

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA



**ELABORACIÓN DE BIOPELÍCULAS PARA ENVASADO DE
ALIMENTOS A PARTIR DE QUITOSANO Y CAÑIHUA
(*Chenopodium pallidicaule*)**

TESIS

PRESENTADA POR:

LADY LUZ YANAPA VELASQUEZ

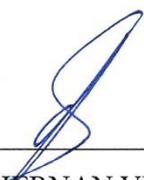
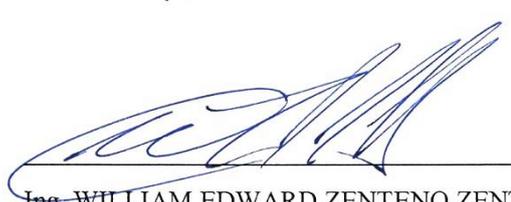
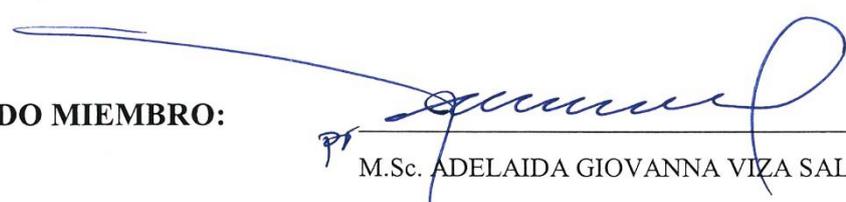
PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO QUÍMICO

PUNO – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA****ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA QUÍMICA**

**ELABORACIÓN DE BIOPELÍCULAS PARA ENVASADO DE
ALIMENTOS A PARTIR DE QUITOSANO Y CAÑIHUA****(*Chenopodium pallidicaule*)****TESIS PRESENTADA POR:****LADY LUZ YANAPA VELASQUEZ****PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:****INGENIERO QUÍMICO****APROBADA POR:****PRESIDENTE:**
M.Sc. CIRQUE HERNAN VERA ALATRISTA**PRIMER MIEMBRO:**
Ing. WILLIAM EDWARD ZENTENO ZENTENO**SEGUNDO MIEMBRO:**
M.Sc. ADELAIDA GIOVANNA VIZA SALAS**DIRECTOR / ASESOR:**
Dra. EDITH TELLO PALMA**ÁREA:** Procesos Industrial.**TEMA:** Elaboración de biopelículas.**LÍNEA:** Tecnología de alimentos.**Fecha DE SUSTENTACIÓN:** 05 de diciembre del 2018.

DEDICATORIA

A mis padres Humberto y Carmen, pilares fundamentales en mi vida quienes con su amor, paciencia, sacrificio, apoyo, consejos, principios y valores me han permitido llegar a cumplir hoy un sueño más, gracias por inculcar en mí, el ejemplo de esfuerzo y valentía, de no temer las adversidades porque Dios siempre está conmigo.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo agradezco a Dios por ser mi guía y acompañarme en el transcurso de mi vida, brindándome paciencia y sabiduría para culminar con éxito mis metas propuestas.

A la primera casa de estudios, Universidad Nacional del Altiplano, sobre todo a la Facultad de Ingeniería Química, por haberme dado una oportunidad más para poder estudiar y ser un profesional.

A mis padres, quienes son mi motor y mi mayor inspiración, que, a través de su amor, paciencia, buenos valores, ayudan a trazar mi camino, los amo con mi vida.

Mi sincero agradecimiento a la Dra. Edith Tello Palma por su invaluable colaboración, generosidad, confianza y asesoría en la investigación, en lo personal por su amistad y sus sabios consejos.

Al Jurado conformado por: M.Sc. Ciro Hernán Vera Alatrística, Ing. William Edward Zenteno Zenteno y M.Sc. Adelaida Giovanna Viza Salas, por sus sugerencias y consejos, que han permitido enriquecer este trabajo.

A mis amigos que me ayudaron de una manera desinteresada, gracias infinitas por toda su ayuda y buena voluntad.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS	11
RESÚMEN	13
ABSTRACT.....	14
I. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Objetivo general	17
1.2 Objetivos Específicos.....	17
II. REVISIÓN DE LITERATURA	18
2.1 Antecedentes del trabajo	18
2.2 Langostino (<i>Penaeus kerathurus</i>)	21
2.2.1 Clasificación Taxonómica	21
2.2.2 Distribución y abundancia de Langostino en el Perú	22
2.3 Quitosano	23
2.3.1 Propiedades fisicoquímicas del quitosano	23
2.3.2 Obtención de Quitosano.....	24
2.3.2.1 Decoloración	25
2.3.2.2 Desmineralización	25
2.3.2.3 Desproteínización	26
2.3.2.4 Quitina	26
2.3.2.5 Desacetilación.....	28
2.3.3 Biodegradabilidad del quitosano.....	28
2.3.4 Aplicaciones del quitosano	29
2.4 Cañihua (<i>chenopodium pallidicaule</i> Aellen).....	30
2.4.1 Descripción general	30
2.4.2 Clasificación taxonómica.....	32
2.4.3 Variabilidad Genética	32
2.4.4 Producción y Rendimiento de la cañihua	34
2.4.5 Composición Química y Valor Nutricional	35
2.4.5.1 Composición química	35

3.4.5.2 Valor Nutricional	36
2.5 Aislados proteicos	37
2.5.1 Proteínas.....	37
2.5.2 Propiedades funcionales de las proteínas.....	38
2.6 Biopelículas.....	40
2.6.1 Interacción de película entre quitosano y proteína	41
2.6.2 Películas comestibles	42
3.6.3 Aplicación de biopelículas.....	44
2.7 Recubrimiento de alimentos.....	46
2.7.1 Ventajas y propiedades que presentan los recubrimientos comestibles	50
2.7.2 Métodos de conservación de alimentos	50
2.7.3 Recubrimientos de frutas y hortalizas.....	51
2.7.3.1 Fresa.....	54
2.7.3.2 Estado de maduración de la fresa	54
2.7.3.3 Parámetros de uso de fresa.....	55
III. MATERIALES Y MÉTODOS	56
3.1 Diseño metodológico	56
3.1.1 Tipo y diseño de investigación	56
3.1.2 Población y muestra.....	57
3.2 Metodología de investigación	59
3.2.1 Descripción de muestreo.....	59
3.2.2 Variables	59
3.3 Procedimiento del experimento.....	59
3.3.1 Obtención del Quitosano y aislado proteico de Cañihua.....	59
3.3.1.1 Quitosano	59
3.3.1.2 Determinación del grado de desacetilación mediante el método de valoración potenciométrica.....	63
3.3.1.3 Caracterización del Quitosano mediante la determinación del espectro por FT-IR de procedente del Langostino y determinación del grado de desacetilación.....	64
3.3.1.4 Aislado proteico de cañihua.....	64

