante medida por el método FRAP fue mayor en el EO obtenido con agua fría,

seguido de la extracción con agua caliente, siendo el extracto etanólico, la muestra con el contenido más bajo de capacidad antioxidante.

Debido a que los resultados son tan diversos, estas diferencias podrían deberse a los parámetros de extracción, empleo de solventes, variedad de materia prima, etc; aunque las diferencias entre los métodos y condiciones de extracción así como el tipo de materia prima impiden hacer una comparación objetiva.

4.4. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE ORÉGANO

En la Tabla 16 se muestran los resultados de la medición de la actividad antimicrobiana del extracto de orégano frente a las bacterias testeadas.

Tabla 16: Medida de halos de inhibición del extracto de orégano

CEPAS MICROBIOLÓGICAS	HALOS DE INHIBICIÓN (mm)	
<i>Escherichia coli</i> (gram -)	2,22 ± 0,01	±
<i>Staphylococcus aureus</i> (gram +)	14,67 ± 0,40	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> (gram +)	7,78 ± 0,25	++
<i>Vibrio cholerae</i> (gram -)	10,16 ± 0,92	+++
<i>Salmonella entérica</i> (gram -)	5,21 ± 0,04	++
<i>Salmonella typhi</i> (gram -)	5,18 ± 0,06	++
<i>Shigella spp.</i> (gram -)	10,27 ± 0,36	+++
<i>Proteus vulgaris</i> (gram -)	11,95 ± 0,06	+++
<i>Pseudomona aeruginosa</i> (gram -)	5,15 ± 0,38	++
<i>Bacillus cereus</i> (gram +)	3,49 ± 0,55	+

Zona de inhibición: +++: >10 mm, ++: ≥ 5 mm, + : 2.5-5 mm, ± : < 2.5 mm, - :1mm

Los resultados de la Tabla 16 muestran que el extracto de orégano posee efecto antimicrobiano tanto frente a bacterias gram (+) como gram (-) siendo el efecto mayor sobre la bacteria gram (+) *Staphylococcus aureus* y seguido de la bacteria gram (-) *Proteus vulgaris*. El EO empleado tiene como componente mayoritario al ácido rosmarínico, un compuesto en cuya estructura tiene 2 grupos *orto* dihidroxi. Al respecto, Fung *et al.* (1997) citados por Nieto *et al.* (2018) mencionan que los compuestos fenólicos, interactúan con la membrana celular, causando cambios en el material genético y nutrientes, alterando el transporte de electrones, la fuga de componentes celulares y cambios en la producción de ácidos grasos. Además, también producen la interacción con la membrana proteica que produce la pérdida de funcionalidad de la membrana y su estructura. Las bacterias gram (-) como *Shigella spp* y *Vibrio cholerae* fueron inhibidas en mayor medida por el EO, mientras que la bacteria gram (+) *Enterococcus faecalis* mostró moderada inhibición frente a la acción del EO.

De manera similar, Kozłowska *et al.* (2015) determinaron que el extracto etanólico acuoso de orégano ejerció actividad antimicrobiana frente a las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Proteus vulgaris*.

Las bacterias que ofrecieron mayor resistencia frente al EO fueron las gram (-): *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Pseudomona aeruginosa* y la bacteria gram (-) *Bacillus cereus*. Al respecto, Shan *et al.* (2007) mencionan que las bacterias gram (+) son generalmente más sensibles a los extractos de hierbas y especias que las bacterias gram (-) lo cual podría deberse a las diferencias significativas entre las capas externas de ambos tipos de bacterias.

Martins *et al.* (2014) reportaron que el extracto hidroalcohólico de hojas de orégano no mostró efecto alguno sobre el crecimiento de la bacteria gram (+) *Staphylococcus aureus* pero sí inhibió el crecimiento de algunas especies gram (-) como *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* y *Pseudomona aeruginosa* a diferencia de lo encontrado en el presente trabajo. Esta variación podría deberse a los tipos de cepas bacterianas evaluadas, la concentración del extracto empleado, etc. Por otro lado, Saeed y Tariq (2009), evaluaron el aceite esencial y una infusión de orégano, reportando que ambas muestras exhibieron actividad antimicrobiana frente a bacterias gram (+) pertenecientes a 23 especies diferentes incluyendo *Staphylococcus aureus*.

4.5. CARACTERIZACIÓN DE LAS PELÍCULAS COMESTIBLES CON EXTRACTO DE ORÉGANO

Las películas comestibles con las diferentes concentraciones de extracto de orégano fueron caracterizadas según las siguientes propiedades:

4.5.1. PROPIEDADES MECÁNICAS

4.5.1.1. Resistencia a la tracción y elongación al corte

Los resultados de las propiedades mecánicas de las películas comestibles con EO se muestran en la Tabla 17:

Tabla 17: Valores de resistencia a la tracción y elongación al corte de las películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	RESISTENCIA A LA TRACCIÓN (MPa)	ELONGACIÓN AL CORTE (%)
EO 0 %	9,33 ± 0,659 ^a	154 ± 5,20 ^a
EO 2 %	8,95 ± 0,375 ^a	204 ± 3,20 ^b
EO 4 %	6,24 ± 0,334 ^b	315 ± 3,52 ^c
EO 6 %	5,64 ± 0,272 ^b	370 ± 2,16 ^d
EO 8 %	0,91 ± 0,041 ^c	104 ± 3,67 ^e

a, b, c,d,e Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

En la Tabla 17 se observa que los valores de resistencia a la tracción, RT, disminuyeron con el incremento del EO y no se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) tanto entre las películas con 0 y 2 % de EO como en las películas con 4 y 6 % de EO. La RT más baja correspondió a la película con 8 % de EO, debido a que el material ofreció una muy baja resistencia a la tracción lo cual esta relacionado a su composición.

La disminución de la RT asociada al incremento del EO podría estar relacionada a un cambio conformacional de la red de película compacta conformada principalmente por la gelatina, lo cual es causado por la adición del EO, de naturaleza parcialmente oleosa, a la solución formadora de película. Al respecto, Wang *et al.* (2011) sostienen que la incorporación de aceites causa la pérdida de la resistencia mecánica de las películas debido a la ruptura de la microestructura de la red de película. Termonia (1990), citada por Wang *et al.* (2011)

sostiene que cuando la microestructura de la película se vuelve discontinua debido a la presencia de sustancias incompatibles, la distribución de las fuerzas externas en cada enlace de la matriz se vuelve desigual, lo que conduce a una disminución de la fuerza mecánica del sistema. Por otro lado, la disminución de la concentración de gelatina en las formulaciones, también pudo haber influido en la disminución de la RT de las películas.

Así mismo, se observó un comportamiento inverso entre la RT y la EAC de las películas, donde la adición hasta 6 % de EO causó el aumento de la EAC de las películas y un sucesivo incremento resultó en la disminución de la EAC observándose diferencia significativa ($P < 0,05$) entre todos los valores de EAC de las películas, siendo la película con 6 % de EO la que presentó el mayor valor de EAC y la película con 8 % de EO el valor más bajo. Esto se debió a que con 8 % de EO el material estiró pero se rompió rápidamente ya que presentó menos resistencia a la fuerza aplicada debido a la mayor concentración del EO respecto a los demás componentes en la formulación.

A diferencia de la relación entre la RT y la EAC encontrada en el presente trabajo, Gómez-Estaca *et al.* (2009^c) reportaron que la incorporación de un extracto acuoso de orégano a la formulación de películas comestibles de gelatina de pescado y bovino causó la disminución tanto en los valores de RT como de EAC de las películas obtenidas. Esta diferencia podría deberse a la naturaleza de cada extracto debida principalmente al tipo de diluyente empleado.

La combinación entre el polifenol y la proteína es función de las interacciones hidrofóbicas y los enlaces de hidrógeno. El polifenol contiene grupos hidrofóbicos que entran a la región hidrofóbica de la proteína mediante interacción hidrofóbica (Shi & Di, 2000, citados por Rattaya *et al.*, 2009). Además, los grupos hidroxilo de los polifenoles son capaces de combinarse con los aceptores de hidrógeno en las moléculas de gelatina mediante enlaces de hidrógeno. Rattaya *et al.* (2009) determinaron que la incorporación de 6 % de extracto metanólico de algas a 2 niveles de pH (9 y 10) a la formulación de películas de gelatina de pescado, no varió los valores de RT pero sí incrementó los valores de EAC.

Hoque *et al.* (2011^b) reportaron que la incorporación de 1 % de extractos etanólicos de canela, clavo de olor y anís en películas de gelatina sin hidrolizar de piel de calamar causó el aumento de la RT y la disminución de la EAC de las películas. Los autores mencionan que esto se debe al tamaño de molécula de gelatina que dio mayor cantidad de grupos reactivos dentro de una cadena para la interacción con los compuestos fenólicos a través de enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, lo cual fortaleció la estructura de la

película. Estos resultados son contrarios a lo encontrado en el presente trabajo. Al respecto, cabe mencionar que Hoque *et al.* (2011^b) no mencionan si hubo variación en los demás componentes de la solución formadora de película como el plastificante, lo cual pudo influir en el aumento de la RT. Por otro lado, la mayor concentración de polifenoles debido a la presentación de cada extracto (liofilizado), habría tenido efecto sobre una mayor disponibilidad de los mismos, los cuales interactuaron en mayor medida con la gelatina dando películas más resistentes. Así mismo, la adición del extracto de orégano del presente trabajo fue en mayor porcentaje lo cual está relacionado a una mayor fracción oleosa, a la diferencia entre los extractos evaluados ya que su composición depende de la materia prima, tipo y condiciones de extracción, etc. Finalmente, se puede mencionar que la diferencia en la composición química entre la gelatina de calamar y la de pescado pudo haber influido en los resultados de RT.

Núñez-Flores *et al.* (2013) reportaron que la adición de otros compuestos como la lignina en polvo, un polímero estructural de naturaleza polifenólica, también causó la disminución de la RT y el aumento de la EAC en películas de gelatina de pescado. Así mismo, Tongnuanchan *et al.* (2013) reportaron que la adición de aceites esenciales de jengibre, cúrcuma y jengibre tailandés en concentraciones de 25, 50 y 100 %, a las formulaciones de películas causaron la reducción de los valores de RT y el incremento de los valores de EAC respecto a un incremento en la concentración del aceite esencial.

Según lo expuesto, el efecto de la adición de extractos naturales y otros componentes a la formulación de películas comestibles sobre sus propiedades mecánicas depende de muchos factores como el origen de la gelatina, la naturaleza y concentración de extracto dependientes de la materia prima y condiciones de obtención, concentración de plastificante, etc; por lo tanto, no hay un patrón definido sobre la variación de estas propiedades mecánicas.

Los valores de resistencia a la tracción y elongación al corte del presente trabajo son menores al de los plásticos comerciales como el polietileno de alta densidad, HDPE, un film muy usado en las películas para el envasado de alimentos, que tiene una RT comprendida entre 29 – 44 MPa y una EAC de 675 – 980 %, mientras que el polietileno de baja densidad, LDPE, exhibe un rango de RT de 20 – 26 MPa y una EAC de 330 – 730 %. El polipropileno con aplicación en embalajes y similar al HDPE, tiene una RT de 25 – 40 MPa y una EAC de 150 – 300 %. Si bien es cierto que los valores de EAC son menores respecto a los plásticos

comerciales, en algunos casos son similares a lo encontrado en el presente trabajo, lo cual puede indicar las posibles aplicaciones.

4.5.2. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Se determinaron las propiedades fisicoquímicas de las películas comestibles mediante el análisis de su espesor, color, índice de opacidad, contenido de humedad, y solubilidad en agua.

4.5.2.1. Espesor

Los valores de espesor de las películas comestibles con extracto de orégano se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18: Valores de espesor de las películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	ESPESOR (mm)
EO 0 %	0,050 ± 0,003 ^a
EO 2 %	0,051 ± 0,001 ^a
EO 4 %	0,055 ± 0,001 ^b
EO 6 %	0,063 ± 0,001 ^c
EO 8 %	0,057 ± 0,002 ^b

^{a, b, c} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

En la Tabla 18 se muestra que el espesor de las películas comestibles se incrementó con la incorporación del extracto de orégano hasta la película con 6 % de EO. Esto a su vez, está relacionado con la disminución de la gelatina presente en la solución formadora de película de cada tratamiento. No se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre la película sin extracto y con 2 % de EO mientras que, entre las películas con 2, 4 y 6 % se observó diferencia significativa ($P < 0,05$), siendo el valor máximo de espesor alcanzado el correspondiente a la película con 6 % de EO. A partir de este tratamiento, el espesor decae, observándose que no existe diferencia significativa ($P > 0,05$) entre las películas con 4 y 8 % de EO. El espesor de las películas depende de la composición de la solución formadora de película así como de las condiciones de secado y está directamente relacionado con las propiedades mecánicas y de barrera de las películas comestibles. De la misma manera,

Tongnuanchan *et al.* (2013) reportaron que la adición de aceites esenciales de jengibre, cúrcuma y jengibre tailandés en concentraciones de 25, 50 y 100 %, a las formulaciones de películas causaron el incremento del espesor de las películas resultantes.

4.5.2.2. Color

Los parámetros de color de las películas comestibles con extracto de orégano se muestran en la Tabla 19.

Tabla 19: Parámetros de color de las películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	PARÁMETROS DE COLOR		
	L^*	a^*	b^*
EO 0 %	20,29 ± 1,339 ^a	2,14 ± 0,823 ^a	2,19 ± 0,057 ^a
EO 2 %	18,58 ± 0,304 ^{a,b}	1,17 ± 0,210 ^a	2,06 ± 0,047 ^a
EO 4 %	17,01 ± 0,837 ^{b,c}	-1,75 ± 1,206 ^{b,c}	1,62 ± 0,202 ^b
EO 6 %	16,15 ± 0,600 ^{c,d}	-1,12 ± 0,120 ^b	1,24 ± 0,035 ^c
EO 8 %	13,81 ± 1,034 ^d	-2,84 ± 0,428 ^c	1,11 ± 0,060 ^c

^{a, b, c, d} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

El color de la película con 0 % de EO fue transparente y los valores de L^* , a^* y b^* se utilizaron como referencia para describir la variación del color de las películas causado por la incorporación del EO. El valor de luminosidad L^* , disminuyó con el incremento de la concentración del extracto. Núñez-Flores *et al.* (2013) reportaron un valor de L^* de 34,04 en películas de gelatina de pescado mientras que Hoque *et al.* (2011^b) reportaron un valor de L^* mayor de 91,29 en películas elaboradas a partir de gelatina de piel de calamar. La diferencia entre los valores de L^* del presente trabajo frente a lo reportado por otros autores, podría deberse a la pigmentación de la gelatina lo cual depende de la materia prima, de las condiciones de extracción y del tipo de procesamiento.

Los valores iniciales de a^* fueron positivos y disminuyeron resultando en valores cada vez más negativos, lo cual indica que el color verde del extracto se acentuó progresivamente en cada película conforme se dio el incremento del EO debido al efecto de los pigmentos presentes en el EO.

Todos los valores de b^* fueron positivos y disminuyeron con la adición del EO en la formulación. Esto corresponde a la variación progresiva del color amarillo a verde, según la escala CIELAB y se correlaciona con el aumento de la concentración del EO utilizado. Rattaya *et al.* (2009) reportaron que la adición del extracto de alga a la formulación de una película comestible no modificó los valores de L^* , pero si se modificaron los valores de a^* y b^* de acuerdo a la coloración verde del extracto.

4.5.2.3. Índice de Opacidad

Los valores del índice de opacidad de las películas comestibles con extracto de orégano se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20: Índice de opacidad de las películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	ÍNDICE DE OPACIDAD
EO 0 %	$0,79 \pm 0,103^a$
EO 2 %	$0,80 \pm 0,053^a$
EO 4 %	$0,92 \pm 0,060^{a,b}$
EO 6 %	$1,01 \pm 0,087^b$
EO 8 %	$1,11 \pm 0,067^b$

^{a, b} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

En la Tabla 20 se observa que la incorporación de los porcentajes de extracto de orégano causó un incremento del índice de opacidad de las películas aunque no en forma directamente proporcional. El color verde acentuado del EO concentrado causado por la presencia de polifenoles y su incremento en bajos porcentajes en las formulaciones no dio lugar a un incremento en la opacidad de las películas de manera directa ya que no se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre las películas con 0 – 4 % de EO y entre las películas con 4 – 8 % de EO. Esto también está relacionado con una mayor distribución del extracto en la matriz proteica a mayores porcentajes de EO.

La opacidad es una propiedad importante que puede prevenir la oxidación lipídica impidiendo la penetración de la luz UV, lo que resulta interesante en la aplicación potencial de estos materiales sobre algunos alimentos. Sin embargo, también puede mermar la calidad

del producto pues en el sector alimentario el aspecto visual/ sensorial del producto determina muchas veces su demanda.

Gómez-Estaca *et al.* (2009^a) reportaron que la adición de extracto de borraja en la formulación de películas comestibles causó un gran incremento del índice de opacidad de 0,4 a 13 aprox. Núñez-Flores *et al.* (2013) reportaron que las películas de gelatina de pescado mostraron un índice de opacidad de 0,52 un valor cercano al de la película sin EO del presente trabajo. La adición de 2 tipos de lignina a la formulación de la película causó un aumento significativo del índice de opacidad de las películas resultantes (9,84 y 4,62). Por otro lado, Kavooosi *et al.* (2014) reportaron que la adición de aceite esencial de *Zataria multiflora* de 2 – 8 % respecto al peso de gelatina de bovino, aumentó significativamente la opacidad de las películas obtenidas. Las diferencias en la variación del índice de opacidad de las películas entre el presente trabajo y lo reportado por otros autores se debió a la naturaleza del extracto y la concentración empleada.

4.5.2.4. Contenido de humedad

El contenido de humedad de las películas comestibles con extracto de orégano se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21: Valores de humedad de las películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	HUMEDAD (%)
EO 0 %	10,69 ± 0,991 ^a
EO 2 %	11,33 ± 0,587 ^a
EO 4 %	11,99 ± 1,021 ^a
EO 6 %	12,16 ± 0,711 ^a
EO 8 %	12,58 ± 0,187 ^a

En la Tabla 21 se observa que la humedad de las películas fluctuó entre 10,69 – 12,58 %, observándose que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$) en las películas con el aumento del EO. La humedad y la composición de una película influyen directamente sobre la temperatura de transición vítrea (T_g) lo cual puede denotar la estabilidad de una película. A medida que aumenta el contenido de agua de un material amorfo, la T_g disminuye. Así, para una temperatura de almacenamiento dada, una matriz amorfa con bajo contenido de agua (en

el estado vítreo) permanece estable al cambio molecular, mientras que la misma matriz con mayor contenido de humedad, correspondiente al estado gomoso, puede sufrir una reorganización molecular. En el estado gomoso, las cadenas de polímero poseen suficiente movilidad para el crecimiento de cristales (García *et al.*, 2009). En este caso, todas las películas fueron secadas a 50 °C y fueron estables al medio ambiente. Valores similares de humedad (10 %) fueron reportados por Chiou *et al.* (2009) en películas de gelatina de abadejo y salmón rosado de Alaska secadas a 60 °C.