3.3.2 Preparación de la solución de mezcla de Quitosano con APC para elaboración de películas.....	68
3.3.2.1 Aplicación de solución del quitosano y APC para conservación de fresa.....	69
3.3.3 Propiedades fisicoquímicas de conservación de fresa con recubrimiento.	71
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
4.1 Obtención del Quitosano y aislado proteico de Cañihua	73
4.1.1 Quitosano	73
4.1.1.2 Determinación del Grado de desacetilación del quitosano por el método de titulación potenciométrica.....	77
4.1.1.3 Caracterización de quitosano procedente del de langostino, mediante el método de Espectroscopia Infrarroja FTIR.....	81
4.1.1.4. Determinación del grado de desacetilación del quitosano por Espectroscopia Infrarroja	83
4.1.2 Aislado proteico de cañihua.....	85
4.1.2.1 Extracción de aislado proteico	86
4.2 Solución de mezcla de Quitosano con APC para elaboración de películas	88
4.2.1 Análisis de STATGRAPHICS	89
4.3 Aplicación de solución del quitosano y APC para conservación de fresa	94
4.3.1 Propiedades fisicoquímicas de conservación de fresa con recubrimiento.	96
4.3.1.1 Sólidos solubles	96
4.3.1.2 Pérdida de peso	97
4.3.1.3 pH.....	99
4.3.1.4 Resultados de Análisis microbiológico de pruebas de recubrimiento	101
V. CONCLUSIÓN	106
VI. RECOMENDACIONES	107
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
<u>ANEXOS.....</u>	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Langostino	21
Figura 2. Cosecha nacional de langostino	23
Figura 3. Estructura molecular del quitosano	24
Figura 4. Estructura molecular de la quitina.....	26
Figura 5. Reacción de desacetilación heterogénea.	28
Figura 6. Aplicaciones de Crustáceos a partir de sus subproductos quitina y quitosano.	30
Figura 7. Cañihua.....	31
Figura 8. Hábito de crecimiento de la cañihua	34
Figura 9. Área cultivada, rendimiento y producción de Cañihua en el Perú.	34
Figura 10. Estructura de <i>flavonol-apiosidos</i> aislados de las semillas de <i>Ch. pallidicaule</i> : (1) isorhamnetina 3-O-β-D-apiofuranosil-(1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosil (1→6)]-β-D- glucopiranosido; (2) quercetin 3-O-β-D-galactopiranosido; (3) quercetin 3-O-β-D- apiofuranosilo (1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosilo (1→6)]-β-D-glucopiranosido.....	35
Figura 11. Flavonol-glucósidos (4-10) aislados de las semillas de <i>Ch. pallidicaule</i> ..	35
Figura 12. Interacciones propuestas entre el quitosano y proteína.	42
Figura 13: Película biodegradable	46
Figura 14. Propiedades funcionales de un recubrimiento comestible en frutas y hortalizas frescas.....	53
Figura 15. Estados de maduración de la fresa	54
Figura 16. Diagrama de flujo para la elaboración de quitosano a partir de langostino. 62	
Figura 17. Diagrama de flujo de obtención de APC.....	67
Figura 18. Diagrama de flujo de obtención de biopelícula a partir de quitosano de langostino y el aislado proteico de cañihua.	68
Figura 19. Diagrama de flujo de la aplicación de solución de quitosano y APC para la conservación de fresa.....	70
Figura 20. Obtención de materia primera	73
Figura 21. Despigmntación química	74
Figura 22. Proceso de desmineralización	75
Figura 23. Proceso de desproteínización	76
Figura 24. Proceso de desacetilación.....	77
Figura 25. Gráfica de titulación potenciométrica	80

Figura 26. Espectro IR de Quitosano del Langostino.....	82
Figura 27. Comparación del Espectro del quitosano, Comercial Patrón “Acros” y quitosano, Patrón del Equipo IR ZHIMADZU.....	85
Figura 28. Proceso de obtención de biopelícula.	88
Figura 29. Biopelícula de Quitosano con APC.....	89
Figura 30. Diagrama de Pareto Estandarizado (DPE)	91
Figura 31. Superficie de respuesta estimada.....	93
Figura 32. Recubrimiento de fresas	95
Figura 33. Secuencias de cambios observados durante el almacenamiento de las fresas recubiertas con quitosano más aislado proteico de cañihua.	95
Figura 34. Resultados de la determinación de °Brix de las tres muestras de fresas	97
Figura 35. Pérdida de peso de las fresas tratadas con los distintos recubrimientos.....	99
Figura 36. Comparación de pH de fresas tratadas con mezclas Q y APC.....	100

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Identificación de especies que tienen importancia comercial.....	22
Tabla 2. Propiedades generales de la quitina y quitosano.	25
Tabla 3. Composición química representativa de tipos de desechos quitinosos.....	27
Tabla 4. Distritos de mayor diversificación y área cultivada de Kañiwa	32
Tabla 5. Principales ecotipos de kañiwa colectados en ferias rurales.....	33
Tabla 6. Composición por 100g de porción.....	37
Tabla 7. Propiedades funcionales de proteínas en alimentos.....	40
Tabla 8. Propiedades funcionales de la Película Comestible.....	44
Tabla 9. Recubrimientos comestibles aplicados a frutas y hortalizas.....	45
Tabla 10. Recursos para conservar los alimentos.	51
Tabla 11. Fisiología poscosecha de la fresa.....	55
Tabla 12. Combinaciones para el recubrimiento de fresa.....	56
Tabla 13. Factores y niveles.....	70
Tabla 14. Despigmentación química.....	73
Tabla 15. Desmineralización de materia despigmentada.....	74
Tabla 16. Desproteínización de la materia desmineralizada.....	75
Tabla 17. Desacetilación de materia desproteínizada	76
Tabla 18. Titulación potenciométrica	78
Tabla 19. Grupos característicos de quitosano.	83
Tabla 20. Obtención de aislado proteico de Cañihua	86
Tabla 21. Características físicas y visuales de APC	87
Tabla 22. Resultados de pruebas de mezcla de Quitosano con APC en recubrimiento de fresa.....	90
Tabla 23. Análisis de Varianza	91
Tabla 24. Resultados Estimados para recubrimiento de fresa	92
Tabla 25. Resultados de sólidos solubles de fresas recubiertas.	96
Tabla 26. Resultados de pérdida de peso de fresas tratadas	98
Tabla 27. Resultados de la determinación de pH.....	100
Tabla 28. Resultados de mezcla de Quitosano con APC en recubrimiento de fresa ...	101

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

A	: Aceite
AM	: Monoglicéridos acetilados
APC	: Aislado Proteico de Cañihua
$C_3H_6O_3$: Ácido láctico
CO_2	: Dióxido de carbono
$^{\circ}C$: Grados centígrados
DA	: Grado de acetilización
DD	: Grado de desacetilación
DCP	: Densidad de carga positiva
DMAc	: N,N-dimetilacetamida
EAP	: Elaboración de aislado proteico
FT-IR	: Espectroscopia Infrarroja
GD	: Grado de desacetilación
g	: Gramo
h	: Hora
HCl	: Ácido clorhídrico
IR	: Infrarrojo
kPa	: Kilo pascales
LiCl	: Cloruro de Litio
LPS	: Lipopolisacáridos
min	: Minuto
mL	: Mililitro
mnsm	: Metros sobre el nivel del mar
N	: Normalidad
NaOH	: Hidróxido de sodio
NaClO	: Hipoclorito de sodio
nQTPP	: Nanopartículas de Quitosano Tripolifosfato
PC	: Película comestible
pH	: Potencial de hidrogeno
ppm	: Partes por millón
%	: Porcentaje
Q _o	: Quitosano
Qi	: Quínoa

Q_{α}	: Alfa-Quitosano
Q_{β}	: Beta-Quitosano
rpm	: Revolución por minuto
R%	: Rendimiento
RC	: Recubrimiento comestible
T_a	: Tiempo de agitación
T	: Temperatura
TP	: Tiempo de proceso
V	: Volumen
W	: Peso
X	: Punto de inflexión menor, expresado en volumen
Y	: Punto de inflexión mayor, expresado en volumen

RESÚMEN

El envasado de alimentos tiene como función principal preservar y proteger al producto para poder extender su vida útil, manteniendo sus características físicas, químicas y el valor nutricional en estado natural. El objetivo que se planteó en el presente trabajo es Elaborar Biopelículas para el envasado de alimentos a partir de quitosano y cañihua (*chenopodium pallidicaule*). El trabajo experimental se realizó en el laboratorio de alimentos de la Escuela Profesional de Ingeniería Química de la UNA-Puno; para caracterizar el quitosano se utilizó el análisis de IR, para ello se envió al Laboratorio de la UNMSM-Lima y las muestras de fresas con recubrimiento se enviaron al Laboratorio de microbiología de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, para validar que estas mantenían sus propiedades fisicoquímicas durante el tiempo de su conservación. De los resultados, se concluye que las mejores condiciones para la obtención de quitosano son $T=90^{\circ}\text{C}$, $t=2\text{h}$, con un grado de desacetilación del 83,189 % y el aislado proteico de cañihua con un rendimiento de 1,857 %. La solución de mezcla para la elaboración de Biopelículas de Quitosano con aislado proteico de cañihua, el más óptimo fue de 0,3:0,03 ($Q_{(g)}: APC_{(g)}$), a 30°C en un $T=1\text{h } 30\text{ min}$. Se logró conservar las fresas durante 13 días, donde la relación de la muestra M_9 fue el más eficiente en el rendimiento con sólidos solubles: 8,71 °Brix, pérdida de peso: 7,714 % PFS, pH: 3,42; reduciendo el crecimiento de Bacterias mesófilos aerobios a 326 UFC/g; Mohos negativo y levaduras a 30 UFC/g.

Palabras Claves: *Biopelículas, quitosano, cañihua, langostino, envasado de alimentos.*

ABSTRACT

The main function of food packaging is to preserve and protect the product in order to extend its lifetime, maintain its chemical-physical features and the nutritional value in the natural state. The proposed objective in the present investigation was to elaborate biofilms for the food packaging from chitosan and cañihua (*chenopodium pallidicaule*). The experimental study was carried out in the Food Laboratory of the Professional School of Chemical Engineering of UNA-Puno; to characterize the chitosan, the IR analysis was used, and sent to the UNMSM Laboratory, Lima and the strawberries samples, sent to the Microbiology Laboratory of Veterinary Medicine and Zootechnics Faculty, to validate that the samples maintain their Physicochemical properties during the time of their conservation. From the results, we concluded that the best conditions for obtaining chitosan are $T = 90\text{ }^{\circ}\text{C}$, $t = 2\text{h}$, with a deacetylation degree of 83.189% and the protein isolate of cañihua with a yield of 1.857%. The most optimal mixing solution for the preparation of biofilms of chitosan with cañihua protein isolation was 0.3: 0.03 (Q (g): APC (g)), at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a $T = 1\text{h } 30\text{ minutes}$ The strawberries were maintained for 13 days, where the sample M9, was more efficient in the yield with soluble solids: 8.71 °Brix, weight loss: 7.714% PFS, pH: 3.42; Reducing the aerobic mesophilic bacteria growth to 326 CFU / g; Negative molds and yeasts at 30 CFU / g.