La humedad de una película comestible está relacionada con la concentración y tipo de plastificante e influye en sus propiedades mecánicas y de barrera. Bergo *et al.* (2013) determinaron que el glicerol presentó el mayor efecto higroscópico que otros plastificantes favoreciendo así la absorción de humedad por la película. Por otro lado, las películas de almidón presentaron mayores valores de humedad, como Mahecha *et al.* (2012) quienes reportaron un valor de humedad de 18,2 % en películas de harina de achira, mientras que Pelissari *et al.* (2013) reportaron valores de humedad comprendidos entre 13,1 – 22,3 % en películas de harina de plátano.

4.5.2.5. Solubilidad en agua

Los valores de solubilidad en agua de las películas comestibles con extracto de orégano se muestran en la Tabla 22:

Tabla 22: Valores de solubilidad de las películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	SOLUBILIDAD EN AGUA (%)
EO 0 %	98,92 ± 0,120 ^a
EO 2 %	95,52 ± 0,414 ^b
EO 4 %	93,76 ± 0,700 ^c
EO 6 %	92,45 ± 0,440 ^{c,d}
EO 8 %	91,83 ± 0,797 ^d

^{a, b, c, d} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

En la Tabla 22 se observa que los valores de solubilidad de todas las películas fueron altos, siendo el valor del tratamiento control cercano a 100 %. La solubilidad disminuyó con el incremento del EO en la formulación observándose diferencia significativa ($P < 0,05$) entre

las películas control, 2, 4 y 8 %. La disminución de la solubilidad estaría relacionada al incremento de la fracción lipofílica asociada a un mayor porcentaje de EO en las películas con la consecuente formación de un complejo entre los polifenoles del extracto y la gelatina, con tendencia a la precipitación. La solubilidad es una propiedad muy importante de las películas ya que relaciona la interacción de la película con los tipos de alimentos a recubrir y en consecuencia, determina la aplicación de las mismas en la industria alimentaria.

La solubilidad depende del tipo de proteína que se utiliza para la elaboración de las mismas, lo cual está relacionado a la composición interna de cada matriz proteica. Hoque *et al.* (2011^b) reportaron un valor de 96,02 % de solubilidad en películas de gelatina de calamar y la adición de extractos etanólicos de canela, anís, y clavo de olor en la formulación, causó la disminución de la solubilidad a valores comprendidos entre 94,45 – 95,04 %.

Las películas obtenidas de otras fuentes proteicas exhibieron valores más bajos de solubilidad tal como lo reportaron Teixeira *et al.* (2014) quienes elaboraron películas a partir de proteína recuperada de recortes de merluza reportando un valor de solubilidad cercano a 35 %. La adición de aceites esenciales de orégano, clavo de olor y ajo causó la disminución de la solubilidad de películas hasta 10, 10 y 23 %, aprox. respectivamente. En este caso, la naturaleza del EO contribuyó a la baja solubilidad de las mismas.

Wu *et al.* (2014) reportaron valores bajos de solubilidad en películas de mezclas de quitosano y gelatina de piel de carpa, e incorporaron aceite esencial de orégano de 1 – 4 % lo cual causó la disminución de 32,87 – 30,16 %. En este caso, la solubilidad de las películas se debió al aporte de la gelatina en la formulación y no del quitosano.

Por otro lado, las películas elaboradas con almidón de diversas fuentes vegetales presentaron valores de solubilidad menores que las películas de origen marino. Pelissari *et al.* (2013) reportaron los siguientes valores de solubilidad: 38,3; 42,3; 18,7 y 27, 9 % en películas de achira, amaranto, quinua y banana.

4.5.3. PROPIEDADES DE BARRERA

Se determinaron las propiedades de barrera de las películas comestibles mediante el análisis de su permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad al oxígeno.

4.5.3.1. Permeabilidad al vapor de agua

Los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles con extracto de orégano se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23: Valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (g-mm/m ² -h-kPa)
EO 0 %	0,062 ± 0,010 ^a
EO 2 %	0,061 ± 0,004 ^a
EO 4 %	0,064 ± 0,003 ^a
EO 6 %	0,069 ± 0,014 ^a
EO 8 %	0,070 ± 0,004 ^a

En la Tabla 23 se observa que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$) en los valores de permeabilidad al vapor de agua, PVA, entre las películas con los diferentes porcentajes de extracto de orégano y son menores respecto a lo reportado por otros autores que emplearon gelatinas de otras especies de pescado. Hernández (1994) citado por Debeaufort y Voilley (2009) menciona que la transferencia de vapor de agua generalmente ocurre a través de la porción hidrofílica de la red de película siendo por ello dependiente de la proporción hidrofílica/hidrofóbica de los componentes de la película. En el presente trabajo, al parecer la modificación de esta relación causado por el incremento del EO y la disminución de la gelatina de las formulaciones no modificó significativamente la PVA de las películas.

Por otro lado, McHugh *et al.* (1993) mencionan que el aumento de proteína y espesor de las películas de gelatina causan una mayor absorción de agua del ambiente debido a la presencia de aminoácidos hidrofílicos en su estructura. La incorporación del EO en la formulación asociado a una disminución del contenido proteico, causó el aumento de espesor de las películas alcanzándose al parecer un equilibrio, por lo que no se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre los valores de PVA. Adicionalmente, el incremento del EO

también se relacionó con la disminución del glicerol en la formulación. Al respecto, Cuq *et al.* (1997) mencionan que el aumento del glicerol causa un incremento de la permeabilidad debido a la reorganización de la estructura proteica con el consecuente incremento del volumen libre debido a la migración de las moléculas de agua y por su carácter hidrofílico. En el presente trabajo esta disminución no fue significativa ya que no influyó en la variación de los valores de PVA.

En otros estudios realizados en películas de gelatina de otras especies de pescado se reportaron valores de PVA más altos, por ejemplo Núñez-Flores *et al.* (2013) reportaron valores de PVA comprendidos entre 0,206 – 0,458 g-mm/m²-h-kPa en películas de gelatina de peces de agua caliente con lignina a diferentes concentraciones mientras que, Gómez-Guillén *et al.* (2007) reportaron valores comprendidos entre 0,216 – 0,283 g-mm/m²-h-kPa en películas de piel de atún con extracto de murta.

Por otro lado, Chiou *et al.* (2008) reportaron valores de PVA entre 0,857 – 0,728 g-mm/m²-h-kPa y 1,084 – 0,848 g-mm/m²-h-kPa, en películas de gelatina de alaska pollock y salmón, respectivamente; mientras que las películas de gelatina de bovino y porcino exhibieron valores de PVA de 1,862 y 1,854 g-mm/m²-h-kPa, respectivamente. Así mismo, Hoque *et al.* (2011^b) reportaron un valor de PVA de 0,3456 g-mm/m²-h-kPa en películas de gelatina de calamar y la adición de extractos de anís, canela y clavo en la formulación, causó la disminución de los valores de PVA de las películas resultantes.

Los valores de PVA del presente trabajo son mayores que los valores de plásticos comerciales (Qenos) como el polietileno de baja densidad, LDPE, que tiene un valor de PVA de 0,000185 g-mm/m²-h-kPa, mientras que el polietileno de alta densidad, HDPE, muestra un valor de PVA de 0,000082 g-mm/m²-h-kPa, ambos usados ampliamente a nivel mundial. Por otro lado, el polipropileno muestra un valor de PVA de 0,000123 g-mm/m²-h-kPa mientras que el valor del etilen vinil alcohol, EVOH, que depende de la humedad no esta determinada.

4.5.3.2. Permeabilidad al oxígeno

Los valores de permeabilidad al oxígeno de las películas comestibles con extracto de orégano se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24: Valores de permeabilidad al oxígeno de las películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	PERMEABILIDAD AL OXÍGENO (cm ³ μm/m ² -día-kPa)
EO 0 %	2,231 ± 0,157 ^a
EO 2 %	1,594 ± 0,337 ^b
EO 4 %	0,738 ± 0,120 ^c
EO 6 %	0,363 ± 0,055 ^{c,d}
EO 8 %	< 0,151 ± 0,003 ^d

^{a, b, c, d} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

En la Tabla 24 se muestra que la permeabilidad al oxígeno, PO, de las películas comestibles disminuyó con la adición del extracto de orégano observándose diferencia significativa ($P < 0,05$) entre las películas control, 2, 4 y 8 %. Al parecer, el incremento del EO en los tratamientos dio lugar a una mayor interacción entre los polifenoles del extracto y la gelatina mediante interacciones hidrofóbicas dando lugar a una red compleja que impidió el paso del oxígeno a través de la película. Por otro lado, el incremento del extracto de orégano constituido por una fracción lipofílica debido al método de extracción empleado, pudo haber contribuido con la disminución de la permeabilidad al oxígeno, debido a una dispersión uniforme de los lípidos en la matriz polimérica. Al respecto, Wessling *et al.* (2000), citados por Jongjareonrak *et al.* (2008) mencionan que la incorporación de compuestos hidrofóbicos en las películas de gelatina causaron efectos negativos sobre la tasa de transmisión del oxígeno de las mismas.

En general, se espera que las películas de biopolímeros sean de moderadas a excelentes barreras al oxígeno debido a su estrecho empaquetamiento, estructura de red ordenada de enlaces de hidrógeno (Fang y Hanna, 2000; citados por Han, 2014). De igual manera, Stanley *et al.* (1994) citados por Lacroix (2014) sostienen que debido a la naturaleza hidrofílica de las proteínas, las películas comestibles hechas de ellas tienen una excelente propiedad de barrera al oxígeno pero son susceptibles a la humedad.

Así mismo, la disminución de gelatina empleada y asociada al incremento del EO en cada tratamiento, pudo haber modificado la tasa de hidrofobicidad/hidrofilicidad de los aminoácidos constituyentes. Salame (1986) citado por Jongjareonrak *et al.* (2008) menciona

que, en general, las películas proteicas con hidrofobicidad alta exhiben pobres propiedades de barrera al oxígeno.

Nur-Hanani *et al.* (2012), reportaron valores de PO comprendidos entre 0,4 – 0,5 cm³μm/m²-día-kPa en películas comestibles elaboradas con 4 % de gelatina de origen porcino, vacuno y de tilapia. El incremento de la proteína a 6 % en la película de gelatina de tilapia, causó la disminución de la PO a un valor cercano a 0,3 cm³μm/m²-d-kPa.

Chiou *et al.* (2008) elaboraron películas a partir de gelatina de origen vacuno, porcino y marino (Alaska pollock y salmón) empleando como agente reticulante el glutaraldehído, siendo la película de Alaska pollock sin glutaraldehído la que presentó el menor valor de PO (2,398 cm³μm/m²-d-kPa), un valor cercano al de la película control del presente trabajo. La adición de porcentajes incrementales de agente reticulante causó el aumento y luego una disminución de la PO hasta un valor de 3,404 cm³μm/m²-d-kPa.

A diferencia de los valores de permeabilidad al vapor de agua respecto a los plásticos comerciales, los valores de permeabilidad al oxígeno del presente trabajo son mucho menores respecto a los plásticos comerciales, por ejemplo, el polietileno de baja densidad, LDPE, tiene una permeabilidad al oxígeno de 2097,2 cm³μm/m²-d-kPa, mientras que el polietileno de alta densidad, HDPE, tiene una PO menor que el LDPE, con un valor de 740,19 cm³μm/m²-d-kPa y el polipropileno tiene una PO de 1036,3 cm³μm/m²-d-kPa.

En el caso del etilen vinil alcohol, EVOH, que se utiliza frecuentemente en empaque para alimentos ya que es uno de los polímeros con menor permeabilidad al oxígeno, y se usa sobre todo en bolsas termoencogibles, tiene una de las PO más bajas, con un valor de 0,4 cm³μm/m²-d-kPa, un valor cercano a la película con 6 % de extracto de orégano.

4.5.4. PROPIEDADES ANTIOXIDANTES Y ANTIMICROBIANAS

4.5.4.1. Contenido de polifenoles extraíbles

El contenido de polifenoles extraíbles de las películas comestibles con extracto de orégano, EO, se muestra en la Tabla 25.

4.5.4.2. Actividad antioxidante

Los resultados de la actividad antioxidante de las películas comestibles con extracto de orégano se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25: Polifenoles extraíbles y actividad antioxidante de películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	POLIFENOLES EXTRAÍBLES (mg Eq. ácido gálico/ g de película)	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE–FRAP 30 min (mM Eq. FeSO ₄ .7H ₂ O/mg de película)
EO 0 %	1,28 ± 0,170 ^a	0,00 ± 0,001 ^a
EO 2 %	30,74 ± 0,341 ^b	0,77 ± 0,014 ^b
EO 4 %	61,43 ± 0,335 ^c	1,36 ± 0,023 ^c
EO 6 %	81,88 ± 1,534 ^d	2,01 ± 0,034 ^d
EO 8 %	98,98 ± 0,837 ^e	2,71 ± 0,074 ^e

a, b, c,d,e Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

En la Tabla 25 se muestra que la incorporación de extracto de orégano, EO, en las formulaciones, causó el aumento del contenido de polifenoles extraíbles y la capacidad antioxidante de las películas, observándose una correlación directa entre ambos análisis y diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores de todas las películas. Respecto a los polifenoles extraíbles, Gómez-Estaca *et al.* (2009^b) señalan que la cantidad de polifenoles presentes en una película dependen del contenido de prolina e hidroxiprolina de la gelatina, quienes se encargan de establecer interacciones proteína-proteína. Esto repercute en el número de interacciones entre las cadenas polipeptídicas de la gelatina y los polifenoles y esto a su vez, influye en el contenido de fenoles libres en las películas. En este caso, al tratarse de un mismo tipo de gelatina la cual fue disminuyendo en cada tratamiento respecto a un incremento del EO, hubo una menor interacción y con ello el incremento de los fenoles.

La actividad antioxidante de las películas se incrementó en relación directa al contenido de extracto incorporado en cada formulación. El aumento de EO dio lugar a un mayor contenido de polifenoles, grupo de sustancias con demostrada actividad antioxidante, los cuales formaron complejos con los polipéptidos de la gelatina trasladando esta actividad a las películas formadas.

Los resultados del contenido de polifenoles extraíbles y la capacidad antioxidante determinados en las películas comestibles muestran una alta correlación ($r^2 = 0,9836$) lo cual esta de acuerdo a lo demostrado por Shan *et al.* (2005) para extractos de hierbas.

Gómez-Estaca *et al.* (2009^b) reportaron que la adición de EO ricos en polifenoles incrementó la capacidad antioxidante de las películas de gelatina de pescado y de mamífero mientras que Gómez-Guillén *et al.* (2007) mencionan que la adición de extracto acuoso de murta a las soluciones filmogénicas dio como resultado películas con capacidad antioxidante.

También se ha reportado que la adición de aceites esenciales a la formulación incrementó la capacidad antioxidante de las películas comestibles. Teixeira *et al.* (2014) concluyeron que la adición de aceite esencial de orégano, ajo y clavo aumentaron la capacidad antioxidante de las películas comestibles de origen marino. Por su parte, Kavooosi *et al.* (2014) reportaron que la adición de aceite esencial de *zataria multiflora* a la formulación de películas comestibles de gelatina de bovino incrementó la actividad antioxidante de las películas comestibles.

El aporte del EO a la actividad antioxidante de las películas comestibles representa una gran ventaja ya que con esta característica, se puede orientar una serie de aplicaciones a la película específicamente en alimentos que pueden ser sensibles al deterioro por efecto de la oxidación, como el caso de los alimentos altos en contenido graso.

4.5.4.3. Actividad antimicrobiana

Los resultados de la actividad antimicrobiana de las películas comestibles con extracto de orégano se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26: Actividad antimicrobiana de las películas comestibles con extracto de orégano

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	CEPAS MICROBIOLÓGICAS									
	<i>Staphylococcus aureus</i> (gram +)		<i>Enterococcus faecalis</i> (gram +)		<i>Salmonella enterica</i> (gram -)		<i>Shigella spp.</i> (gram -)		<i>Proteus vulgaris</i> (gram -)	
EO 2 %	7,80 ± 0,16 ^a	++	N.D.		N.D.		N.D.		6,92 ± 0,19 ^a	++
EO 4 %	8,72 ± 0,46 ^a	++	N.D.		N.D.		N.D.		7,40 ± 0,26 ^a	++
EO 6 %	10,36 ± 0,84 ^b	+++	4,22 ± 3,14	+	2,80 ± 0,06	±	N.D.		8,39 ± 0,38 ^b	++
EO 8 %	11,47 ± 0,69 ^b	+++	6,92 ± 0,69	++	3,90 ± 0,03	±	7,30 ± 0,34	++	9,25 ± 0,27 ^c	++

Zona de inhibición: +++ : >10 mm, ++: ≥ 5 mm, + : 2.5-5 mm, ± : < 2.5 mm, - :1 mm.

En la Tabla 26 se observa la medida de los halos de inhibición formados por las películas con EO lo cual indica actividad antimicrobiana, frente a 5 cepas bacterianas gram (+) y gram (-). En la tabla se observa que el tamaño de halo aumentó con el incremento del EO y que las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Proteus vulgaris* fueron inhibidas por las películas con EO en todas las concentraciones evaluadas. Las bacterias *Enterococcus faecalis* y *Salmonella enterica*, sólo fueron inhibidas por las películas con 6 y 8 % de EO. En ambos grupos, los halos formados más grandes correspondieron a las bacterias gram (+). En el caso de la bacteria *Shigella*, ésta sólo fue inhibida por la película con 8 % de EO. La diferencia entre la inhibición sobre ambos grupos de bacterias puede estar relacionada a la presencia de una membrana externa adicional relativamente impermeable que rodea la pared celular en bacterias gram (-) lo cual restringe la difusión de compuestos hidrofóbicos a través de su recubrimiento de lipopolisacáridos (Burt, 2004; citados por Wu *et al.*, 2014).

Cabe mencionar que *Proteus vulgaris* es una bacteria que puede causar infecciones urinarias, septicemias y lesiones purulentas en diferentes órganos, representando un riesgo para la salud mientras que *Staphylococcus aureus* tiene la capacidad de producir enterotoxinas resistentes al calor en pocas horas, la cual la convierte en una bacteria causante de un gran número de intoxicaciones alimentarias.

Los componentes principales del EO, los compuestos fenólicos como el ácido rosmarínico y derivados del ácido protocatéquico, responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas actúan atacando la membrana celular fosfolipídica causando el aumento de la permeabilidad y fuga de citoplasma, o interactúan con las enzimas ubicadas en la pared celular (Burt, 2004; citados por Wu *et al.*, 2014). Estos compuestos fenólicos presentes en las películas comestibles, al parecer mantuvieron su actividad frente a las mismas bacterias evaluadas sólo con el EO, a diferencia de las bacterias gram (-) como *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhi* y *Pseudomona aeruginosa* donde no se reportó inhibición. En el caso de las películas frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Bacillus cereus* tampoco se encontró actividad inhibitoria. Este resultado era de esperarse ya que el EO inhibió su crecimiento mínimamente (Tabla 16).

Wu *et al.* (2014) determinaron que las películas de gelatina y quitosano con aceite esencial de orégano en concentraciones de 1 – 4 % ejercieron efecto antimicrobiano frente a las bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* con la formación de halos moderados a grandes.

El hecho de que las películas comestibles con EO exhiban por sí mismas actividad antimicrobiana representa algo positivo ya que permite orientar las posibles aplicaciones de estos materiales en la industria de los alimentos.

4.6. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y MICROBIOLÓGICAS DE FILETES DE TRUCHA RECUBIERTOS CON SOLUCIÓN FORMADORA DE PELÍCULA

Los filetes de trucha recubiertos con la solución formadora de película con extracto de orégano a 3 concentraciones (2, 4 y 6 %) fueron almacenados en refrigeración (3 – 4 °C) y evaluados fisicoquímica y microbiológicamente durante su almacenamiento. También se evaluó un tratamiento control (sin recubrimiento) para fines de comparación.