Keywords: *Biofilms, chitosan, cañihua, shrimp, food packaging.*

I. INTRODUCCIÓN

El envasado de alimento tiene como función principal preservar y proteger al producto para poder extender su vida útil; en los últimos años, se han desarrollado técnicas de preservación de frutas y hortalizas que permiten prolongar su vida de anaquel, manteniendo sus características físicas, químicas y el valor nutricional, ya que actualmente, los consumidores están más interesados en ese tipo de productos que en los altamente procesados o adicionados con conservantes y preservantes; cada vez resulta ser más popular el consumo de frutas y verduras mínimamente procesadas ya que el consumidor asocia un beneficio para la salud con la ingesta diaria de los productos frescos, además de combinarse con la tendencia de preferir alimentos listos para comer por ser estos muy prácticos.

Actualmente las películas y cubiertas comestibles encuentran una amplia variedad de aplicaciones: cubiertas de chocolate para nueces y frutas, cubiertas de cera para frutas y hortalizas, fundas para salchichas, entre otros. Los retos técnicos involucrados en producir alimentos y conservarlos con calidad estable, indican que el uso de este tipo de recubrimientos y películas será mayor (Bósquez, 2003).

De acuerdo con Krochta y Mulder (1997), una película comestible se define como aquella capa delgada de material comestible formada sobre un alimento como un recubrimiento, o colocada (lo que implica que debe ser pre-formada) sobre o entre los componentes de los alimentos. Su propósito es el de inhibir o reducir la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos, pigmentos, entre otros.; servir como vehículo para aditivos alimentarios (antioxidantes, antimicrobianos, saborizantes, colorantes); y/o mejorar la integridad mecánica o características de manejo del alimento en cuestión. En algunos casos las películas comestibles con buenas propiedades mecánicas pueden llegar a sustituir las películas de empaques sintéticos.

Las frutas durante la etapa de cosecha y consumo dan origen a reacciones que provocan el deterioro, tales como: oscurecimiento enzimático, desarrollo de microorganismos, cambios en la textura y susceptibilidad a la deshidratación; Una alternativa de solución a esta problemática lo constituyen los recubrimientos y Biopelículas, llamadas también films, los cuales cumplen funciones muy importantes para prevenir dicho

deterioro y además prolongan el tiempo de vida útil de los productos hortofrutícolas. Las películas elaboradas con materiales biodegradables como almidones, ceras, entre otras, ofrecen transparencia, flexibilidad y dureza, adicionalmente con el empleo de plastificantes comerciales, se logra aumentar sustancialmente la biodegradabilidad y mejoran las propiedades mecánicas y de barrera (Juárez, 2012).

En el caso particular de frutas y hortalizas para consumo en fresco, los recubrimientos comestibles proporcionan una cubierta protectora adicional cuyo impacto tecnológico es equivalente al de una atmósfera modificada, por lo tanto, representan una alternativa a este tipo de almacenamiento ya que es posible reducir la cinética de los cambios de calidad y pérdidas en cantidad a través de la modificación y control de la atmósfera interna en estos productos vegetales (Bósquez, 2003).

Las Biopelículas, recubiertas en frutas incrementa el periodo de vida útil y mejora el aspecto del producto, el cual resulta con más brillo y por ello más atractivo para algunos consumidores, también tienen sus limitantes según López (2014) y Bósquez (2003), quienes señalan que entre las principales desventajas se encuentra el hecho de que pueden generar el desarrollo de sabores y olores desagradables como resultado de la inducción de anaerobiosis, o que la cubierta se vuelve quebradiza proporcionando un aspecto desagradable a la superficie del producto.

El uso excesivo de materiales sintéticos, ha generado graves problemas ambientales, debido a su total falta de biodegradabilidad, esto ha llevado a la industria de alimentos a buscar diversas alternativas para satisfacer las demandas del consumidor; es por esta razón, en el presente trabajo de estudio de elaboración de biopelículas para envasado de alimentos a partir de quitosano y las proteínas de cañihua (*Chenopodium pallidicaule*), tiene una importancia muy significativo, para lo cual se ha planteado como objetivo general Elaborar Biopelículas para el envasado de alimentos a partir de quitosano y cañihua (*chenopodium pallidicaule*) y como objetivos específicos Obtener quitosano a partir de las escamas de langostino y aislado proteico de cañihua; Preparar solución de mezcla de Quitosano con aislado proteico de cañihua para la elaboración de películas y Evaluar las propiedades fisicoquímicas de solidos solubles, pérdida de peso, pH, y análisis microbiológico de la conservación de fresa con recubrimiento.

En el presente estudio se logró determinar los objetivos planteados. El quitosano se obtuvo con un rendimiento de 83,189% y el aislado proteico de cañihua con un rendimiento de 1,857%.

La solución de mezcla para el recubrimiento de alimentos con biopelículas, siendo el más óptimo de 0,1; 0,2; 0,3 gramos de Quitosano y de 0,01; 0,02 y 0,3 gramos de aislado proteico de cañihua, diluidos en solución entre 25 ml de $C_2H_6O_3$ (Ácido Láctico) al 1% y 0,5ml de $C_3H_8O_3$ (Glicerina) en tiempo de 1h y 30 min con agitación de 150 rpm a 30°C.

Las propiedades fisicoquímicas del análisis microbiológico de la conservación de fresa con recubrimiento durante 13 días, el más óptimo fue en la muestra M₉ con sólidos solubles: 8,71 °Brix, pérdida de peso: 7,714% PFS, pH: 3,42; en las mismas condiciones de refrigeración y los resultados de las pruebas de análisis microbiológico en fresas, indica que, en su estado natural contiene un alto crecimiento del resultado de Bacterias mesófilos aerobios de 1717 UFC/g, mohos 30UFC/g y levaduras 506 UFC/g; en cambio la muestra de recubrimiento con solución de mezcla más óptima reduce el crecimiento de Bacterias mesófilos a 326 UFC/g; Mohos negativos y levaduras 30UFC/g.

1.1 Objetivo general

Para el presente trabajo de estudio se ha planteado el siguiente objetivo general:

- Elaborar Biopelículas para el envasado de alimentos a partir de quitosano y cañihua (*chenopodium pallidicaule*)

1.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos se tiene:

- Obtener quitosano a partir de las escamas de langostino y aislado proteico de cañihua.
- Preparar solución de mezcla de Quitosano con aislado proteico de cañihua para la elaboración de películas.
- Evaluar las propiedades fisicoquímicas de sólidos solubles, pérdida de peso, pH, y análisis microbiológico de la conservación de fresa con recubrimiento.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Antecedentes del trabajo

Para el presente trabajo de estudio, se ha considerado como antecedentes los siguientes trabajos de estudio:

López (2014), obtención de quitosano a partir de desechos del exoesqueleto de camarón tití (*xiphopenaeusriveti*) para el desarrollo de películas poliméricas plastificadas con glicerina, se desarrollaron películas poliméricas por medio del método de evaporación lenta mediante procesos térmicos y químicos, con el fin de evaluar su posible inhibición de bacterias *B.cereus* (*Baciliuscereus*) y *E. coli* (*Escherichiacoli*), que se recolectó en la galería del puerto de Buenaventura con un rendimiento del 5%, un grado de desacetilación del 64,17% y un peso molecular de 213510 g/mol lo que lo clasifica como un polímero de peso molecular mediano.

Pereda., et Al (2014), “Biopelículas para el envasado de alimentos: proteínas y carbohidratos”, La preparación del complejo polielectrolítico a partir de caseinato de sodio y quitosano requirió un control cuidadoso del pH de las soluciones. El caseinato de sodio fue estable a pH 6,5 El quitosano muestra su mayor solubilidad en una solución al 1% (v/v) de ácido acético (pH 4,4) pero permanece soluble a pH menor a 6,5. Las soluciones de caseinato de sodio y de quitosano con concentraciones de 2,5 % (p/v) de proteína en agua y 2 % (p/v) en ácido acético al 1% (v/v), respectivamente, se mezclaron en volúmenes iguales mediante agitación magnética (350 rpm) obteniendo una relación Quit-Cas de 0,8. La solución mezcla poseía un pH de 5,0 y no se observó separación de fases. Luego se procedió al agregado del plastificante en una relación en peso glicerol/(quitosano + proteína) de 0,28, lo cual representa el 22 % respecto del peso del sólido total. La solución mezcla se volcó en placas de Petri y el solvente se evaporó en estufa de convección a 35 °C durante un tiempo aproximado de 10 horas.

Valenzuela (2012), Bio-películas comestibles en base a mezclas entre proteínas de quínoa y quitosano: elaboración, caracterización y su aplicación en frutillas, se elaboraron extractos proteicos de quínoa (Qi) en dos proporciones de extracción harina de quínoa:agua (1:5 y 1:3) alcalinizados a pHs 8-12, que fueron caracterizados según su contenido de proteína soluble, determinando el efecto de la alcalinización sobre la

estructura proteica por: electroforesis desnaturante en geles de poli(acrilamida) con dodecilsulfato sódico, cromatografía de exclusión molecular, contenido de grupos sulhidrilos (SH) y disulfuro(SS), y espectroscopía de Fluorescencia. Por otra parte, se elaboraron y caracterizaron soluciones de α y β -quitosano (Q_α y Q_β) al 1,5 y 2% p/v. Los quitosanos seleccionados se mezclaron con los α y β -quitosano al 2% p/v para formar mezclas de quínoa y quitosano (Q_i - Q) %p/v, A partir de la mezcla Q_i - Q óptima y con la adición de tres diferentes concentraciones de aceite de girasol (A) de 2,9; 3,8 y 4,7% p/v se elaboraron películas entre proteínas de quínoa-quitosano-aceite (Q_i - Q -A), La película de mezcla seleccionada fue entre proteínas de quínoa extraídas a pH: 8 y α -quitosano en proporción (0,1 Q_i -8: Q_α), las frutillas recubiertas con las tres películas en comparación a las controles presentaron una menor emisión de CO_2 en la primera etapa del almacenamiento y un menor recuento y crecimiento de hongos y levaduras, que dependiendo del recubrimiento utilizado aumentaron la vida útil de 7-10 días (frutillas control) a 12 días, en las frutillas recubiertas con las películas permeable y semipermeable, y de 15 días para frutillas recubiertas con la película de α -quitosano. Además, los recubrimientos mantuvieron la calidad de las frutillas, y no fueron detectados por los jueces en el análisis sensorial.

Savé (2011), elaboración de nanopartículas de quitosano e incorporación en películas de quitosano-quínoa (*Chenopodium quinoa*/Willd), se usó el método de Calvo, se prepararon soluciones de quitosano al 1,5% p/v (Aldrich) en una solución de ácido acético glacial a 3,0 mg/mL. Se preparó una solución de tripolifosfato de sodio a 1,0 mg/mL, suspensión por centrifugación a 21,000 \times g a 14°C por 30 min. Se liofilizan las nanopartículas durante 48 h y se almacenan a una temperatura de 4-8° C para luego moler en mortero y tamizar por malla 100. La Harina de quínoa sin desgrasar fue suspendida en agua en una proporción de 1:7,5, la cual fue llevada a pH 11 con NaOH 5M y agitada durante 1 hora, posteriormente esta suspensión fue centrifugada a 21,000 \times g por 30 minutos a 15°C. Posteriormente se determinó la concentración de proteínas en este extracto a través de Bradford. Soluciones de quitosano (Sigma) al 2% se mezclaron en volúmenes iguales con soluciones de ácido cítrico 0,1 M cargada con nanopartículas de quitosano-tripolifosfato (nQTPP). Las nQTPP se agregaron en polvo en la solución de ácido cítrico. La cantidad agregada de nQTPP (0,1 y 8 % p/p) se basó en la cantidad de quitosano en la mezcla. Luego la mezcla así preparada se moldeó en placas de petri las que se secaron hasta peso constante a 50°C, siendo posteriormente acondicionadas a

23 °C y 60% de humedad relativa previas a su uso. Soluciones de quitosano (Sigma) al 2% se mezclaron en volúmenes iguales y esta mezcla fue llevada a pH 4 con NaOH 1M en agitación constante. La cantidad agregada de nanopartículas de quitosano-tripolifosfato (0 y 1 % p/p) se basó en la cantidad de quitosano en la mezcla. Luego la mezcla así preparada se moldeó en placas de petri las que se secaron hasta peso constante a 50°C, siendo posteriormente acondicionadas a 23 °C y 60% de humedad relativa previas a su uso.