4.6.1. CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS

4.6.1.1. Composición química proximal

La composición química proximal inicial de los filetes de trucha que fueron evaluados en almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C) se muestra en la Tabla 27.

Tabla 27: Composición química proximal de filetes de trucha (g/100g)

COMPONENTE	VALOR
Humedad (%)	76,38 ± 0,106
Proteína total	17,17 ± 0,030
Grasa cruda (%)	5,11 ± 0,010
Ceniza (%)	0,97 ± 0,012

Según la Tabla 27, los valores de humedad, proteína y grasa cruda de la composición proximal de los filetes de trucha son similares a lo reportado por diversos autores (Jouki *et al.*, 2014; Raeisi *et al.*, 2015; Kakaei *et al.*, 2016). Sin embargo, hay variaciones principalmente en el contenido graso las cuales están relacionadas con la nutrición, el ciclo de desove, el tamaño del pez, etc. La determinación de la composición proximal influye en los atributos sensoriales del producto final.

4.6.1.2. Determinación de pH

Los valores de pH de los filetes de trucha en refrigeración se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28: Valores de pH en filetes de trucha durante el almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)					
	0	1	4	6	8	11
CONTROL	6,12 ± 0,015 ^{a,b}	6,07 ± 0,025 ^a	6,06 ± 0,015 ^a	6,16 ± 0,020 ^a	6,15 ± 0,020 ^a	6,26 ± 0,015 ^a
EO 2,0 %	6,17 ± 0,021 ^a	6,02 ± 0,025 ^a	6,07 ± 0,021 ^a	6,17 ± 0,021 ^a	6,14 ± 0,015 ^{a,b}	6,15 ± 0,025 ^b
EO 4,0 %	6,12 ± 0,015 ^{a,b}	6,03 ± 0,015 ^a	6,09 ± 0,012 ^a	6,13 ± 0,025 ^a	6,10 ± 0,021 ^b	6,09 ± 0,020 ^c
EO 6,0 %	6,10 ± 0,035 ^b	6,04 ± 0,025 ^a	6,08 ± 0,030 ^a	6,12 ± 0,025 ^a	6,09 ± 0,020 ^b	6,08 ± 0,021 ^c

a, b, c, Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

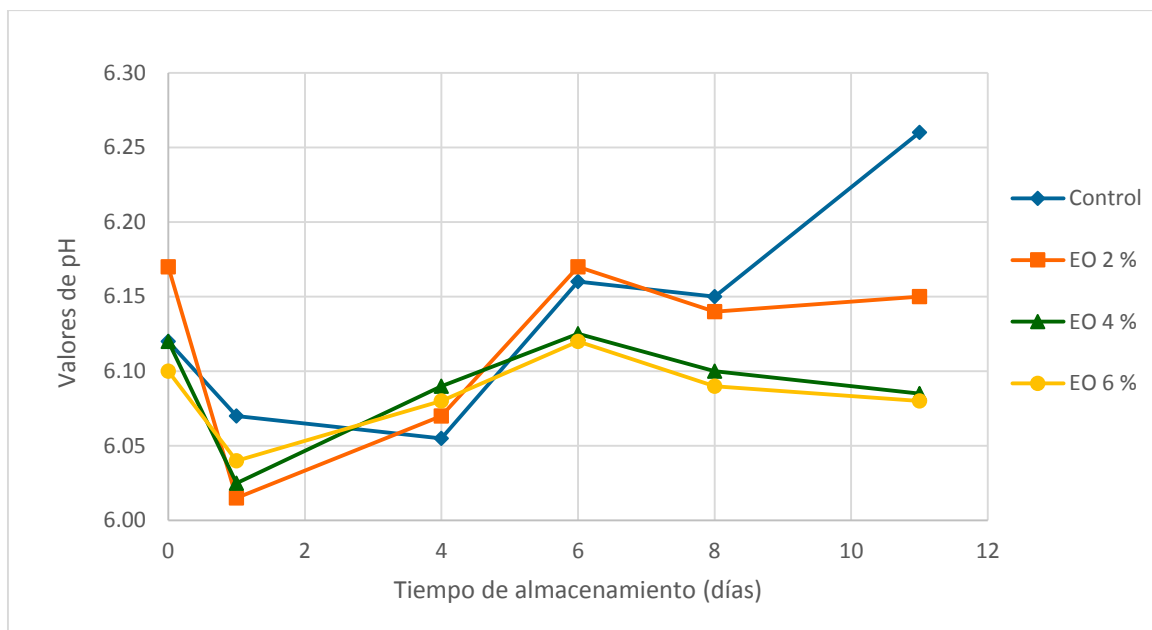


Figura 24: Variación del pH en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración

En la Figura 24 se observa que los valores de pH de los filetes de trucha mostraron inicialmente una disminución y luego un incremento hasta el día 6 seguido de una ligera disminución a excepción del tratamiento control que experimenta una subida desde el día 8 hasta el día 11. El mayor valor de pH en el día 11 correspondió al tratamiento control. Los tratamientos con 4 y 6 % de EO exhibieron los menores valores de pH en el día 11, notándose que no hay diferencia significativa entre los mismos ($P > 0,05$).

En el pescado fresco el pH es casi neutro. Después de la muerte ocurre el *rigor mortis*. El glucógeno o las grasas son oxidadas o "quemadas" por las enzimas del tejido, produciendo CO_2 , agua y adenosina trifosfato (ATP). La glucólisis es la única ruta posible para la producción de energía en cuanto el corazón deja de latir. Este proceso genera principalmente, ácido láctico y ácido pirúvico como productos finales. La cantidad de ácido láctico está relacionado con la cantidad de carbohidrato almacenado (glucógeno) en el tejido vivo. En general, el músculo de pescado contiene un nivel relativamente bajo de glucógeno. También el estado nutricional del pez, la cantidad y grado de agotamiento al momento de la muerte, tienen un efecto dramático en los niveles de glucógeno almacenado y consecuentemente en el pH *post mortem* final. En este período, la descomposición de los compuestos nitrogenados conduce a un incremento del pH afectando la calidad del producto durante el almacenamiento (Abbas, Saleh, Mohamed, & Lasekan, 2009, citados por Volpe *et al.*, 2015).

Valores de pH alcalinos están relacionados a la descomposición del pescado debido a la producción de amonio y aminas.

La incorporación de las mayores concentraciones de EO (4 y 6 %) atenuó el aumento de pH de los filetes. Al parecer, el EO incorporado en los recubrimientos redujo el crecimiento de las bacterias y con ello la descomposición de compuestos nitrogenados.

Volpe *et al.* (2015) incorporaron aceite esencial de limón a recubrimientos de carragenano para recubrir filetes de trucha determinando que los valores de pH más bajos al final del almacenamiento correspondieron a los filetes recubiertos con carragenano y aceite esencial de limón el cual ejerció un efecto protector frente a la acción de las bacterias causantes de la descomposición de compuestos nitrogenados como el amonio y la trimetilamina.

Kakaei *et al.* (2016) determinaron que el tratamiento combinado de aceite esencial de *Ziziphora clinopodioides* con extracto de semilla de uva incorporados a las películas de gelatina con quitosano a 2 concentraciones para recubrir filetes de trucha picada, protegió a las muestras de la descomposición bacteriana reflejándose en menores valores de pH durante el período de refrigeración de 11 días frente a los tratamientos individuales.

4.6.1.3. Determinación de Color

Los resultados de la evaluación de color de los filetes de trucha se muestran en las Tablas 29, 30 y 31.

Tabla 29: Parámetros de color L^* en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)					
	0	1	4	6	8	11
CONTROL	49,30 ± 0,655 ^a	50,88 ± 0,342 ^a	52,42 ± 0,522 ^a	53,32 ± 0,445 ^a	54,12 ± 1,059 ^a	54,91 ± 1,092 ^a
EO 2,0 %	50,76 ± 0,845 ^{a,b}	51,35 ± 0,456 ^a	52,88 ± 0,621 ^a	53,84 ± 0,992 ^a	53,36 ± 0,620 ^a	53,69 ± 1,093 ^a
EO 4,0 %	51,51 ± 0,850 ^b	52,53 ± 0,390 ^b	53,39 ± 1,115 ^a	52,76 ± 0,951 ^a	53,20 ± 0,361 ^{a,b}	51,37 ± 0,477 ^b
EO 6,0 %	50,04 ± 0,327 ^{a,b}	51,70 ± 0,581 ^{a,b}	52,89 ± 0,365 ^a	52,03 ± 0,799 ^a	51,50 ± 0,457 ^b	50,56 ± 0,389 ^b

^{a, b} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

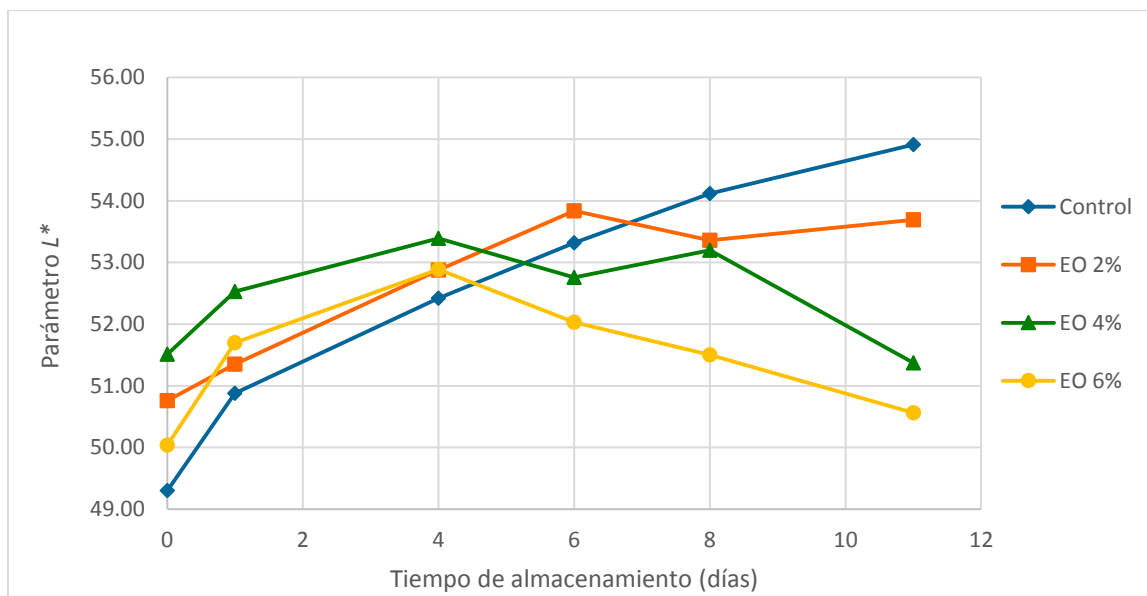


Figura 25: Variación del parámetro L^* en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración

En la Figura 25 se muestra que el parámetro L^* , que indica la tendencia de color negro (valor 0) a blanco (valor 100), se incrementó sostenidamente en el tratamiento control y con 2 % de EO, no observándose diferencia significativa ($P > 0,05$) entre ambos al final del almacenamiento, tal como se observa en la Tabla 29 . Los valores de L^* de los tratamientos con 4 y 6 % de EO, aumentaron inicialmente y a partir del día 4 mostraron una disminución hasta el final del período de almacenamiento notándose que no hubo diferencia significativa ($P > 0,05$) entre ambos tratamientos al término del almacenamiento. Al parecer, la incorporación de EO a estas concentraciones amortiguó la decoloración de los carotenoides (antaxantina y cantaxantina) del músculo de trucha que por sus dobles enlaces conjugados son propensos a una decoloración debido a la oxidación. La evaluación del parámetro de color L^* es muy importante ya que influye en la evaluación de la calidad de la carne de trucha arco iris el cual está influenciado por el contenido de su pigmento carotenoides (Francis, 1995, citado por Choubert y Baccaunaud, 2006).

Tabla 30: Parámetros de color a^* en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)					
	0	1	4	6	8	11
CONTROL	19,97 ± 0,944 ^a	18,98 ± 1,088 ^a	17,03 ± 0,137 ^a	16,08 ± 0,797 ^a	15,34 ± 0,580 ^a	14,59 ± 0,707 ^a
EO 2,0 %	17,82 ± 1,389 ^a	16,94 ± 0,806 ^a	17,30 ± 0,933 ^a	16,47 ± 0,590 ^a	15,63 ± 0,636 ^{a,b}	15,04 ± 0,191 ^a
EO 4,0 %	18,01 ± 0,907 ^a	18,55 ± 0,520 ^a	18,05 ± 0,981 ^a	17,62 ± 1,260 ^a	17,34 ± 0,692 ^{b,c}	16,92 ± 0,505 ^b
EO 6,0 %	18,75 ± 0,836 ^a	18,54 ± 1,116 ^a	18,22 ± 0,350 ^a	18,00 ± 1,211 ^a	17,82 ± 0,903 ^c	17,56 ± 0,517 ^b

^{a, b, c} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

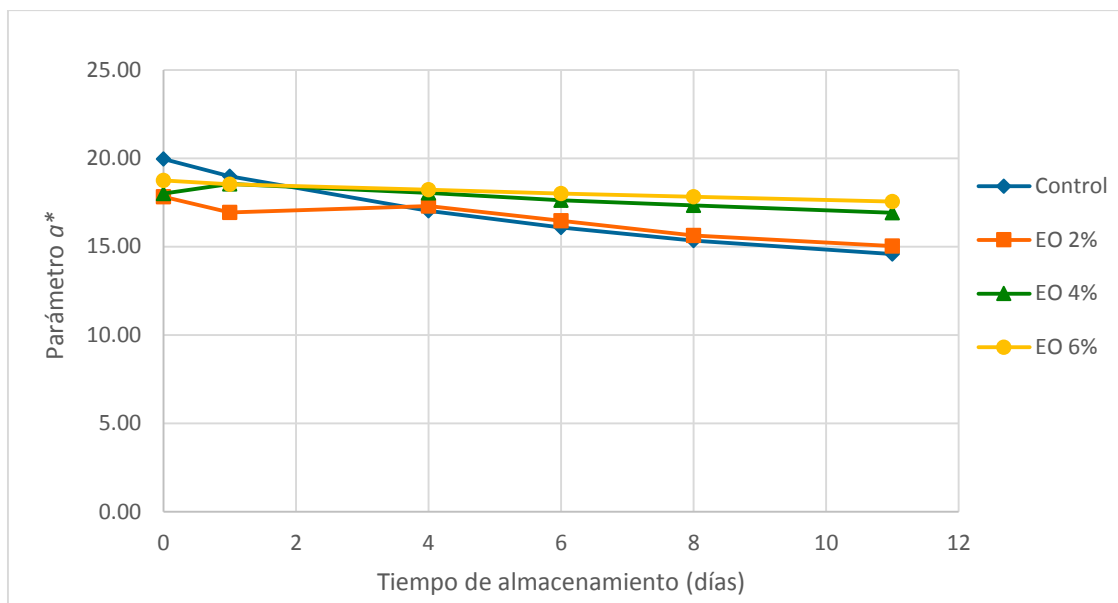


Figura 26: Variación del parámetro a^* en filetes de trucha durante almacenamiento en refrigeración

En la Tabla 30 se observa que todos los valores de a^* , parámetro que fluctúa entre el color rojo (+) a verde (-), fueron positivos lo cual indica variación en la región de color rojo. En la Figura 26 se observa que la tendencia en la variación del parámetro a^* de los filetes de trucha fue similar entre todos los tratamientos, notándose que los tratamientos control y con 2 % de EO presentaron los valores de a más bajos a diferencia de los tratamientos con 4 y 6 % de EO, observándose que hay diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los pares de valores. La influencia del EO en los tratamientos también se hace evidente en esta evaluación ya que la variación de a^* indica que hay una menor pérdida de color característico del músculo debido al efecto protector del extracto.

Tabla 31: Parámetros de color b^* en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)					
	0	1	4	6	8	11
CONTROL	22,52 ± 1,591 ^a	22,82 ± 0,489 ^a	23,84 ± 0,975 ^a	25,32 ± 0,596 ^a	26,23 ± 1,485 ^a	27,02 ± 0,825 ^a
EO 2,0 %	23,54 ± 0,593 ^a	24,45 ± 1,015 ^{a,b}	25,66 ± 1,004 ^a	26,15 ± 0,210 ^a	26,92 ± 0,921 ^{a,b}	27,43 ± 0,498 ^a
EO 4,0 %	24,57 ± 1,061 ^a	24,74 ± 0,361 ^{a,b}	25,71 ± 0,839 ^a	25,98 ± 0,758 ^a	28,16 ± 0,945 ^{a,b}	27,79 ± 1,080 ^a
EO 6,0 %	25,25 ± 1,374 ^a	25,50 ± 0,911 ^b	26,11 ± 0,837 ^a	27,94 ± 0,715 ^b	28,95 ± 0,465 ^b	29,47 ± 0,578 ^b

^{a, b} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

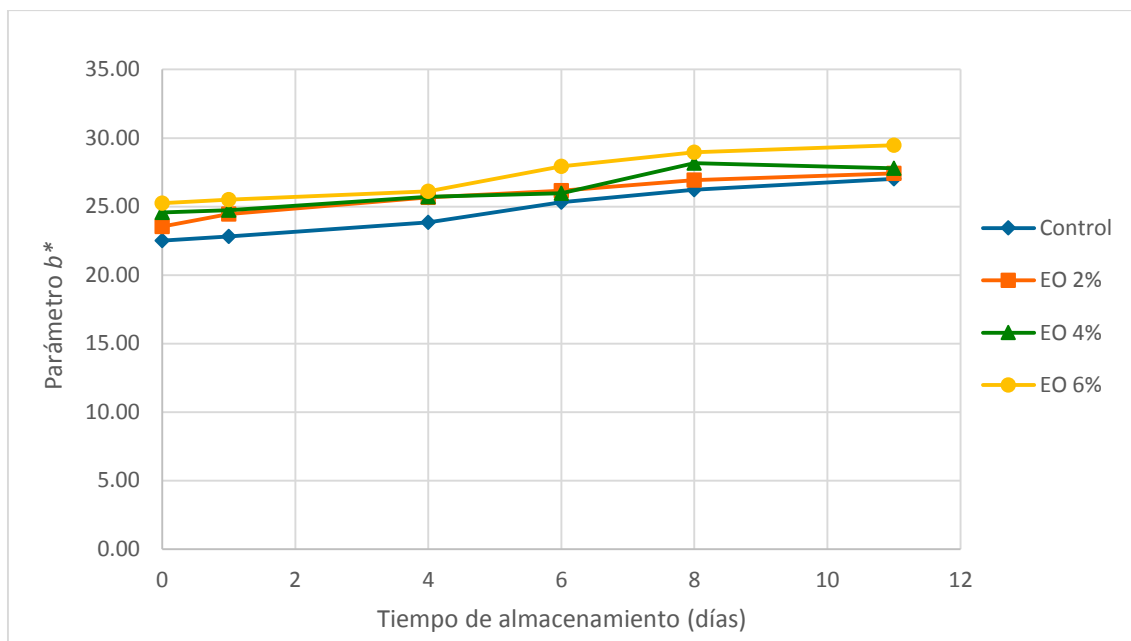


Figura 27: Variación del parámetro b^* en filetes de trucha durante almacenamiento en refrigeración

En la Figura 27 se observa una tendencia similar de la variación del parámetro b^* de los filetes de trucha entre todos los tratamientos, tal como sucedió con el parámetro a^* . El valor más alto alcanzado de b^* correspondió al tratamiento con EO al 6 %. El parámetro b^* varía entre el color amarillo (+) a azul (-), donde los valores positivos de b^* , indican variación en la región de color amarillo al color naranja. Al final de la evaluación se observa que el tratamiento con 6 % de EO mostró el valor más alto de b^* lo cual indica que el color naranja del músculo de trucha fue más acentuado a diferencia de los demás tratamientos donde no se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre los valores de b^* . Al parecer la presencia del EO en un porcentaje de 6 % en el recubrimiento ejerció un mayor efecto sobre el mantenimiento del parámetro b^* de los filetes de trucha.

4.6.1.4. Valor Peróxido

Los resultados del valor peróxido en filetes de trucha en almacenamiento se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32: Valor peróxido (meq peróxido/kg muestra) en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4°C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)					
	0	1	4	6	8	11
CONTROL	2,55 ± 0,000 ^a	4,14 ± 0,450 ^a	4,30 ± 0,225 ^a	4,30 ± 0,225 ^a	4,30 ± 0,225 ^a	5,25 ± 0,675 ^a
EO 2,0 %	4,02 ± 1,421 ^a	3,85 ± 0,710 ^a	4,52 ± 0,237 ^a	3,18 ± 0,237 ^b	4,02 ± 0,947 ^{a,b}	4,67 ± 0,467 ^{a,b}
EO 4,0 %	3,50 ± 0,707 ^a	2,84 ± 0,236 ^a	4,50 ± 0,236 ^a	3,50 ± 0,236 ^{a,b}	3,34 ± 0,472 ^{a,b}	3,31 ± 0,467 ^b
EO 6,0 %	4,80 ± 0,700 ^a	2,15 ± 0,703 ^a	4,80 ± 0,234 ^a	3,31 ± 0,000 ^b	1,82 ± 0,234 ^b	3,01 ± 0,000 ^b

^{a, b} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

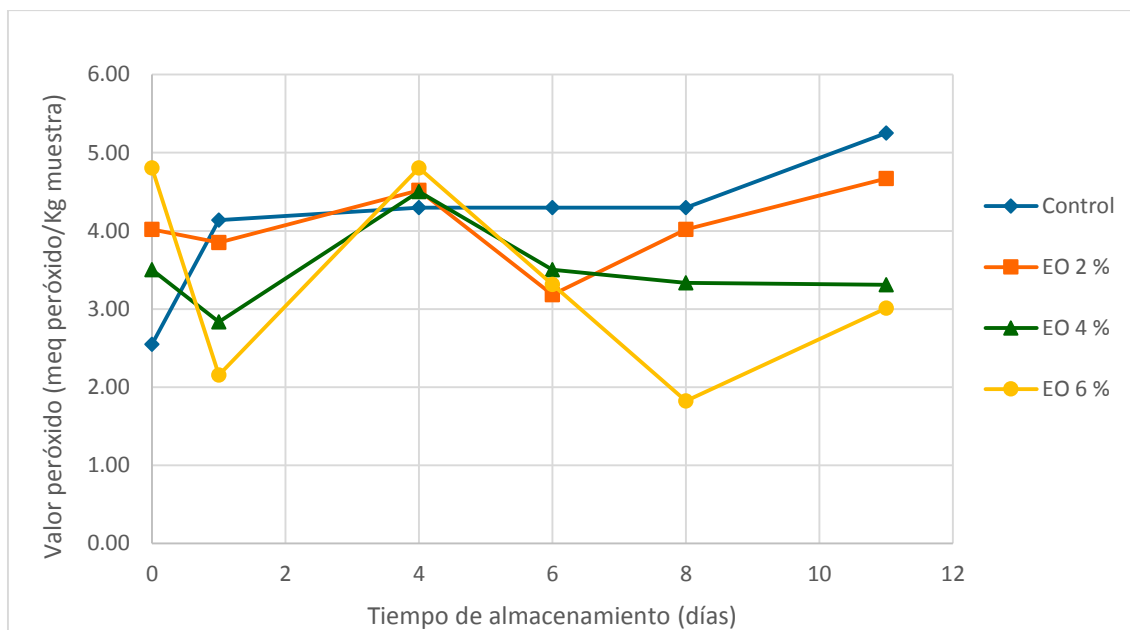


Figura 28: Variación del valor peróxido en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración

En la Tabla 32 se muestra que el valor peróxido, VP, varió de 2,55 – 4,80 meq peróxido/kg muestra, entre los tratamientos del día 0, siendo el menor valor el correspondiente al tratamiento control el cual mostró el mayor incremento del VP al final del almacenamiento (5,25 meq peróxido/kg muestra). En la Figura 28 se observa que los tratamientos con 2, 4 y 6 % de EO presentaron similar variación de VP hasta el día 6 de la evaluación, sin embargo, a partir de este punto sólo el tratamiento con 2 % de EO se incrementó, mientras que en los tratamientos con 4 y 6 % de EO los valores de VP disminuyeron al final del período de evaluación respecto al día 6. En el día 11, no se observó diferencia significativa entre el tratamiento control y el que tuvo 2 % de EO mientras que los tratamientos con 4 y 6 % de EO mostraron los menores valores de VP: 3,31 y 3,01 meq peróxido/kg muestra respectivamente, y no se observó diferencia significativa entre ellos. Varlik *et al.* (1993) citados por Fadiloglu y Çoban (2018) establecieron la siguiente clasificación: $VP < 2$ mmol O_2 / kg pescado como *muy buenos*, hasta 5 mmol O_2 / kg pescado como *buenos* y en el rango de 8 – 10 mmol O_2 / kg pescado como *límite aceptable*. Según esto, los valores de VP de los tratamientos con EO alcanzados hasta el día 11 de almacenamiento fluctuaron entre 3 y 5 meq peróxido/kg muestra clasificándose como *buenos*. Estos resultados y la Figura 28 concuerdan con la gráfica característica de la evolución en la formación de peróxidos en aceites respecto al tiempo, y corresponde a la región correspondiente a la etapa de iniciación de la autooxidación.

La autooxidación o rancidez oxidativa se presenta en lípidos con alto contenido en ácidos grasos insaturados como el caso del aceite de trucha. La autooxidación de este aceite ocurre por la acción directa del oxígeno sobre los dobles enlaces de los ácidos grasos insaturados con la consecuente producción de hidroperóxidos y otros compuestos que confieren el olor típico de grasa oxidada. Existen algunos factores que favorecen la oxidación como la presencia de lipoxidasas, luz UV, altas temperaturas, metales y catalizadores orgánicos de hierro (Badui, 2006).

Fadiloglu y Çoban (2018) recubrieron filetes de trucha con quitosano y sumac, una especia conocida por su poder antioxidante, y determinaron que la incorporación de la especia en el recubrimiento extendió la vida útil de los filetes de 9 – 11 días de acuerdo a su VP.

Ojagh *et al.* (2010) evaluaron la incorporación del aceite de canela en filetes de trucha cocidas recubiertos de quitosano encontrando que los valores de VP fueron más altos que en el presente trabajo. Al final de la evaluación (16 días), los valores de VP del tratamiento control estuvieron alrededor de 8 meq peróxido/kg muestra mientras que los valores del tratamiento con quitosano y aceite de canela de estuvieron alrededor de 4 meq peróxido/kg muestra. El tratamiento con quitosano mostró un valor de VP alrededor de 3 meq peróxido/kg muestra, un valor similar de VP al de los tratamientos con 4 y 6 % de EO del presente trabajo a los 11 días de almacenamiento. Hoseinni *et al.* (2016) reportaron una tendencia y valores similares de VP en filetes de trucha recubiertas con gelatina y con gelatina y aceite esencial de orégano.

Nowzari *et al.* (2013) determinaron que el recubrimiento de filetes de trucha con gelatina y quitosano en doble capa resultó en una disminución de los valores de VP frente al tratamiento control, siendo estos valores de VP reportados tanto al inicio como al final del periodo de evaluación en todos los tratamientos menores a lo encontrado en el presente trabajo lo cual pudo deberse al aporte del quitosano en la formulación.

4.6.1.5. Ácidos grasos libres

Los resultados de acidez de los filetes de trucha durante el almacenamiento en refrigeración se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33: Valores de acidez (% ácido oleico) en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)					
	0	1	4	6	8	11
CONTROL	1,01 ± 0,003 ^a	1,17 ± 0,007 ^a	0,80 ± 0,014 ^a	0,82 ± 0,000 ^a	0,90 ± 0,014 ^a	1,62 ± 0,007 ^a
EO 2,0 %	0,74 ± 0,011 ^b	1,34 ± 0,007 ^b	0,62 ± 0,007 ^b	1,12 ± 0,007 ^b	0,84 ± 0,007 ^b	1,62 ± 0,007 ^a
EO 4,0 %	0,82 ± 0,010 ^c	1,13 ± 0,000 ^c	1,24 ± 0,007 ^c	0,74 ± 0,007 ^c	0,78 ± 0,007 ^c	1,41 ± 0,007 ^b
EO 6,0 %	0,89 ± 0,011 ^d	0,84 ± 0,000 ^d	0,95 ± 0,007 ^d	0,66 ± 0,000 ^d	0,56 ± 0,007 ^d	0,99 ± 0,007 ^c

a, b, c, d Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

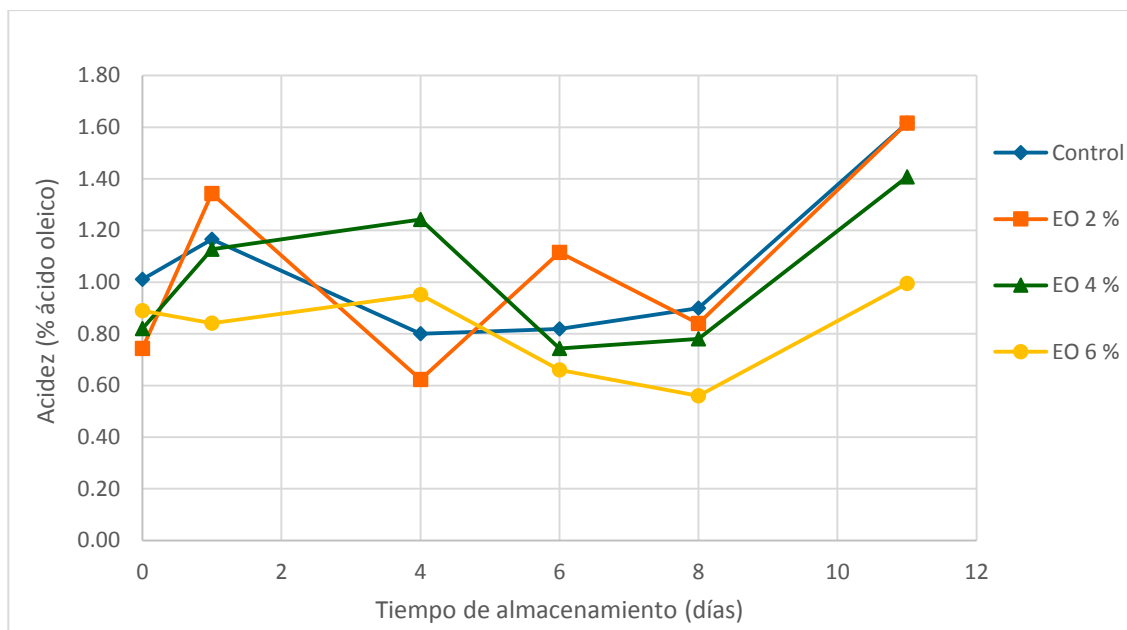


Figura 29: Variación de la acidez en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración

En la Figura 29 se observa la fluctuación de los valores de acidez en todos los tratamientos notándose que hay una tendencia similar entre los tratamientos con 4 y 6 % de EO y que a partir del día 8 hasta el día 11 se observa un aumento sostenido en todos los tratamientos, siendo el control y el tratamiento con 2 % de EO los que mostraron el mayor valor de acidez no observándose diferencia significativa ($P > 0,05$) entre los mismos, seguido del tratamiento con 4 % de EO. El valor mínimo correspondió al tratamiento con 6 % de EO. También se observa una variación diferente del tratamiento con 2 % de EO respecto a los demás tratamientos hasta el día 8.

El aceite de trucha está compuesto principalmente por moléculas de triglicéridos seguido de fosfolípidos principalmente (Hixson *et al.*, 2014), los cuales a su vez están formados por la unión de 3 moléculas de ácidos grasos y una molécula de glicerol. La hidrólisis de los fosfolípidos y triglicéridos debido a las lipasas y las fosfolipasas causan la formación y un aumento gradual de ácidos grasos libres en las muestras. Estos compuestos sufren una oxidación adicional para producir compuestos de bajo peso molecular, responsables del sabor desagradable e indeseable del pescado (Rostamzad *et al.*, 2011) citados por Nowzari *et al.* (2013).

Valores de acidez hasta 7 % en el tratamiento control y entre 3,5 a 5 % de acidez aprox. en filetes de trucha refrigerada recubiertas con gelatina y quitosano al final del almacenamiento

de 16 días fueron reportados por Nowzari *et al.* (2013). En general, estos valores fueron más altos que los encontrados en el presente trabajo. Las diferencias podrían deberse a las características de la materia prima inicial, al período de almacenamiento, etc.

4.6.1.6. Ácido tiobarbitúrico

Los resultados de la formación de ácido tiobarbitúrico (TBA) en filetes de trucha durante el almacenamiento en refrigeración se muestran en la Tabla 34.

Tabla 34: Valores de TBA (mg MDA/Kg muestra) en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4°C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)					
	0	1	4	6	8	11
CONTROL	0,20 ± 0,007 ^a	1,06 ± 0,719 ^a	0,73 ± 0,020 ^a	1,52 ± 0,012 ^a	2,34 ± 0,009 ^a	2,64 ± 0,162 ^a
EO 2,0 %	0,01 ± 0,000 ^b	0,15 ± 0,050 ^a	0,04 ± 0,042 ^b	0,04 ± 0,044 ^b	1,60 ± 0,212 ^b	1,71 ± 0,010 ^b
EO 4,0 %	0,02 ± 0,020 ^b	0,06 ± 0,077 ^a	0,05 ± 0,062 ^b	0,02 ± 0,011 ^b	0,86 ± 0,068 ^c	0,62 ± 0,129 ^c
EO 6,0 %	0,03 ± 0,024 ^b	0,22 ± 0,166 ^a	0,04 ± 0,037 ^b	0,01 ± 0,001 ^b	0,69 ± 0,014 ^c	0,79 ± 0,279 ^c

^{a, b, c} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

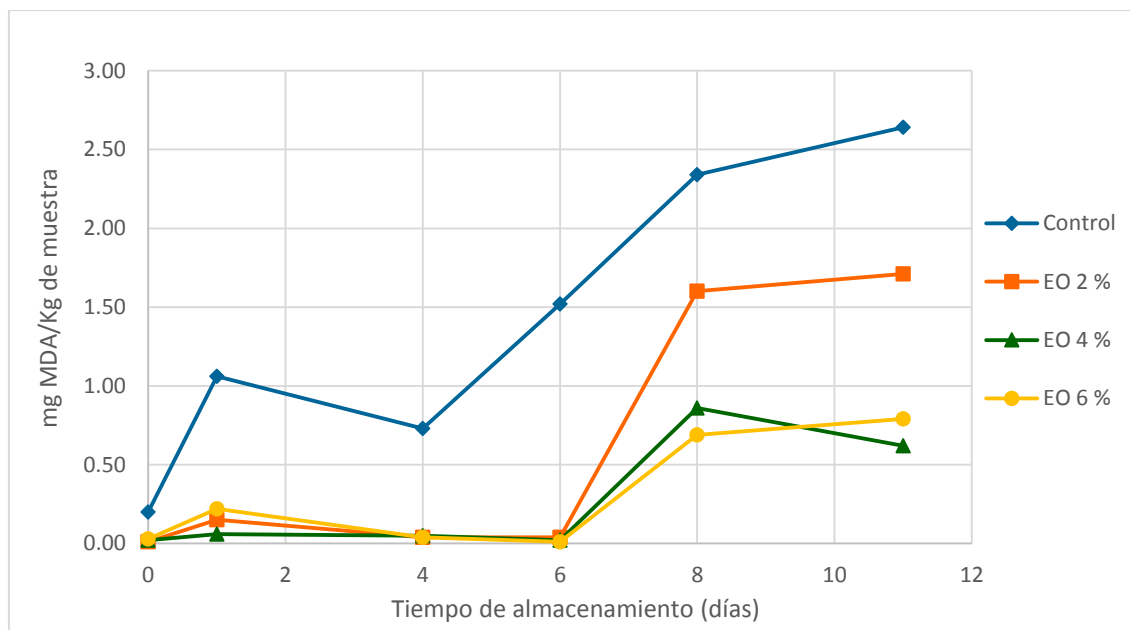


Figura 30: Variación de TBA en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración

En la Figura 30 se observa la variación de los valores de ácido tiobarbitúrico (TBA), notándose una tendencia similar entre todos los tratamientos, sin embargo los valores del tratamiento control son mayores respecto de los demás tratamientos quienes siguieron casi el mismo patrón hasta el día 6 donde los valores de TBA del tratamiento con 2 % de EO aumentan bruscamente y los del tratamiento con 4 y 6 % de EO también aumentan pero en menor proporción, observándose que los valores de TBA de estos tratamientos fueron los más bajos al final del período de almacenamiento. y que no hay diferencia significativa ($P > 0,05$) entre los mismos.

La cuantificación de TBA mide directamente la producción de malonaldehído, uno de los productos secundarios formados durante la oxidación de lípidos. El valor de TBA se ha utilizado ampliamente para estimar el grado de oxidación de los lípidos y la presencia de sustancias reactivas al TBA se debe a la segunda etapa de la autooxidación durante la cual los peróxidos son oxidados a aldehídos y cetonas (Badui, 2006). Al parecer, los polifenoles del EO estabilizan los hidroperóxidos impidiendo una mayor degradación a más formas oxidantes activas, como el malonaldehído (Wellwood y Cole, 2004; citados por Hernández *et al.*, 2009).

El TBA reacciona con el malonaldehído formando un producto coloreado, siendo la intensidad de éste proporcional al grado de oxidación del aceite. Se ha propuesto que el máximo valor de TBA que indica una *buen calidad* del pescado (congelado, refrigerado o

almacenado con hielo) es de 5 mg de equivalentes de MDA / kg de tejido, mientras que el *nivel consumible* de pescado puede ser de 8 mg de equivalentes de MDA / kg de tejido (Ibrahim Sallam, 2007, citado por Ojagh *et al.*, 2010). Todos los valores de TBA obtenidos fueron menores a 5 mg de equivalentes de MDA / kg de tejido.

Fadiloglu y Çoban (2018) reportaron valores similares de TBA en el día 12 de almacenamiento en truchas recubiertas con quitosano y sumac durante su almacenamiento en refrigeración. Por otro lado, Ojagh *et al.* (2010) reportaron valores incrementales de TBA en filetes de trucha recubiertas con quitosano y con aceite de canela pero inferiores a lo reportado en el presente trabajo en el día 16 de almacenamiento.