Villamán (2007), elaboración y caracterización de films comestibles basadas en mezclas entre proteínas de quínoa y quitosano, se analizó la microestructura del *film* de mezcla por medio de microscopía electrónica de barrido. Se escogió el proceso de extracción de proteínas que resultó ser más eficiente, en cuanto al rendimiento (R%) versus el tiempo de proceso (T.P), obteniéndose un 11,2% en 1,5h. El *film* de mezcla seleccionado fue el de proporción (1/1), (EAP/Qo, v/v). En éste, las proteínas resultaron ser un aporte en cuanto a sus propiedades mecánicas, presentando una firmeza y rigidez aceptable y una elasticidad aproximadamente cuatro veces mayor que la que presentó el *film* de Quitosano por sí solo. El *film* de mezcla obtuvo una permeabilidad media al oxígeno ($25,6\text{cm}^3 \cdot \mu\text{m}/\text{m}^2 \cdot \text{d} \cdot \text{kPa}$).

Lalaleo (2010), en su trabajo de investigación “Desarrollo de un método para la obtención de quitosano a partir de caparzones de camarón (*penaeusvannamei*), utilizando un agente reductor químico”, los mejores resultados indican un peso molecular de $8,31 \times 10^5$ g/mol, 10,39 % de humedad, 0,12 % de contenido de cenizas, 81,69/100 de índice de blancura, 8,44 % de nitrógeno, un grado de desacetilación del 85,91 % calculado en base al contenido de nitrógeno y un grado de desacetilación del 74,24 % en base al análisis por espectroscopia infrarroja, donde todos los parámetros reportados corresponden a tratamientos con el uso del agente reductor. En contraste, sin agente reductor, se obtuvo como mejor resultado un peso molecular de $6,91 \times 10^5$ g/mol, 10,72 % de humedad, 0,11 % de contenido de cenizas, 90,55/100 de índice de blancura, 8,44 % de nitrógeno, un grado de desacetilación del 85,05 % calculado en base a contenido de nitrógeno y un grado de desacetilación del 73,72 % en base al análisis por espectroscopia infrarroja. Los resultados globales indican que el método directo con un tiempo de desacetilación de 4 horas, independiente de la presencia de agente reductor, permite obtener un quitosano de mejores características físico- químicas, por lo que no

se justifica el empleo de Tetrahidruro de Boro y Sodio como agente reductor en el proceso de obtención de quitosano

2.2 Langostino (*Penaeus kerathurus*)

Mero (2010), el langostino *Penaeus kerathurus* son crustáceos macruros (abdomen alargado) de hábitos nocturnos y carnívoros. Posee un cuerpo alargado y cilíndrico, aplanado en los lados más ancho en la parte superior su cuerpo está dividido en tres partes: cefalotórax, abdomen y cola, con cabeza y ojos salientes de gran tamaño.

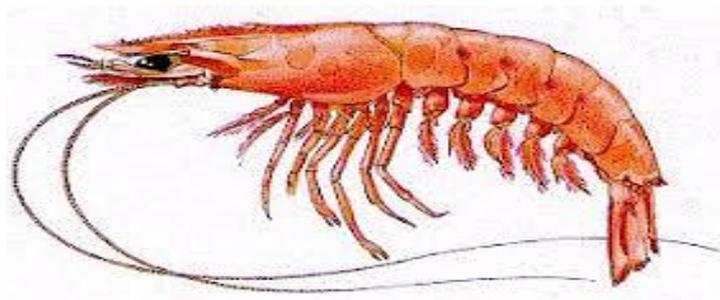


Figura 1. Langostino

Fuente: Mero (2010).

Es un crustáceo que también es conocido como camarón de mar, es una especie bentónica que viven en fondos arenosos de 2-30m y su talla promedio es de 18cm alcanzando un máximo de 23cm; el ambiente adecuado para su desarrollo debe tener una temperatura de 28°C y un pH promedio de 8.0. En su ambiente natural los langostinos viven 1-2 años. Los langostinos transcurren su vida entre el mar abierto y la desembocadura de los ríos.

2.2.1 Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica del langostino según (Bermúdez, Hernando, Gabriel, & Navas, 2002):

Reino: Anamalia

Clase: Malacrostraca

Orden: Decápoda

Súper – familia: Penaeoidea

Familia: Penaeidae

Géneros: Litopenaeus y Farfantepenaeus

Especies principales: L. vannamei

Nombre común: Langostinos

Especie: *Penaeus kerathurus*

La súper-familia Penaeoidea, con cuatro familias (Aristeidae, Sicyonidae, Penaeidae y Solenoceridae), incluye los langostinos de mayor importancia comercial en el mundo (Litopenaeus y Farfantepenaeus). En el Perú, se registran las cuatro familias, con 10 géneros y 22 especies, Méndez (1981). En la zona norte del Perú se han identificado las siguientes especies que tienen importancia comercial:

Tabla 1. Identificación de especies que tienen importancia comercial

Nombre científico	Nombre común
Litopenaeus vannamei	Langostino blanco
Litopenaeus stylirostris	Langostino azul
Litopenaeus occidentalis	Langostino blanco
Farfantepenaeus californiensis	Langostino café
Farfantepenaeus brevisrostris	Langostino rojo
Rimapenaeus fuscina	Langostino cebra
Xiphopenaeus riveti	Langostino pomada
Protrachypene precipua	Langostino pomada, langostino amarillo
Sicyonia disdorsalis	Langostino duro, camarón cáscara dura
Sicyonia aliaffinis	Langostino duro, camarón cáscara dura
Solenocera florea	Langostino rosado, camarón chupador

Fuente: Méndez, M. (1981).

2.2.2 Distribución y abundancia de Langostino en el Perú

En el norte del Perú, los langostinos blanco y azul son capturados generalmente en aguas someras de 1 a 30m de profundidad; los langostinos café y rojo se presentan en mayor abundancia en aguas más profundas, de 30 a 50m (Méndez, 1981).