Por otro lado, Nowzari *et al.* (2010), reportaron valores más altos de TBA en filetes de trucha recubiertas y con películas compuestas y de doble capa, siendo el recubrimiento compuesto el tratamiento con menor valor de TBA (cerca de 4 mg de equivalentes de MDA / kg de tejido) y el tratamiento control el de mayor valor de TBA (8 mg de equivalentes de MDA / kg de tejido). Estos resultados fueron mayores a lo encontrado en el presente trabajo.

Hosseini *et al.* (2016) reportaron valores más bajos de TBA en filetes de trucha sin y con recubrimientos de aceite esencial de orégano, siendo los valores de TBA en filetes de trucha con aceite esencial menores a los valores reportados en filetes control y filetes recubiertos sólo con gelatina de pescado hasta el día 16 de almacenamiento.

4.6.1.7. Nitrógeno de bases volátiles totales (N-BVT)

Los valores de N-BVT de los filetes de trucha en almacenamiento en refrigeración se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35: Valores de nitrógeno de bases volátiles totales (mg N-BVT/100 g) en filetes de trucha durante el almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)					
	0	1	4	6	8	11
CONTROL	22,15 ± 0,474 ^a	21,14 ± 0,064 ^a	23,24 ± 0,198 ^a	22,97 ± 0,157 ^a	22,96 ± 0,118 ^a	25,51 ± 0,021 ^a
EO 2,0 %	21,17 ± 0,035 ^a	19,02 ± 0,396 ^b	21,87 ± 0,884 ^{a,b}	20,48 ± 0,856 ^a	23,07 ± 0,017 ^a	24,83 ± 0,856 ^a
EO 4,0 %	20,55 ± 0,863 ^a	22,18 ± 0,453 ^a	20,20 ± 0,375 ^b	20,20 ± 0,438 ^a	21,66 ± 0,269 ^b	21,94 ± 0,120 ^b
EO 6,0 %	21,54 ± 0,438 ^a	21,13 ± 0,035 ^a	22,46 ± 0,014 ^a	21,50 ± 0,403 ^a	21,56 ± 0,197 ^b	20,19 ± 0,313 ^b

^{a,b} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

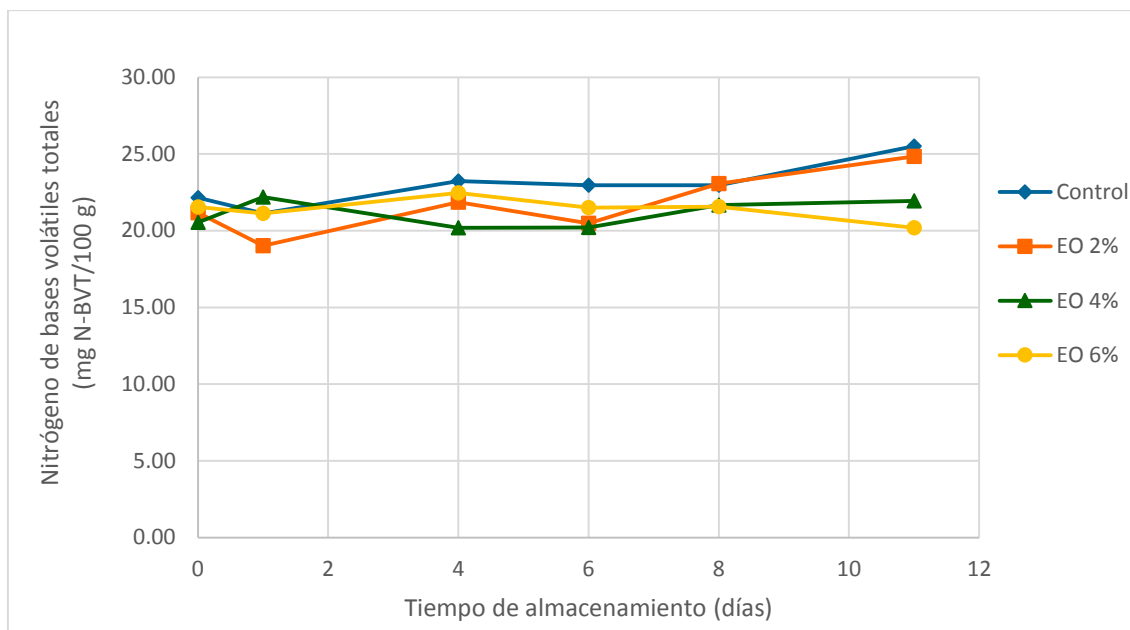


Figura 31: Variación de N-BVT en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración

En la Tabla 35 se observa que en el día 0 el tratamiento control mostró el mayor valor de N-BVT. Este valor fluctuó hasta mantenerse constante entre los días 6 y 8 y luego se incrementó notablemente hasta el día 11. Los valores de N-BVT de los filetes de trucha con 2 % de EO aumentaron sostenidamente desde el día 6 hasta el día 11, donde no se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre ambos tratamientos. El efecto del EO se va mostrando a partir del tratamiento con 4 % de EO, puesto que se observa un aumento de las N-BVT del día 0 al día 1 y luego se observa un disminución y un leve aumento hasta el día 11; similar comportamiento se observa en el tratamiento con 6 % de EO donde el N-BVT se incrementan desde el día 0 al día 4 y luego ocurre una disminución hasta el final del almacenamiento. No se observó diferencia significativa ($P > 0,05$) entre ambos tratamientos al final de la evaluación. Esto pudo haber ocurrido porque a mayores concentraciones de EO en el recubrimiento se inhibió la acción bacteriana causantes de la descomposición de los filetes. Es decir, hubo una reducción más rápida de la población bacteriana o disminución de la capacidad de las bacterias para la desaminación oxidativa de compuestos nitrogenados no proteicos o de ambos (Fan *et al.*, 2008, citado por Jouki *et al.*, 2014).

En la Figura 31 se observa la variación de las N-BVT en todos los tratamientos, notándose una diferenciación más acentuada entre grupos de valores (control y recubrimiento con 2% de EO y recubrimiento con 4 y 6 % de EO) a partir del día 8 de almacenamiento.

La cantidad de N-BVT es uno de los índices más usados para determinar la frescura de los pescados. La actividad de las bacterias que dañan el pescado y también de las enzimas endógenas presente en el tejido de los peces aceleran el proceso de deterioro del tejido muscular, consecuentemente esto conduce a un aumento de los valores de N-BVT (Jouki *et al.*, 2014).

Los niveles de N-BVT presentes en el pescado son importantes porque inciden directamente en la calidad del mismo. El catabolismo bacterial de aminoácidos en el músculo de pescado resulta en la acumulación de amonio, monoetilamina, dimetilamina, trimetilamina, y otras bases volátiles, las cuales imparten característicos sabores extraños al pescado (Goulas y Kontominas, 2005; citados por Nowzari *et al.*, 2013).

Según el reglamento de la CE (ECC 95/149) se considerará impropio para el consumo humano cuando se excedan los límites de N-BVT de 35 mg de nitrógeno/ 100 g de carne en pescado de la familia de salmónidos. Giménez *et al.* (2002), citados por Jouki *et al.* (2014) propusieron un valor de 25 mg N/ 100 g como el nivel de N-BVT que marca el inicio del deterioro de filetes de trucha. Sólo los tratamientos control y con 2 % de EO excedieron el nivel de N-BVT establecido por Giménez *et al.* (2002). Respecto a lo mencionado, ninguno de los tratamientos excedió el nivel establecido por la CE de N-BVT de 35 mg de nitrógeno/ 100 g de carne.

Volpe *et al.* (2015) evaluaron el efecto de la incorporación de carragenano y aceite esencial de limón como recubrimiento de filetes de trucha, reportando que al final del almacenamiento (15 días), los valores de N-BVT de los filetes de trucha no recubiertos alcanzaron los 40 mg N/ 100 g muestra, mientras que en los filetes recubiertos sólo con carragenano estos valores fueron cercanos a 30 mg N/ 100 g muestra y en los filetes recubiertos con carragenano y aceite esencial los valores de N-BVT fueron cercanos a 20 mg N/ 100 g muestra.

Por otro lado, Hosseini *et al.* (2016) determinaron que el valor de las N-BVT de los filetes de trucha del tratamiento control a los 12 días de almacenamiento fueron de 32,90 mg N/ 100 g músculo, mientras que las muestras con recubrimiento de gelatina y de gelatina con aceite esencial de orégano exhibieron valores de 18,90 y 16,56 de N-BVT/ 100 g de muestra.

4.6.2. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS

A continuación se muestran los resultados de los ensayos microbiológicos realizados en el momento de recepción de los filetes de trucha.

Tabla 36: Resultados microbiológicos de los filetes de trucha

Ensayo	Resultado
Aerobios mesófilos	1390 UFC/ g
<i>Salmonella</i> spp.	Ausencia/25 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	< 10 UFC/g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausencia/25 g
<i>Escherichia coli</i>	0 NMP /100g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	< 3 NMP/ g
<i>Vibrio cholerae</i>	Ausencia/25 g

En la Tabla 36 se observa los valores iniciales de las pruebas microbiológicas realizadas en los filetes de trucha en el momento de su recepción. Como se puede observar el filete de trucha inició con una carga de aerobios mesófilos la cual fue evaluada durante el almacenamiento en refrigeración. Los análisis de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio cholerae* estuvieron dentro del límite permitido establecido como criterio de calidad por SANIPES.

4.6.2.1. Recuento de aerobios mesófilos

El recuento de aerobios mesófilos en los filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración se muestra en la Tabla 37.

Tabla 37: Recuento (UFC/g) de aerobios mesófilos en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)					
	0	1	4	6	8	11
CONTROL	7400 ^a	9400 ^a	20000 ^a	370000 ^a	4600000 ^a	35000000 ^a
EO 2%	3600 ^{b,c}	6500 ^b	23000 ^b	400000 ^a	3900000 ^b	31000000 ^b
EO 4%	3700 ^b	4500 ^c	12000 ^c	250000 ^b	750000 ^c	2400000 ^c
EO 6%	3100 ^c	3700 ^d	11000 ^c	220000 ^b	720000 ^c	1400000 ^c

^{a,b,c} Señala la diferencia significativa entre filas ($\alpha = 0,05$) según Tukey

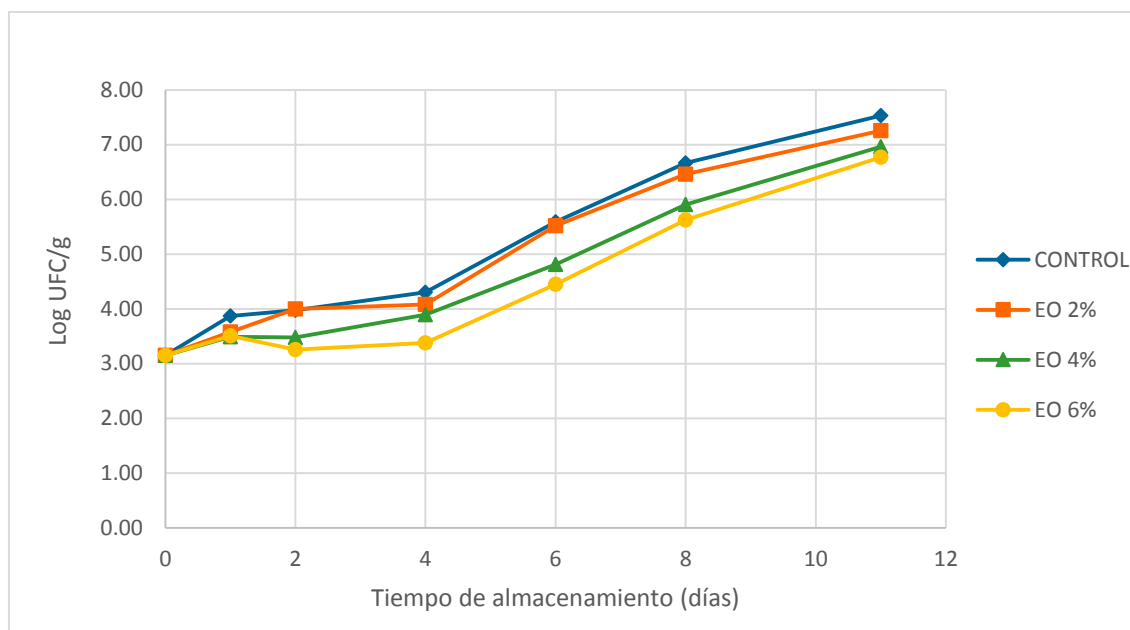


Figura 32: Variación del recuento de aerobios mesófilos en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración

En la Tabla 37 se observa el recuento de aerobios mesófilos en el tratamiento control, el cual alcanza un valor máximo en el día 11, el cual a su vez fue el mayor valor entre todos los tratamientos. El tratamiento con 2 % de EO mostró menores recuentos que el tratamiento control hasta el día 4, no observándose diferencia significativa ($P > 0,05$) en el día 6 y, a partir de este día, se observó menores recuentos hasta el día 11 donde se observó diferencia significativa ($P < 0,05$) con el tratamiento control. El tratamiento con 4 % de EO mostró recuentos que aumentaron de manera consecutiva un ciclo hasta el día 6, pero a partir de este día se observa un incremento hasta el día 8 manteniendo el mismo ciclo, y luego un aumento hasta el día 11. El tratamiento con 6 % de EO mostró un comportamiento similar. Desde el día 4 no se observó diferencia significativa entre ambos tratamientos pero en los días 8 y 11 los recuentos fueron de un ciclo menor que los tratamientos control y con 2 % de EO.

En la Figura 32 se observa el crecimiento exponencial de los microorganismos aerobios mesófilos, el cual es más evidente a partir del día 4 hasta el día 11 del almacenamiento. De acuerdo a los límites microbiológicos establecidos por la autoridad sanitaria pesquera, SANIPES, el máximo nivel admisible de recuento de aerobios mesófilos permitido para pescado refrigerado es de 10^6 UFC/g. El recuento de aerobios alcanzó este valor límite en el día 8 en los tratamientos control y con 2 % de EO mientras que en los tratamientos con 4 y 6 % de EO se alcanzó este valor límite cuando se evaluó el día 11 de almacenamiento.

4.6.2.2. Detección de *Salmonella* spp.

Los resultados para la detección de la bacteria *Salmonella* en los filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración reportaron AUSENCIA/25 g en todos los tratamientos evaluados. Este resultado se correlaciona con los criterios microbiológicos de calidad establecidos por la autoridad sanitaria pesquera, SANIPES, donde se indica que el límite mínimo de *Salmonella* spp. para pescado refrigerado es de AUSENCIA/ 25 g.

Existen más de 2 300 tipos de *Salmonella* spp. las que se encuentran principalmente en el tracto intestinal y las heces de animales y en los huevos de las aves. La contaminación del pescado y los productos pesqueros pueden deberse a unas prácticas deficientes de manipulación e higiene. Los productos cocidos se pueden contaminar tras la elaboración con materias primas sin cocer o a causa de los empleados y, cuando no hay microflora que compita con las bacterias, pueden constituir un producto de alto riesgo si se permite que proliferen, por ejemplo, por una temperatura indebida. El consumo de pescado y marisco crudo o insuficientemente cocido provocará dolor de estómago, diarrea, náuseas, escalofríos, fiebre y dolor de cabeza. Sin embargo, en la mayor parte de la bibliografía se indica que el pescado es un vehículo mucho menos común que otros alimentos representando una pequeña proporción del número total de casos de *Salmonella* (FAO, 2009).

4.6.2.3. Recuento de *Staphylococcus aureus*

El recuento de *Staphylococcus aureus* (UFC/g) en los filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración se muestra en la Tabla 38.

Tabla 38: Recuento (UFC/g) de *Staphylococcus aureus* en filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración (3 – 4 °C)

TRATAMIENTO CON EXTRACTO DE ORÉGANO	TIEMPO DE ALMACENAMIENTO (DÍAS)						
	0	1	4	6	7	8	11
CONTROL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
EO 2%	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
EO 4%	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
EO 6%	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10

El recuento de *Staphylococcus aureus* en todas las muestras desde el inicio hasta el final del período de almacenamiento fue < 10 UFC/g. Este valor está debajo del límite mínimo de 10² UFC/g establecido como criterio de calidad por la autoridad sanitaria pesquera, SANIPES, para productos hidrobiológicos refrigerados. El efecto del recubrimiento con EO sobre la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* no pudo ser evaluado debido a que no hubo un recuento mayor al inicio del período de almacenamiento en los tratamientos.

Staphylococcus aureus se encuentra en la piel, la nariz, la garganta y los cortes infectados de los seres humanos. Es una bacteria altamente vulnerable a la destrucción por tratamiento térmico y casi todos los agentes desinfectantes. Por lo tanto, la presencia de esta bacteria o sus enterotoxinas en alimentos procesados o en equipos de procesamiento de alimentos es generalmente una indicación de un saneamiento deficiente.

Unas prácticas deficientes de higiene personal pueden dar lugar a que la bacteria se transmita al pescado y los productos pesqueros. La bacteria prolifera rápidamente a temperaturas altas y produce una toxina que ocasiona fuertes náuseas, espasmos abdominales, vómitos y diarrea si el pescado o los productos pesqueros se consumen crudos o insuficientemente cocidos, o si los productos cocidos han sufrido contaminación cruzada. La bacteria también puede producir toxinas resistentes al calor (FAO, 2009).

4.6.2.4. Identificación de *Listeria monocytogenes*

Los resultados de identificación de *Listeria monocytogenes* en los filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración muestran AUSENCIA de la bacteria en todos los tratamientos durante toda la etapa de evaluación. Por esta razón, no se pudo observar el efecto del recubrimiento con extracto de orégano sobre la inhibición del crecimiento de esta bacteria.

Si bien es cierto que el análisis para la detección de la bacteria *Listeria monocytogenes*, no está comprendido en los criterios de calidad para pescado fresco refrigerado establecidos por SANIPES, en el presente trabajo se evaluó como un mecanismo de control y debido a que existe el riesgo de prevalencia.

La bacteria *Listeria monocytogenes* se transmite al pescado y los productos pesqueros mediante prácticas deficientes de manipulación e higiene, incluida la contaminación cruzada siendo los síntomas de intoxicación lo siguiente: fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, de espalda y abdominal, y diarrea (FAO, 2009).

Listeria monocytogenes es una bacteria Gram positiva que se encuentra ampliamente distribuida tanto en el medio agrario (suelo, plantas, forraje en silos, materia fecal, aguas residuales, agua), como en la acuicultura y los ambientes de elaboración de alimentos, por lo que se considera un patógeno ubiquo. *Listeria monocytogenes* es resistente a varias condiciones medioambientales tales como altas concentraciones de sal o acidez. Asimismo, crece en condiciones de baja concentración de oxígeno y a temperaturas de refrigeración y sobrevive por largos períodos en el medio ambiente, en los alimentos, en las plantas de elaboración y durante el almacenamiento refrigerado (Intesal, 2016).

4.6.2.5. Enumeración de *Escherichia coli*

La enumeración de *Escherichia coli* en los filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración se muestran en la Tabla 39.

En la Tabla 39 se observa el recuento de *Escherichi coli* en los filetes del tratamiento control, el cual se incrementó desde el día 1 hasta el día 11 de almacenamiento, alcanzando un recuento final de $4,5 \times 10^2$ NMP/100g, un valor por encima del límite máximo establecido por SANIPES. En los tratamientos con los recubrimientos y EO el recuento de estas bacterias fue de 0 NMP/100g desde el inicio del período de evaluación. Este valor esta por debajo del límite mínimo establecido por SANIPES que es de 1 NMP/g.

Min y Oh (2009) reportaron que el recubrimiento de filetes de bagre con gelatina y aceite esencial de tomillo a varias concentraciones, se tradujo en una disminución en el crecimiento de la bacteria *E. coli* O157:H7 obteniendo los mayores efectos inhibitorios con el recubrimiento de gelatina de bagre que contenía 2, 0 % (v / v). En este caso no se pudo evaluar el efecto del EO sobre la inhibición del crecimiento de *Escherichi coli* en los filetes pues no se detectó presencia en la etapa inicial del almacenamiento o en la muestra inicial.

La bacteria *Escherichia coli* se encuentra en el tracto intestinal de animales y seres humanos, y en el agua sin clorar. Algunas cepas de la bacteria pueden ocasionar enfermedades humanas. La contaminación cruzada, unas prácticas deficientes de manipulación e higiene y el contacto con agua contaminada dan lugar a la presencia de la bacteria en el pescado y el marisco. La bacteria también se puede acumular en moluscos como las ostras. El consumo de productos crudos o insuficientemente cocidos, o de productos cocidos que hayan sufrido contaminación cruzada puede provocar una intoxicación alimentaria (FAO, 2009).

4.6.2.6. Enumeración de *Vibrio parahaemolyticus*

Los resultados de enumeración de la bacteria *Vibrio parahaemolyticus* en los filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración fue < 3 NMP/ g en todos los tratamientos evaluados. Estos resultados están acordes con los límites mínimos establecidos para pescado refrigerado por la Autoridad Sanitaria, SANIPES.

Como no se detectó presencia de la bacteria en la etapa inicial de la evaluación, no se pudo determinar el efecto de la incorporación de EO en el recubrimiento frente al crecimiento de *Vibrio parahaemolyticus*, sin embargo, estos resultados son positivos puesto que los filetes fueron seguros para su consumo según los criterios de calidad de la norma.

Determinadas cepas patógenas de *Vibrio parahaemolyticus* están presentes de manera natural y habitual en productos marinos, sobre todo en moluscos bivalvos como ostras, mejillones y almejas. También se pueden encontrar en crustáceos y peces, y en productos

como el ceviche y el sushi. El consumo de productos contaminados, crudos o insuficientemente cocidos, provoca diarrea, náuseas, vómitos, dolor de cabeza, fiebre y escalofríos (FAO, 2009).

4.6.2.7. Aislamiento e identificación de *Vibrio cholerae*

Los resultados del aislamiento e identificación de la bacteria *Vibrio cholerae* en los filetes de trucha durante su almacenamiento en refrigeración fue de AUSENCIA/25 g en todos los tratamientos evaluados,. Estos resultados están acordes con los límites establecidos para pescado refrigerado establecidos por SANIPES, donde el límite mínimo aceptable es de AUSENCIA/ 25 g.

Como no se detectó presencia de la bacteria en el momento de recepción de la materia prima o al inicio de la evaluación, no se pudo determinar el efecto de la incorporación de EO en el recubrimiento frente al crecimiento de *Vibrio cholerae*, sin embargo, estos resultados son positivos puesto que los filetes fueron seguros para su consumo según los criterios de calidad de la norma.

V. CONCLUSIONES

1. Los niveles óptimos de las variables para la obtención de películas comestibles a partir de gelatina de piel de perico con resistencia a la tracción de 9,5 MPa y elongación al corte de 150 % fueron: gelatina 3,5 %, glicerol 0,138 g glicerol/ g gelatina y temperatura de elaboración de 58 °C.
2. La incorporación de extracto de orégano, EO, en concentraciones de 2, 4, 6 y 8 % en la formulación de las películas comestibles causó el incremento del espesor de 0,050 – 0,063 mm desde el tratamiento control hasta la película con 6 % de EO y, respecto a las propiedades mecánicas lo siguiente: el incremento de la elongación al corte de 154 – 370 % desde el tratamiento control hasta la película con 6 % de EO y la disminución de la resistencia a la tracción de 9,33 – 0,91 MPa desde el tratamiento control hasta la película con 8 % de EO. En el caso del espesor y la elongación al corte, la adición de 8 % de EO causó la disminución de ambos valores.
3. Respecto a las propiedades fisicoquímicas, los parámetros de color de las películas variaron respecto a la concentración del EO incorporado en la formulación en función al color del extracto de orégano. El índice de opacidad fluctuó entre 0,79 – 1,11 y se observó D.S entre la películas con 0, 4 y 8 % de EO. La humedad fluctuó entre 10,69 – 12,58 % pero no se observó D.S entre todos los tratamientos. La solubilidad de las películas disminuyó con la incorporación del EO desde 98,92 – 91,83 %, observándose D.S entre las películas con 0, 2, 4 y 8 % de EO.
4. Respecto a las propiedades de barrera, el incremento del EO causó la fluctuación de los valores de permeabilidad al vapor de agua de 0,061 – 0,070 g-mm/m²-h-kPa, no observándose D.S entre los mismos. La permeabilidad al oxígeno de las películas disminuyó de 2,231 a un valor menor que 0,151 cm³µm/m²-día-kPa con el incremento del EO en la formulación, observándose D.S entre las películas con 0, 2, 4 y 8 % de EO.

5. Respecto a las propiedades antioxidantes y antimicrobianas, la incorporación de EO resultó en un incremento de la cantidad de polifenoles extraíbles de 30,74 – 98,98 mg eq. ácido gálico/ g de película así como un incremento de la capacidad antioxidante de las películas de 0,77 – 2,71 eq. mM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /mg de película, observándose D.S entre todos los tratamientos de ambos análisis. Así mismo, se observó que las películas con 2, 4, 6 y 8 % de EO ejercieron actividad antimicrobiana sobre las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Proteus vulgaris*; mientras que las películas con 6 y 8 % de EO inhibieron el crecimiento de *Enterococcus faecalis* y *Salmonella entérica*. Sólo la película con 8 % de EO inhibió el crecimiento de *Shigella spp.*

6. Según los parámetros de calidad de las pruebas fisicoquímicas y microbiológicas, los filetes de trucha del tratamiento control y los filetes recubiertos con 2 % de EO tuvieron una aceptabilidad hasta los 8 días de almacenamiento en refrigeración (temperatura de 3 – 4 °C), mientras que los filetes recubiertos con 4 y 6 % de EO mostraron una aceptabilidad hasta los 11 días en el almacenamiento en refrigeración (temperatura de 3 – 4 °C).

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar el estudio de optimización de la obtención de películas comestibles a partir de los subproductos de otras especies pesqueras comerciales cultivadas como alternativa a las películas de gelatina de perico.
2. Evaluar la obtención de películas comestibles de gelatina de piel de perico con la incorporación de otras matrices agroalimentarias como almidón, hidrocoloides, ceras, etc. y caracterizarlas para evaluar su alternativa de utilización.
3. Evaluar el estudio y la incorporación de otros extractos naturales nativos que exhiban propiedades antioxidantes y antimicrobianas así como otras propiedades bioactivas en la formulación de películas comestibles.
4. Evaluar el efecto del recubrimiento con extracto de orégano en otras especies pesqueras comerciales de valor agregado así como en productos cárnicos.
5. Evaluar el efecto del recubrimiento de gelatina de piel de perico en la preservación de matrices agroalimentarias como frutas y verduras.
6. Elaborar un estudio técnico-económico de la producción de películas comestibles y recubrimientos a partir de gelatina de piel de perico con la finalidad de evaluar su factibilidad en la industria peruana.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADEX (Asociación de exportadores). 2018. Se recupera exportación de pesca para CHD (en línea). Perú. Consultado 8 de nov. 2018. Disponible en <http://www.adexperu.org.pe/notadeprensa/se-recupera-exportacion-de-pesca-para-chd/>.
2. Amarowicz, R; Zegarska, Z; Rafałowski, R; Pegg, R; Karamac, M; Kosinska, A. 2009. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram. *Europe Journal Lipid Science*. 111: 1111-1117.
3. Andrade-Mahecha, M; Tapia-Blácido, D; Menegalli, F. 2012. Development and optimization of biodegradable films based on achira flour. *Carbohydrate Polymers* 88: 449-458.
4. AOAC. 2000. Official Methods of the Association of Official Agricultural Chemist's International. 17th. Edition. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C. 1298 p.
5. ASTM F-1249. 2013. Standard Test Method for Water Vapor Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Modulated Infrared Sensor. ASTM International, West Conshohocken, PA.
6. ASTM D-3985. 2010. Standard Test Method for Oxygen Gas Transmission Rate Through Plastic Film and Sheeting Using a Coulometric Sensor. ASTM International, West Conshohocken, PA.
7. Ayala, J. y Pardo, R. 1995. Optimización por diseños experimentales con aplicaciones en Ingeniería. CONCYTEC, Lima.
8. Barriga, M; Salas, A; Aranda, D; Castro, C; Albrecht, M; Solari, A; Arpi, E. 2012. Información nutricional sobre algunas especies comerciales del mar peruano. Instituto Tecnológico Pesquero del Perú. Callao. 75 p.
9. Bergo, P; Moraes, I; Sobral, P. 2013. Effects of plasticizer concentration and type on moisture content in gelatin films. *Food Hydrocolloids* 32, 412-415.
10. Bonilla, J; Atarés, L; Vargas, M; Chiralt, A. 2012. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering* 110 (2): 208-213.

11. Cai, Y; Luo, Q; Sun, M; Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences* 74: 2157-2184.
12. Carvalho, R; Grosso, C; Sobral, P. 2008. Effect of Chemical Treatment on the Mechanical Properties, Water Vapour Permeability and Sorption Isotherms of Gelatin-based Films. *Packaging Technology and Science*. 21: 165-169.
13. Chen, Y-C; Nguyen, J; Semmens, K; Beamer, S; Jaczynski, J. 2008. Chemical changes in omega-3-enhanced farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during abusive-temperature storage. *Food Control*. 19 (6): 599–608.
14. Chiou, B-S; Avena-Bustillos, R; Bechtel, P; Jafri, H; Narayan, R; Imama, S; Glenn, G; Orts, W. 2008. Cold water fish gelatin films: Effects of cross-linking on thermal, mechanical, barrier, and biodegradation properties. *European Polymer Journal* 44, 3748-3753.
15. Chiou, B-S; Avena-Bustillos, R; Bechtel, P; Imam, S; Glenn, G; Orts, W. 2009. Effects of drying temperature on barrier and mechanical properties of cold-water fish gelatin films. *Journal of Food Engineering* 95: 327-331.
16. Choubert, G; Baccaudaud, M. 2006. Colour changes of fillets of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* W.) fed astaxanthin or canthaxanthin during storage under controlled or modified atmosphere. *LWT-Food Science and Technology*. 39 (10): 1203-1213.
17. Cuq, B; Gontard, N; Cuq, J-L; Guilbert, S. 1996. Functional Properties of Myofibrillar Protein-based Biopackaging as Affected by Film Thickness. *Journal Of Food Science*. 61(3): 580-584.
18. Cuq, B; Gontard, N; Cuq, J-L; Guilbert, S. 1997. Selected Functional Properties of Fish Myofibrillar Protein-Based Films As Affected by Hydrophilic Plasticizers. *J. Agric. Food Chem*. 45, 622-626.
19. Cuq, B; Gontard, N; Guilbert, S. 1998. Proteins as Agricultural Polymers for Packaging Production Review. *Cereal Chem*. 75(1):1-9.
20. Da Silva E Silva, N; Pino, E-J; Da Silva Araújo, C; Sarkis, M; Henriques, L. 2018. Development and optimization of biodegradable fish gelatin composite film added with buriti oil. *CyTA – Journal of Food*. 16 (1): 340-349.
21. Dangaran, K; Tomasula, P; Qi, P. 2009. Structure and Function of Protein-Based Edible Films and Coatings. En: M.E. Embuscado and K.C. Huber. *Edible Films and Coatings for Food Application*. Editorial Springer Science+Business Media. 25-56 p.

22. Debeaufort, F; Voilley, A. 2009. Lipid-Based Edible Films and Coatings. En: Embuscado, M; Huber, K. Edible Films and Coatings for Food Applications. Editorial Springer Science+Business Media. 135-168 p.
23. Diario Oficial de las Comunidades Europeas (95/ 149/CE) por la que se establecen los valores límite de nitrógeno básico volátil total NBVT de determinadas categorías de productos pesqueros y los métodos de análisis que deben utilizarse. 8 de marzo de 1995.
24. Fadiloglu, E; Çoban, E. 2018. Effects of chitosan edible coatings enriched with sumac on the quality and the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792) fillets. Journal Of food Safety 12545, 1: 8.
25. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2009. Directrices para la inspección del pescado basada en los riesgos (en línea). Roma. Consultado 21 feb. 2019. Disponible en <http://www.fao.org/3/a-i0468s.pdf>
26. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2010. Species fact sheets. *Coryphaena hippurus* (Linnaeus, 1758) (en línea). Roma. Consultado 13 ago. 2018. Disponible en <http://www.fao.org/fishery/species/3130/es>
27. FDA. Aerobic Plate Count. A- D. Bacteriological Analytical Manual on Line. FDA. January 2001. Edition 8, Revision A, Chapter 3. 1995.
28. Fujie, A; Yoshida, K; Oba, K. 2003. Antioxidative Phenolic Acids from Oregano (*Origanum vulgare* L.) Leaves. Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi 50 (9):404-410.
29. Gálvez, L; Christopher, A; Sarkar, D; Shetty, K; Chirinos, R; Campos, D. 2017. Phenolic composition and Evaluation of the Antimicrobial Activity of Free and Bound Phenolic Fractions from a Peruvian Purple Corn (*Zea mays* L). Journal of Food Science 12, 2968 – 2976.
30. García, M; Pinotti, A , Martino, M; Zaritzky, N. 2009. Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. En: M.E. Embuscado; K.C. Huber. Edible Films and Coatings for Food Applications. Editorial Springer Science+Business Media. 169 – 209 p.
31. Gómez-Estaca, J; Giménez, B; Montero, P; Gómez-Guillén, M.C. 2009^a. Incorporation of antioxidant borage extract into edible films based on sole skin gelatin or a commercial fish gelatin. Journal of Food Engineering 92 (1): 78–85.
32. Gómez-Estaca, J; Bravo, L; Gómez-Guillén, MC; Alemán, A; Montero, P. 2009^b. Antioxidant properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films induced by the addition of oregano and rosemary extracts. Food Chemistry 112 (1): 18–25.

33. Gómez-Estaca, J; Montero, P; Fernández-Martín, F; Alemán, A; Gómez-guillén, MC. 2009^c. Physical and chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films with added aqueous oregano and rosemary extracts. *Food Hydrocolloids* 23 (1): 1334-1341.
34. Gómez-Guillén, MC; Turnay, J; Fernández-Díaz, MD; Ulmo, N; Lizarbe, MA; Montero, P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids* 16 (1): 25-34.
35. Gómez-Guillén, MC; Ihl, M; Bifani, V; Silva, A; Montero, P. 2007. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae Turcz*). *Food Hydrocolloids*. 21 (7): 1133-1143.
36. Gómez-Guillén, MC; Giménez, B; López-Caballero, ME; Montero, MP. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids* 25(8): 1813-1827.
37. Gontard, N; Guilbert, S; Cuq, J-L. 1993. Water and Glycerol as Plasticizers Affect Mechanical and Water Vapor Barrier Properties of an Edible Wheat Gluten Film. *Journal of Food Science*. 58, 206-211.
38. Guilbert, S; Cuq, B; Gontard, N. 1997. Recent innovations in edible and/or biodegradable packaging materials. *Food Additives & Contaminants*, 14 (6-7): 741-751.
39. Gutiérrez, H; Vara, R de la. 2008. Análisis y diseño de experimentos. 2 ed. Distrito Federal, MX. McGraw-Hill Interamericana. 545 p.
40. Han, J.H. 2014. Edible Films and Coatings: A Review. En: Han, J.H. *Innovations in Food Packaging* Academic Press. 2 edición. 213-253 p.
41. Hernández-Hernández, E; Ponce-Alquicira, E; Jaramillo-Flores, ME; Guerrero Legarreta, I. 2009. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) and oregano (*Origanum vulgare L.*) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science* 8 (2): 410-417.
42. Hixson, S; Parrish, C; Anderson, D. 2014. Changes in Tissue Lipid and Fatty Acid Composition of Farmed Rainbow Trout in Response to Dietary Camelina Oil as a Replacement of Fish Oil. *Lipids*. 49:97–111.
43. Hoque, S, Benjakul, S; Prodpran, T. 2010. Effect of heat treatment of film-forming solution on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Journal of Food Engineering* 96: 66-73.
44. Hoque, S, Benjakul, S; Prodpran, T. 2011^a. Effects of partial hydrolysis and plasticizer content on the properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin. *Food Hydrocolloids*. 25: 82-90.

45. Hoque, S, Benjakul, S; Prodpran, T. 2011^b. Properties of film from cuttlefish (*Sepia pharaonis*) skin gelatin incorporated with cinnamon, clove and star anise extracts. *Food Hydrocolloids*. 25: 1085-1097.
46. Hosseini, S; Rezaei, M; Zandi, M; Ghavi, F. 2016. Effect of Fish Gelatin Coating Enriched with Oregano Essential Oil on the Quality of Refrigerated Rainbow Trout Fillet. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. Accepted manuscript. 1-15.
47. Illanes, J. 2004. Envases flexibles plásticos: uso y aplicación en la industria alimentaria. Tesis para obtener la licenciatura en Ingeniería de Alimentos. Universidad Austral de Chile; Valdivia; Chile.
48. INTESAL. 2016. Manual sobre medidas de prevención y control de *Listeria monocytogenes* para la industria salmonera. Primera versión. Chile
49. Jongjareonrak, A; Benjakul, S; Visessanguan, W; Prodpran, T; Tanaka, M. 2006. Characterization of edible films from skin gelatin of brownstripe red snapper and bigeye snapper. *Food Hydrocolloids*. 20(4): 492–501.
50. Jongjareonrak, A; Benjakul, S; Visessanguan, W; Tanaka, M. 2008. Antioxidative activity and properties of fish skin gelatin films incorporated with BHT and α -tocopherol. *Food Hydrocolloids* 22: 449-458.
51. Jouki, M; Yazdi, F; Mortazavi, S; Koocheki, A; Khazaei, N. 2014. Effect of quince seed mucilage edible films incorporated with oregano or thyme essential oil on shelf life extension of refrigerated rainbow trout fillets. *International Journal of Food Microbiology* 174: 88–97.
52. Kahkonen, M; Hopia, A; Vuorela, H; Rauha, J-P; Pihlaja, K; Kujala, T; Heinonen, M. 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal Agriculture Food Chemistry* 47 : 3954-3962.
53. Kakaei, S; Shahbazi, Y. 2015. Effect of chitosan-gelatin film incorporated with ethanolic red grape seed extract and *Ziziphora clinopodioides* essential oil on survival of *Listeria monocytogenes* and chemical, microbial and sensory properties of minced trout fillet. *LWT - Food Science and Technology* 72: 432-438.
54. Karim, AA; Bhat, R. 2009. Fish gelatin: Properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids* 23(3): 563-576.
55. Karimi, A; Min, B; Brownmiller, C; Lee, S-O. 2015. Effects of Extraction Techniques on Total Phenolic Content and Antioxidant Capacities of Two Oregano Leaves. *Journal of Food Research*. 4 (1): 112-123.