Figura 2. Cosecha nacional de langostino

Fuente: Ministerio de la Producción (2015).

2.3 Quitosano

El quitosano es un polisacárido biosintético natural derivado desacetilado de la quitina, es biocompatible, bioadhesivo y biodegradable enzimáticamente, citado por Ikada (2006). Su estructura, propiedades mecánicas, velocidad de congelación, peso molecular y porcentaje de desacetilación, se pueden controlar cambiando su concentración (Chiu & Radisic, 2013).

2.3.1 Propiedades fisicoquímicas del quitosano

El quitosano es un copolímero compuesto de unidades de 2-Acetilamina-2-desoxi- β -D-(+)-Glucopiranososa y 2-amino-2-desoxi- β -D-Glucopiranososa (Dash, Chiellini, Ottenbrite, & Chiellini, 2011). Su principal fuente es la quitina, la cual es sometida a un proceso de desacetilación termoquímico en un medio alcalino, las condiciones de temperatura, presión, concentración y tiempo determinan el peso molecular del polímero y su grado de desacetilación. Más adelante se aborda con más profundidad la obtención del quitosano.

El quitosano al ser el derivado N-desacetilado de la quitina, es una amina primaria, y su monómero principal es el 2-amino-2-desoxi- β -D-Glucopiranososa. El contenido de nitrógeno del quitosano puro es aproximadamente del 6,89%, el grupo amino libre en la estructura del quitosano le proporciona un comportamiento marcadamente básico,

además le confiere ciertas características fisicoquímicas de gran interés industrial (Majeti & Kumar, 2000).

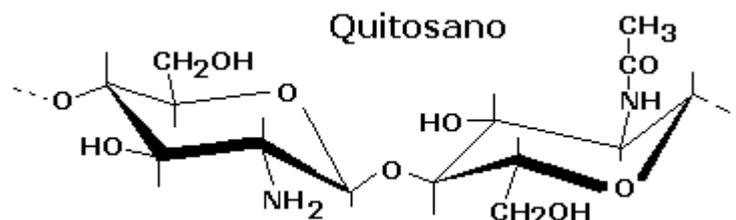


Figura 3. Estructura molecular del quitosano

Fuente: Wikipedia, Chitosan (2010)

El grupo amino en el quitosano posee una ligera carga positiva, lo que le permite ser soluble en medios ácidos o en soluciones neutras, es un bio-adhesivo que puede ligarse a las superficies cargadas negativamente tales como las membranas mucosas; debido a esta propiedad física el quitosano permite el transporte de principios activos polares a través de las superficies epiteliales, siendo además bio-compatible y biodegradable.

Debido al proceso de desacetilación de la quitina pierde parte de los grupos acetilo, alrededor del 50%, para convertirse en quitosano, lo cual le permite ser soluble, más fácilmente, en ciertas sustancias: “la capacidad del quitosano de disolverse en soluciones acuosas diluidas de ácidos es el criterio comúnmente aceptado para diferenciarlas de la quitina” (Pachence, J., Bohrer, M. & Kohn, J., 2007).

2.3.2 Obtención de Quitosano

La quitina se obtiene comercialmente del exoesqueleto de cangrejos, langosta y camarones, además, en el exoesqueleto del zooplancton marino, incluyendo los corales y las medusas. Algunos insectos como las mariposas y caballitos del diablo tienen quitina en sus alas; y la pared celular de las levaduras, hongos y otros mohos también contienen esta sustancia natural donde se encuentra asociada con carbonato de calcio, proteínas, pigmentos y grasas, éstos últimos en pequeñas cantidades. La quitina es muy estable a los ácidos y álcalis, por lo que se puede aislar como un producto luego de una descomposición con ácidos y álcalis de las otras sustancias a las que se encuentra asociada en el exoesqueleto (Torres Z. , 2000).

Tabla 2. Propiedades generales de la quitina y quitosano.

Propiedad	Quitina	Quitosano
PM (g/mol)	$1 \times 10^6 - 2.5 \times 10^6$	$1 \times 10^5 - 5 \times 10^3$
DA	DA > 40	0 - 40
Humedad	8 - 10	6 - 7
Solubilidad	DMAc- LiCl/TCA- MC	Ácidos diluidos

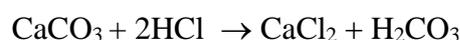
Fuente: Juárez (2012)

2.3.2.1 Decoloración

La coloración de los caparazones de los crustáceos se debe fundamentalmente a la presencia de pigmentos carotenoides tales como la axtaxantina, la cataxantina, el astacina, la luteína y el β caroteno. Los tratamientos anteriores generalmente no son capaces de eliminar estos pigmentos, los que suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, éter, etanol, acetato de etilo o mezclas de solventes. También se han empleado agentes oxidantes tradicionales, como el peróxido de hidrogeno, el hipoclorito de sodio y permanganato de potasio, aunque debe tenerse presente que estos suelen atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el polímero (Martínez, Cortez, & Ezquerro, 2010).

2.3.2.2 Desmineralización

La desmineralización con HCl se realiza para retirar el carbonato de calcio (CaCO_3) presente en los exoesqueletos de camarón, los cuales son eliminados empleando soluciones diluidas de ácido clorhídrico (hasta 10%) o (0,3 a 2M) a temperatura ambiente, aunque también se han utilizado otros ácidos (HNO_3 , HCOOH , H_2SO_4 Y CH_3COOH). La concentración del ácido y el tiempo de tratamiento dependen de la fuente, pero debe evitarse los tratamientos a temperaturas altas, que provocan la degradación consiste en el empleo agente complejante EDTA. Desde el punto de vista químico, la desmineralización con ácidos se logra a través de la siguiente reacción (Fong, 2012).