56. Kavooosi, G; Rahmatollahi, A; Mahdi, S; Mohammadi, A. 2014. Effects of essential oil on the water binding capacity, physicochemical properties, antioxidant and antibacterial activity of gelatin. *Films*. 2014. *Food Science and Technology*. 57: 556-561.
57. Kozłowska, M; Laudy, A; Przybył; Ziarno, M; Majewska, E. 2015. Chemical composition and antibacterial activity of some medicinal plants from lamiaceae family. *Acta Poloniae Pharmaceutica In Drug Research*, 72 (4): 757-767.
58. Krochta, JM.1997. Edible protein films and coating. En: S, Damodaran; A, Paraf. *Food proteins and their applications*. 1 edición. Editorial CRC Press. 529-550 p.
59. Krochta, JM. 2002. Protein as Raw Materials for Films and Coatings: Definitions, Current Status and Opportunities. En: A. Gennadios. *Protein-based Films and coatings*. Editorial CRC Press. 1- 41 p.
60. Lacroix, M; Cooksey, K. 2005. Edible films and coatings from animal-origin proteins. En: J. Han. *Innovations in Food Packaging*. Editorial Elsevier. 301- 312 p.
61. Lacroix, M; Dang, K.D. 2014. Edible Coating and Film Materials: Proteins. En: J. Han. 2 edición. *Innovations in Food Packaging*. Editorial Elsevier. 277-304 p.
62. Lieberman, R; Guilbert, G. 1973. Gas permeation of collagen films as affected by cross-linkage, moisture, and plasticizer content. *Journal Polymer Science*. 41: 33-43.
63. Limpisophon, K; Tanaka, M; Weng, W; Abe, S; Osako, K. 2009. Characterization of gelatin films prepared from under-utilized blue shark (*Prionace glauca*) skin. *Food Hydrocolloids* 23: 1993-2000.
64. Lin, J; Wang Y; Pan, D, Sun, Y, Ou, C; Cao, J. 2017. Physico-mechanical properties of gelatin films modified with Lysine, Arginine and Histidine. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1-6.
65. Manual de ensayos no acreditados del Laboratorio de Físico-Química LABS-ITP. 2004. Instituto Tecnológico de la Producción.
66. Manual de ensayos acreditados del Laboratorio de Físico-Química LABS-ITP. 2018. Instituto Tecnológico de la Producción.
67. Martins, N; Barros, L; Santos-Buelga, C; Henriques, M; Silva, S; Ferreira, I. 2014. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. *Food Chemistry* 158: 73-80.
68. McHugh, H; Avena-Bustillos, F; Krochta, J.M. 1993. Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of Thickness Effects. *Journal Of Food Science*. 58(4): 899-903.

69. Min, B; Oh, J. 2009. Antimicrobial Activity of Catfish Gelatin Coating Containing Origanum (*Thymus capitatus*) Oil against Gram-Negative Pathogenic Bacteria. *Journal Of Food Science*. 74(4): 143-148.
70. Montgomery, DC. 2011. *Diseño y análisis de experimentos*. 2 ed. Distrito Federal, MX. Limusa. 686 p.
71. Nelson, D; Cox, M. 2005. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 4 edición. Barcelona, Editorial Omega. 1264 p.
72. Nieto, G; Ros, G; Castillo, J. 2018. Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis, L.*): A Review. *Medicines*, 5, 98.
73. Nowzari, F; Shábanpour, B; Ojagh, S. 2013. Comparison of chitosan–gelatin composite and bilayer coating and film effect on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry* 141: 1667–1672.
74. Núñez-Flores, R; Giménez, B; Fernández-Martín, F; López-Caballero, M.E; Montero, MP; Gómez-Guillén, MC. 2013. Physical and functional characterization of active fish gelatin films incorporated with lignin. *Food Hydrocolloids* 30: 163-172.
75. Nur Hanani, ZA; Roos, YH; Kerry, JP. 2012. Use of beef, pork and fish gelatin sources in the manufacture of films and assessment of their composition and mechanical properties. *Food Hydrocolloids* 29:144-151.
76. Nussinovitch, A. 2013. Biopolymer Films and Composite Coatings. En: S. Ebnesajjad. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Editorial Elsevier. 295-327 p.
77. Ojagh, S; Rezaei, M; Razavi, R; Hosseini, S. 2010. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry* 120: 193–198.
78. Park, J.H., Byun, Y.J., Kim, Y.T., Whiteside, W.S. y Bae, H.J. 2014. Processes and Applications for Edible Coating and Film Materials from Agropolymers. En: J. Han. 2 edición. *Innovations in Food Packaging*. Editorial Elsevier Academic Press. 257-275 p.
79. Pavlath, A.E., Orts, W. 2009. Edible films and coatings: Why, What and How?. En: K.C. Huber y M.E. Embuscado. *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Editorial Springer Science & Business Media. 1-23 p.
80. Pelissari, F.M; Andrade-Mahecha, M.M; Sobral, PJ; Menegalli, F.C. 2013. Optimization of process conditions for the production of films based on the flour from plantain bananas (*Musa paradisiaca*). *LWT - Food Science and Technology*. 52 (1): 1-11.

81. Pérez-Gago, M.B., Rhim, J.W. 2014. Edible Coating and Film Materials: Lipid Bilayers and Lipid Emulsions. En: J. Han. 2 edición. Innovations in Food Packaging. Editorial Elsevier Academic Press. 325-349 p.
82. Raeisi, M; Tajik, H; Aliakbarlu, J; Hamed, S; Hashem, S. 2015. Effect of carboxymethyl cellulose-based coatings incorporated with *Zataria multiflora* Boiss. Essential oil and grape seed extract on the shelf life of rainbow trout fillets. *LWT - Food Science and Technology*. 64 (2): 898-904.
83. Raeisi, S; Sharifi-Rad, M; Young, S; Shabanpour, B; Sharifi-Rad, J. 2016. Evaluation of antioxidant and antimicrobial effects of shallot (*Allium ascalonicum* L.) fruit and ajwain (*Trachyspermum ammi* (L.) Sprague) seed extracts in semi-fried coated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets for shelf-life extension. *LWT - Food Science and Technology* 65: 112-121.
84. Rattaya, S; Benjakul, S; Prodpran, T. 2009. Properties of fish skin gelatin film incorporated with seaweed extract. *Journal of Food Engineering* 95:151–157.
85. Rodrigues, B.L; Alvares, TS; Da Costa, M.P; Sampaio, GSL; Lazaro, CA; Marsico, ET. 2013. Concentration of biogenic amines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) preserved in ice and its relationship with physicochemical parameters of quality. *Journal of Aquaculture and Research Development*. 4(3): 1-4.
86. Romero, A. 2016. Obtención de gelatina de piel de perico (*Coryphaena hippurus*) y caracterización de sus propiedades físico químicas. Tesis para optar el título de Ingeniero Pesquero-UNALM.
87. Saeed, S; Tariq, P. 2009. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* linn.) against gram positive bacteria. *Journal Pharmacy Science*. 22(4): 421-424.
88. Sanipes. 2016. Indicadores sanitarios y de inocuidad para los productos pesqueros y acuícolas para mercado nacional y de exportación. Lima – Perú.
89. Shahiri, H; Sedaghat, N; Jahanshahi, M; Motamedzadegan, A; Mohebbi, M. 2017. Development of Optimized Edible Packaging based on White-cheek Shark (*Carcharhinus dussumieri*) Skin Gelatin Biopolymer: Mechanical, Water Vapor Permeability, and Structural Properties. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 1-32.
90. Shan, B; Cai, Y-Z; Sun, M; Corke, H. 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 53, 7749-7759.

91. Shan, B; Cai, Y-Z; Brooks, J; Corke, H. 2007. The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology* 117: 112-119.
92. Solano-Sare, A; Tresierra-Aguilar, A; García-Nolasco, V; Dioses, T; Marín, W; Sánchez, C; Wosnitza-Mendo, C. 2008. *Biología y pesquería del perico*. Instituto del Mar del Perú. Callao. 23 p.
93. Sothornvit, R; Krochta, J.M. 2000. Plasticizer Effect on Oxygen Permeability of α -Lactoglobulin Films. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 48, 6298-6302.
94. Sothornvit, R; Krochta, J.M. 2001. Plasticizer effect on mechanical properties of beta-lactoglobulin films . *Journal Food Engineering* 50(3): 149-155.
95. Sothornvit, R; Krochta, J.M. 2005. Plasticizers in edible films and coatings. En: J. Han. 1 edición. *Innovations in Food Packaging*. Editorial Elsevier Academic Press. 403-428 p.
96. Teijón, JM. 2006. *Fundamentos de Bioquímica Estructural*. 2 ed. Madrid, ES. Tébar. 444 p.
97. Teixeira, B; Marques, A; Ramos, C; Serrano, C; Matos, O; Neng, N; Nogueira, J; Saraiva, J; Nunes, M. 2013. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Industrial crops and Products* 43 (1): 587-595.
98. Teixeira, B; Marques, A; Pires, C; Ramos, C; Batista, I; Saraiva, JA; Nunes, ML. 2014. Characterization of fish protein films incorporated with essential oils of clove, garlic and organum: Physical, antioxidant and antibacterial properties. *LWT-Food Science and Technology* 59 (1): 533-539.
99. Tellez, L. 2017. *Caracterización de los aceites esenciales de seis ecotipos de orégano (*origanum vulgare ssp.*) procedentes del valle de urubamba-Cusco; Perú*. Tesis para optar el título de Magister Scientiae en Tecnología de Alimentos. UNALM.
100. Thomazine, M; Carvalho, R; Sobral, P. 2005. Physical Properties of Gelatin Films Plasticized by Blends of Glycerol and Sorbitol. *Journal of Food Science*. 70(3): 172-176.
101. Tongnunanchan, P; Benjakul, S; Prodpran, T. 2013. Physico-chemical properties, morphology and antioxidant activity of film from fish skin gelatin incorporated with root essential oils. *Journal of Food Engineering* 117: 350–360.
102. Volpe, MG; Siano, F; Paolucci, M; Sacco, A; Sorrentino, A; Malinconico, M; Varricchio, E. 2015. Active edible coating effectiveness in shelf-life enhancement of trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets. *LWT - Food Science and Technology* 60: 615-622.
103. Wang, L; Liu, F; Jiang, Y; Chai, Z; Li, P; Cheng, Y; Jing, H; Leng, X. 2011. Synergistic Antimicrobial Activities of Natural Essential Oils with Chitosan Films. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*. 59: 12411–12419.

- 104.** Wu, Y; Weller, C.L; Hamouz, F; Cuppett, S.L; Schnepf, M. 2002. Development and application of multicomponent edible coatings and films: a review. *Adv. Food. Nutr.* 44, 347-394.
- 105.** Wu, J; Ge, S; Liu, H; Wang, S; Chen, S; Wang, J; Li,J; Zhang, Q. 2014. Properties and antimicrobial activity of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin gelatin-chitosan films incorporated with oregano essential oil for fish preservation. *Food Packaging and shelf life.* 2(1): 7-16.

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

VALORES DE ESPESOR, RESISTENCIA A LA TRACCIÓN Y ELONGACIÓN AL CORTE EN EL DISEÑO COMPUESTO CENTRAL

CÓDIGO	ESPESOR (mm)						ESPESOR PROMEDIO	CARGA	ÁREA	FUERZA	RESISTENCIA LA TRACCIÓN (MPa)	DEFORMACIÓN SEGÚN PICO FUERZA	EAC (%)
1A	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	1498.0	1.2	14.7	11.9	2.31	12
1B	0.06	0.06	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	1767.0	1.4	17.3	12.4	2.66	13
1C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.05	1773.0	1.0	17.4	16.8	2.52	13
1D	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	654.6	0.8	6.4	8.0	2.17	11
1E	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.04	0.05	973.2	0.9	9.5	10.6	2.11	11
1F	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05	1349.0	1.0	13.2	13.7	2.35	12
PROMEDIO											12.2		12
2A	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	1786.6	1.3	17.5	13.5	1.63	8
2B	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1795.8	1.2	17.6	14.7	1.82	9
2C	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	1791.4	1.3	17.6	13.5	1.57	8
2D	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	1790.8	1.3	17.5	13.5	1.92	10
2E	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1758.4	1.2	17.2	14.4	1.87	9
2F	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	1754.0	1.2	17.2	13.9	1.56	8
PROMEDIO											13.9		9
3A	0.05	0.05	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	999.8	1.2	9.8	7.9	43.42	217
3B	0.07	0.07	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	1320.2	1.4	12.9	9.5	45.12	226
3C	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	755.0	0.9	7.4	8.5	43.10	216
3D	0.07	0.06	0.07	0.06	0.05	0.05	0.06	1114.6	1.2	10.9	9.1	42.68	213

3E	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	902.6	1.2	8.8	7.4	41.11	206
3F	0.04	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	629.6	0.9	6.2	6.9	43.08	214
PROMEDIO											8.2		215
4A	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	1734.6	1.4	17.0	11.9	7.26	36
4B	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.05	0.06	1393.4	1.3	13.7	10.8	7.15	36
4C	0.07	0.07	0.08	0.08	0.09	0.09	0.08	1686.2	1.6	16.5	10.3	6.23	31
4D	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1600.0	1.4	15.7	11.2	7.08	35
4E	0.08	0.08	0.07	0.07	0.07	0.06	0.07	1477.0	1.4	14.5	10.1	6.02	30
4F	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1547.6	1.4	15.2	10.8	6.38	32
PROMEDIO											10.9		33.0
5A	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.07	0.06	1065.4	1.1	10.4	9.2	23.35	117
5B	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	943.8	0.9	9.2	10.7	21.53	108
5C	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1771	1.4	17.4	12.7	23.59	118
5D	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1225	1.2	12.0	10.0	23.11	116
5E	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	1220.2	1.1	12.0	10.9	24.04	120
5F	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	967.0	1.0	9.5	9.2	22.82	114
PROMEDIO											10.4		115
6A	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	1415.6	1.5	13.9	9.5	24.58	123
6B	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.08	0.07	1423.0	1.5	13.9	9.5	23.17	116
6C	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.06	1273.6	1.3	12.5	9.9	26.54	133
6D	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.06	0.07	1382.0	1.4	13.5	9.7	25.69	129
6E	0.09	0.09	0.1	0.08	0.08	0.08	0.09	1700.0	1.7	16.7	9.6	23.98	119
6F	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.07	1314.8	1.3	12.9	9.7	22.69	114
PROMEDIO											9.6		122
7A	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07	1111.4	1.3	10.9	8.4	54.25	271.3
7B	0.08	0.08	0.08	0.06	0.06	0.07	0.07	1400.6	1.4	13.7	9.6	53.26	266.3
7C	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	606.0	0.9	5.9	6.9	54.86	274.3

7D	0.04	0.04	0.04	0.04	0.05	0.05	0.04	653.8	0.9	6.4	7.4	55.47	277.4
7E	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	557.2	0.8	5.5	6.8	56.87	284.4
7F	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	639.4	1.0	6.3	6.3	56.27	281.4
PROMEDIO											7.6		276
8A	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1195.6	1.4	11.7	8.4	30.08	150
8B	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.07	1201.6	1.4	11.8	8.6	31.17	156
8C	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1227.4	1.4	12.0	8.6	30.24	151
8D	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1099.4	1.4	10.8	7.7	31.43	157
8E	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.07	1453.8	1.5	14.2	9.7	30.14	151
8F	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1406.2	1.4	13.8	9.8	32.27	161
PROMEDIO											8.8		154
9A	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	1143.0	1.0	11.2	11.2	25.48	127
9B	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	953.8	0.8	9.3	11.7	25.17	126
9C	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03	0.03	0.04	879.2	0.7	8.6	11.7	26.74	138
9D	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	782.2	0.8	7.7	9.6	25.43	127
9E	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	0.04	0.03	731.2	0.6	7.2	11.3	27.94	140
9F	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	916.2	0.8	9.0	11.2	23.87	118
PROMEDIO											11.1		129
10A	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1597.4	1.2	15.7	13.0	2.84	14
10B	0.07	0.05	0.05	0.06	0.06	0.07	0.06	1569.8	1.2	15.4	12.8	3.08	15
10C	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.06	1682.0	1.3	16.5	13.0	2.84	14
10D	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1521.6	1.2	14.9	12.4	3.19	16
10E	0.06	0.05	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	1490.8	1.1	14.6	12.9	3.52	17
10F	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1590.4	1.1	15.6	13.8	3.12	16
PROMEDIO											13.0		15
11A	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1555.8	1.3	15.2	12.0	4.88	24.4
11B	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	1596.6	1.2	15.6	13.4	4.69	23.5

11C	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1635.4	1.4	16.0	11.4	5.56	27.8
11D	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1789.0	1.4	17.5	12.5	4.17	20.9
11E	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.06	1589.2	1.2	15.6	12.6	4.68	23.4
11F	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1593.8	1.2	15.6	13.4	5.43	27.2
PROMEDIO											12.6		25
12A	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	1293.0	1.6	12.7	7.9	46.72	230
12B	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	1285.2	1.7	12.6	7.4	45.53	228
12C	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	1183.2	1.4	11.6	8.1	45.18	226
12D	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	951.2	1.2	9.3	7.6	44.02	220
12E	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1129.0	1.4	11.1	7.9	45.96	228
12F	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1176.0	1.4	11.5	8.2	43.11	216
PROMEDIO											7.9		224
13A	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	1006.6	1.0	9.9	9.9	11.20	56
13B	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1293.6	1.2	12.7	10.6	10.68	53
13C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.05	1086.2	0.9	10.6	11.4	9.87	49
13D	0.06	0.06	0.06	0.07	0.07	0.09	0.07	1299.2	1.4	12.7	9.3	10.54	53
13E	0.08	0.08	0.06	0.06	0.07	0.07	0.07	1441.6	1.4	14.1	10.1	11.46	57
13F	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07	0.05	0.06	1249.4	1.2	12.2	10.2	9.52	48
PROMEDIO											10.2		53
14A	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.09	0.08	1189.0	1.7	11.7	7.0	48.05	240
14B	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.06	0.08	1006.8	1.5	9.9	6.4	46.56	233
14C	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	1071.4	1.4	10.5	7.3	50.04	250
14D	0.07	0.07	0.08	0.08	0.09	0.09	0.08	1140.6	1.6	11.2	7.0	49.23	246
14E	0.07	0.07	0.06	0.06	0.08	0.08	0.07	1022.0	1.4	10.0	7.2	47.21	236
14F	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1047.6	1.4	10.3	7.3	47.10	236
PROMEDIO											7.0		240
15A	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	1114.4	1.0	10.9	10.9	16.57	83

15B	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1357.2	1.4	13.3	9.5	17.71	89
15C	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	1019.0	1.0	10.0	10.0	17.57	88
15D	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.07	1391.0	1.4	13.6	10.0	16.97	85
15E	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.07	0.08	1491.6	1.6	14.6	9.3	19.06	95
15F	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1427.6	1.4	14.0	10.0	18.23	90
PROMEDIO											10.0		88
16A	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.05	0.07	1293.6	1.3	12.7	9.8	19.35	97
16B	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.07	1342.6	1.3	13.2	9.9	20.08	100
16C	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	1497.4	1.6	14.7	9.2	18.71	94
16D	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	1499.8	1.6	14.7	9.2	20.00	99
16E	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0.06	0.05	1138.8	1.1	11.2	10.5	18.32	92
16F	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1452.0	1.4	14.2	10.2	19.26	96
PROMEDIO											9.8		96
17A	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.08	0.07	1236.0	1.4	12.1	8.9	18.52	93
17B	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.1	0.09	1498.4	1.7	14.7	8.6	16.38	82
17C	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1388.2	1.4	13.6	9.7	17.10	86
17D	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1293.4	1.2	12.7	10.6	15.69	79
17E	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.06	0.07	1454.6	1.4	14.3	10.2	16.34	82
17F	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.06	0.07	1552.8	1.4	15.2	10.9	18.75	94
PROMEDIO											9.8		86
18A	0.08	0.08	0.08	0.07	0.07	0.06	0.07	1543.8	1.5	15.1	10.3	16.31	82
18B	0.09	0.09	0.09	0.08	0.08	0.07	0.08	1585.6	1.7	15.5	9.3	17.50	88
18C	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	1585.6	1.6	15.5	9.7	15.78	79
18D	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.05	0.06	1257.2	1.1	12.3	10.9	15.72	79
18E	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.07	1322.0	1.4	13.0	9.5	18.46	92
18F	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	1478.4	1.4	14.5	10.1	16.50	83
PROMEDIO											10.0		84

19A	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.05	0.07	1372.4	1.3	13.4	10.3	16.28	81
19B	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.06	0.07	1494.4	1.4	14.6	10.5	18.30	92
19C	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1285.8	1.3	12.6	9.9	15.86	79
19D	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1346.0	1.4	13.2	9.4	17.42	87
19E	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1482.0	1.4	14.5	10.4	16.35	82
19F	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.08	0.09	1684.4	1.8	16.5	9.3	17.87	89
PROMEDIO											10.0		85
20A	0.08	0.07	0.07	0.07	0.07	0.06	0.07	1461.2	1.4	14.3	10.2	16.13	81
20B	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	1316.4	1.2	12.9	10.8	17.31	87
20C	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1451.2	1.4	14.2	10.2	17.08	85
20D	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07	1294.2	1.3	12.7	9.8	16.37	82
20E	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	1372.7	1.4	13.5	9.6	15.41	77
20F	0.07	0.07	0.07	0.06	0.06	0.06	0.07	1295.0	1.3	12.7	9.8	15.25	76
PROMEDIO											10.0		81

ANEXO 2

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANVA) DE LA REGRESIÓN PARA LA RESISTENCIA A LA TRACCIÓN Y PRUEBA DE FALTA DE AJUSTE EN LA ETAPA DE BÚSQUEDA I

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fc	Valor p (prob > F)
Modelo	31,18	6	5,20	174,81	< 0,0001
x_1 : gelatina (%)	2,88	1	2,88	96,90	< 0,0001
x_2 : glicerol (g glicerol/ g gelatina)	14,05	1	14,05	472,54	< 0,0001
x_3 : temperatura de elaboración (°C)	9,68	1	9,68	325,68	< 0,0001
$x_1 x_2$	1,13	1	1,13	37,85	0,0008
$x_1 x_3$	2,00	1	2,00	67,29	0,0002
$x_2 x_3$	1,45	1	1,45	48,62	0,0004
<i>Curvatura</i>	0,24	1	0,24	8,20	0,0286
Residual	0,18	6	0,030		
<i>Falta de ajuste</i>	0,12	1	0,12	11,72	0,0188
<i>Error puro</i>	0,053	5	0,011		
Total	31,60	13			

$$R^2 = 0,9866, R^2_{aj} = 0,9752$$

ANEXO 3

**ANÁLISIS DE VARIANZA (ANVA) DE LA REGRESIÓN PARA LA
ELONGACIÓN AL CORTE Y PRUEBA DE FALTA DE AJUSTE EN LA
ETAPA DE BÚSQUEDA I**

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fc	Valor <i>p</i> (prob > F)
Modelo	65715,50	6	10952,58	148,06	< 0,0001
<i>x</i> ₁ : gelatina (%)	11250,00	1	11250,00	152,08	< 0,0001
<i>x</i> ₂ : glicerol (g glicerol/ g gelatina)	22050,00	1	22050,00	298,08	< 0,0001
<i>x</i> ₃ : temperatura de elaboración (°C)	19800,50	1	19800,50	267,67	< 0,0001
<i>x</i> ₁ <i>x</i> ₂	11858,00	1	11858,00	160,30	< 0,0001
<i>x</i> ₁ <i>x</i> ₃	612,50	1	612,50	8,28	0,0281
<i>x</i> ₂ <i>x</i> ₃	144,50	1	144,50	1,95	0,2117
<i>Curvatura</i>	3154,67	1	3154,67	42,65	0,0006
Residual	443,83	6	73,97		
<i>Falta de ajuste</i>	312,50	1	312,50	11,90	0,0183
<i>Error puro</i>	131,33	5	26,27		
Total	69314,00	13			

$R^2 = 0,9481, R^2_{aj} = 0,9036$

ANEXO 4

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANVA) DE LA REGRESIÓN PARA LA RESISTENCIA A LA TRACCIÓN Y PRUEBA DE FALTA DE AJUSTE EN EL DISEÑO COMPUESTO CENTRAL

Fuente de Variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fc	Valor <i>p</i> (prob > F)
Modelo	61,35	9	6,82	212,56	< 0,0001
<i>x</i> ₁ : gelatina (°C)	4,68	1	4,68	145,97	< 0,0001
<i>x</i> ₂ : glicerol (g glicerol/ g gelatina)	25,07	1	25,07	781,85	< 0,0001
<i>x</i> ₃ : temperatura de elaboración (°C)	14,73	1	14,73	459,23	< 0,0001
<i>x</i> ₁ <i>x</i> ₂	1,13	1	1,13	35,08	0,0001
<i>x</i> ₁ <i>x</i> ₃	2,00	1	2,00	62,37	< 0,0001
<i>x</i> ₂ <i>x</i> ₃	1,45	1	1,45	45,06	< 0,0001
<i>x</i> ₁ ²	7,52	1	7,52	234,62	< 0,0001
<i>x</i> ₂ ²	0,11	1	0,11	3,34	0,0977
<i>x</i> ₃ ²	3,56	1	3,56	111,09	< 0,0001
Residual (error)	0,32	10	0,032		
<i>Falta de ajuste</i>	0,27	5	0,053	5,01	0,0507
<i>Error puro</i>	0,053	5	0,011		
Total	61,67	19			

$$R^2 = 0,9948, R^2_{aj} = 0,9901$$

ANEXO 5

ANÁLISIS DE VARIANZA (ANVA) DE LA REGRESIÓN PARA LA ELONGACIÓN AL CORTE Y PRUEBA DE FALTA DE AJUSTE EN EL DISEÑO COMPUESTO CENTRAL

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Fc	Valor <i>p</i> (prob > F)
Modelo	1,187E+005	9	13183,93	175,69	< 0,0001
x_1 : gelatina (°C)	17704,87	1	17704,87	235,93	< 0,0001
x_2 : glicerol (g glicerol/ g gelatina)	41703,38	1	41703,38	555,73	< 0,0001
x_3 : temperatura de elaboración (°C)	37171,77	1	37171,77	495,34	< 0,0001
$x_1 x_2$	11858,00	1	11858,00	158,02	< 0,0001
$x_1 x_3$	612,50	1	612,50	8,16	0,0170
$x_2 x_3$	144,50	1	144,50	1,93	0,1954
x_1^2	356,96	1	356,96	4,76	0,0542
x_2^2	2659,51	1	2659,51	35,44	0,0001
x_3^2	6576,90	1	6576,90	87,64	< 0,0001
Residual (error)	750,42	10	75,04		
<i>Falta de ajuste</i>	619,09	5	123,82	4,71	0,0570
<i>Error puro</i>	131,33	5	26,27		
Total	1,194E+005	19			

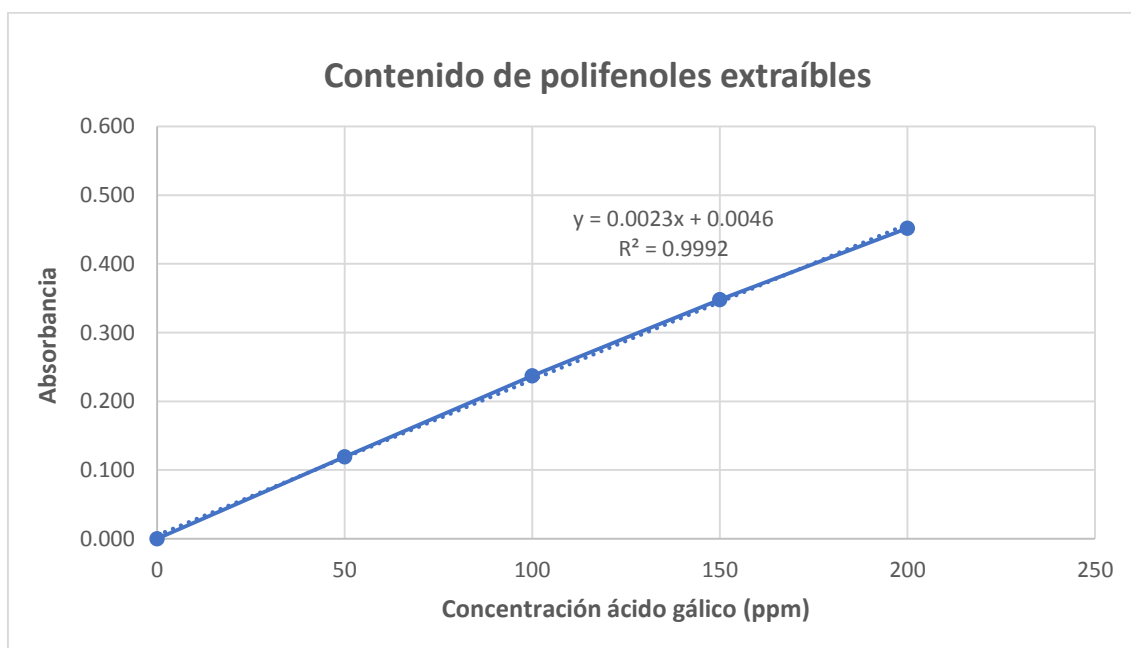
$$R^2 = 0,9937, R^2_{aj} = 0,9881$$

ANEXO 6

DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES EXTRAÍBLES EN PELÍCULAS COMESTIBLES CON EXTRACTO DE ORÉGANO

Curva de calibración para la determinación de polifenoles extraíbles

Concentración de ácido gálico (ppm)	Absorbancia
0	0.000
50	0.119
100	0.237
150	0.348
200	0.452



POLIFENOLES EXTRAÍBLES EN PELÍCULAS COMESTIBLES CON EXTRACTO DE ORÉGANO

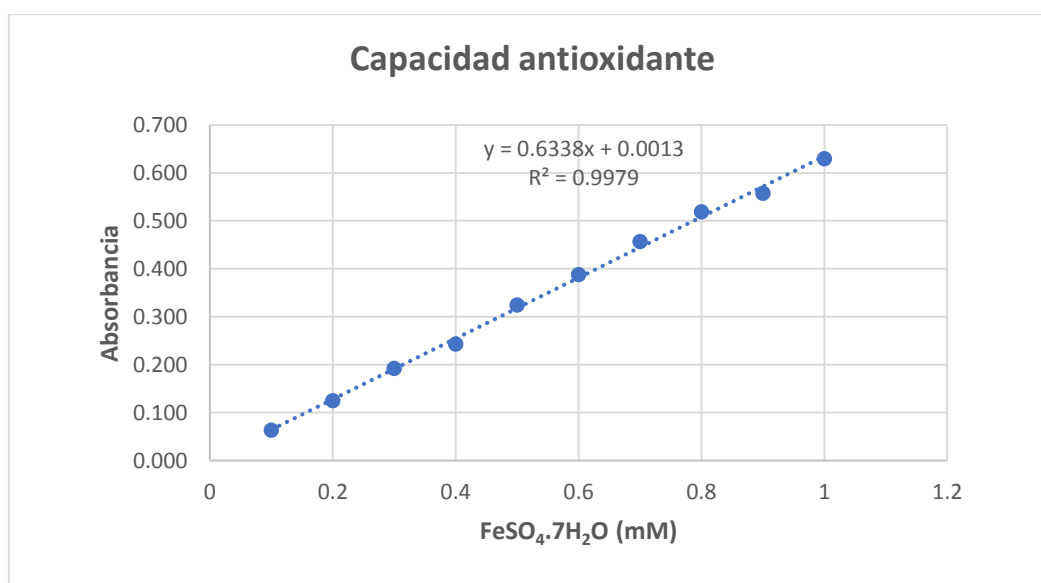
CÓDIGO	Peso de muestra (g)	Ext. disuelto en (Vol.1) (ml)	Concentración (g/ml)	Alícuota	en (Vol.2) (ml)	Absorbancia	Eq. mg ácido gálico/ g película	Concentración verdadera (uM)	mg Eq AG/ g mtra	Promedio	Desvest
T 0 A	0.0519	2	0.02595	1	1	0.070	28.86	1112.19	1.11	1.28	0.170
T 0 B	0.0519	2	0.02595	1	1	0.090	37.69	1452.31	1.45		
T 0 C	0.0519	2	0.02595	1	1	0.080	33.27	1282.25	1.28		
T 2 A	0.0518	2	0.02590	1	10	0.187	80.49	31078.87	31.08	30.74	0.341
T 2 B	0.0518	2	0.02590	1	10	0.183	78.73	30397.31	30.40		
T 2 C	0.0518	2	0.02590	1	10	0.185	79.61	30738.09	30.74		
T 4 A	0.0527	2	0.02635	1	20	0.189	81.38	61766.13	61.77	61.431	0.335
T 4 B	0.0527	2	0.02635	1	20	0.187	80.49	61096.21	61.10		
T 4 C	0.0527	2	0.02635	1	20	0.188	80.94	61431.17	61.43		
T 6 A	0.0519	2	0.02595	1	20	0.241	104.32	80404.47	80.40	81.878	1.534
T 6 B	0.0519	2	0.02595	1	20	0.245	106.09	81764.95	81.76		
T 6 C	0.0519	2	0.02595	1	20	0.250	108.30	83465.56	83.47		
T 8 A	0.0531	2	0.02655	1	20	0.300	130.36	98201.03	98.20	98.977	0.837
T 8 B	0.0531	2	0.02655	1	20	0.305	132.57	99863.20	99.86		
T 8 C	0.0531	2	0.02655	1	20	0.302	131.24	98865.90	98.87		

ANEXO 7

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PELÍCULAS COMESTIBLES CON EXTRACTO DE ORÉGANO

Curva de calibración para la determinación de la capacidad antioxidante

Concentración de FeSO ₄ ·7H ₂ O (mM)	Absorbancia
0.1	0.063
0.2	0.125
0.3	0.193
0.4	0.243
0.5	0.324
0.6	0.388
0.7	0.457
0.8	0.519
0.9	0.557
1	0.630



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN PELÍCULAS COMESTIBLES CON EXTRACTO DE ORÉGANO

Código	Absorbancia	Promedio	Desvest	W (g)	Concentración (mg/ml)	Eq. mM sal Mohr	Dilución	Eq. mM FeSO₄.7H₂O por mg de film	Promedio	Desvest
T 0 A	0.004			0.0198	1.320	0.003	1	0.003	0.004	0.001
T 0 B	0.007	0.006	0.002	0.0271	1.807	0.008	1	0.005		
T 0 C	0.007			0.0247	1.647	0.008	1	0.005		
T 2 A	0.173			0.0208	1.387	0.271	4	0.781	0.773	0.014
T 2 B	0.207	0.208	0.035	0.0249	1.660	0.324	4	0.780		
T 2 C	0.244			0.0303	2.020	0.382	4	0.757		
T 4 A	0.134			0.0232	1.547	0.209	10	1.354	1.362	0.023
T 4 B	0.187	0.169	0.030	0.0327	2.180	0.293	10	1.344		
T 4 C	0.187			0.0316	2.107	0.292	10	1.387		
T 6 A	0.154			0.0364	2.427	0.241	20	1.986	2.010	0.034
T 6 B	0.108	0.137	0.025	0.0253	1.687	0.168	20	1.996		
T 6 C	0.149			0.0340	2.267	0.232	20	2.049		
T 8 A	0.122			0.0207	1.380	0.190	20	2.749	2.714	0.074
T 8 B	0.139	0.136	0.014	0.0247	1.647	0.216	20	2.629		
T 8 C	0.149			0.0253	1.687	0.233	20	2.763		

ANEXO 8

COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES FORMADORAS DE PELÍCULA CON EXTRACTO DE ORÉGANO

TRATAMIENTO	EXTRACTO ORÉGANO (ml)	SOLUCIÓN FORMADORA DE PELÍCULA (ml)	GELATINA 3,529 % (g)	GLICEROL 0,138 g / g gelatina (g)
EO 0 %	0	30,00	1,059	0,146
EO 2 %	0,60	29,40	1,038	0,143
EO 4 %	1,20	28,80	1,016	0,140
EO 6 %	1,80	28,20	0,995	0,137
EO 8 %	2,40	27,60	0,974	0,134

ANEXO 9

MATERIAS PRIMAS, PRODUCTOS INTERMEDIOS Y PRODUCTOS FINALES



Gelatina de piel de perico



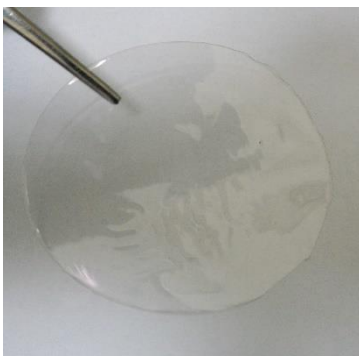
Orégano fresco



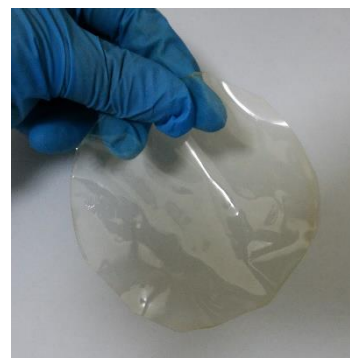
Orégano en polvo



Extracto de orégano



Película con 0 % de EO



Película con 2 % de EO



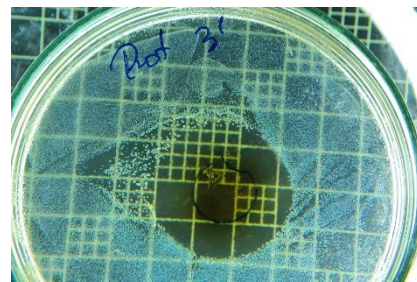
Película con 4 % de EO



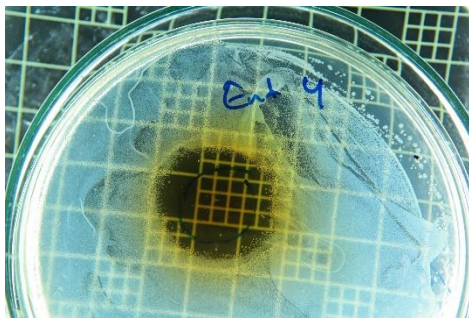
Película con 6 % de EO



Película con 8 % de EO



**Halo de la película con 6 % de EO
frente a *Proteus vulgaris***



**Halo de la película con 8 % de EO
frente a *Enterococcus faecalis***



**Filetes de trucha recubiertos
con 6 % de EO**