2.3.2.3 Desproteínización

La desproteínización con NaOH se realiza para retirar las proteínas presentes que interfieren con la pureza de la quitina, este proceso se hace a altas temperaturas y en un menor lapso de tiempo para evitar la despolimerización de las cadenas polisacáridas. Todas las proteínas tienen una estructura primaria constituida por una secuencia de aminoácidos, una secundaria constituida por la forma helicoidal y una terciaria representada por el enrollado sobre sí misma y la orientación espacial. La estructura secundaria y terciaria son mantenidas por enlaces de hidrógeno, por lo que en contacto con los ácidos y álcalis se rompen los enlaces iónicos de hidrogeno, produciendo el desplegamiento de la proteína y su ruptura, lo que lleva a su destrucción irreversible y la pérdida de su actividad biológica. Tal destrucción irreversible adquiere la forma de la desnaturalización o la coagulación de las proteínas retirándolas de los exoesqueletos.

2.3.2.4 Quitina

La quitina es el segundo polisacárido de origen natural después de la celulosa, es un biopolímero tipo polisacárido, considerado a menudo como un derivado de la celulosa, la diferencia se encuentra en el grupo hidroxilo del carbono 2, el cual en la quitina se ha sustituido por el grupo acetamida y cuyo monómero es: 2-2acetamido-2-desoxi- β -D-glucosa (Parada, Luis; Crespín, G; Miranda, R; Katime, Issa;, 2004)

El nombre sistemático de la quitina es β (1-4)-2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y su estructura química es la siguiente:

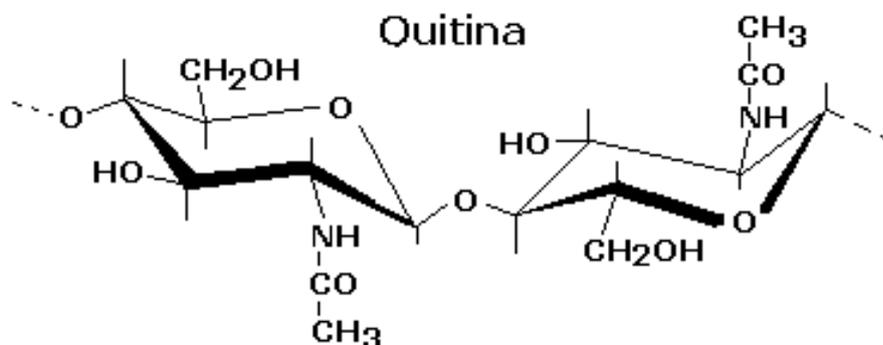


Figura 4. Estructura molecular de la quitina

Fuente: Tapia, C. (2005).

Fue descubierta en 1811 por Bracconot, al aislar un material nitrogenado en sus estudios sobre la química de los hongos y por su origen la denominó “*fungina*”. Posteriormente, en el año 1923 se le denominó con el nombre de quitina que significa cubierta o envoltura (Pachence, J., Bohrer, M. & Kohn, J., 2007).

2.3.2.4.1 Propiedades físicas y químicas de la quitina

La quitina se caracteriza por ser blanca, dura, inelástica y es la mayor fuente de contaminación superficial de las áreas cercanas del mar, por estar contenida en los caparzones de los crustáceos. Su fórmula es $C_8H_{13}O_5N$, tiene gran peso molecular y al igual que la celulosa también tiene una estructura de cadenas orientadas paralelamente.

Debido a su alto peso molecular y a su estructura lineal no ramificada, el quitosano es un potente agente que incrementa la viscosidad en medio ácido y se comporta como un material pseudoplástico, con viscosidad dependiente de la agitación. La viscosidad de las soluciones de quitosano aumenta al incrementar la concentración de este, mientras que disminuye al elevar la temperatura y el grado de desacetilación del producto. Es insoluble a pH alcalino y neutro, siendo soluble solo en ácidos orgánicos, presentando solubilidad limitada en ácidos inorgánicos. En disolución, los grupos amino del polímero se protonan dando como resultado un polisacárido soluble cargado positivamente ($R-NH_3^+$) (Pablo, 2010).

La composición química de los residuos de diferentes tipos de crustáceos para las zonas costeras en Iberoamérica se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición química representativa de tipos de desechos quitinosos.

Fuente	Composición Química			
	Proteína (%)	Ceniza (%)	Lípidos (%)	Quitina (%)
Langosta y Langostinos	23,1	33,7	2,2	20,2
Camarón	58,0	24,2	1,4	16,4
Cangrejo	13,1	72,4	0,8	13,8
Calamar	55,3	0,9	0,6	43,2

Fuente: Agullo y Mato (2004)

2.3.2.5 Desacetilación

Este proceso se puede llevar a cabo de tres maneras, por desacetilación homogénea, heterogénea y enzimática, básicamente consiste en convertir los grupos acetilo en grupos amino, la reacción se presenta en la Figura 5.

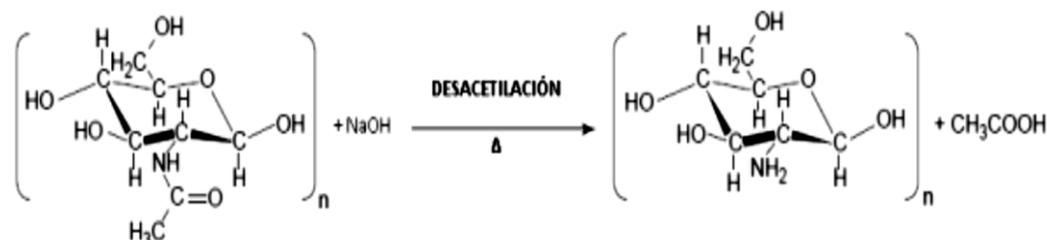


Figura 5. Reacción de desacetilación heterogénea.

La reacción homogénea consiste en suspender la quitina en un medio álcali a temperaturas menores de 4°C con el fin de solubilizar la quitina, luego se somete a desacetilación a temperatura ambiente durante largos periodos de tiempo, permitiendo que la conversión de los grupos acetilo a aminos, no se localice en determinados lugares de la cadena.

La reacción heterogénea es utilizada ampliamente en la industria y consiste en dispersar la quitina en una solución álcali caliente en periodos cortos para evitar la despolimerización. Normalmente el quitosano obtenido presenta polidispersión del grado de desacetilación.

El método enzimático consiste en desacetilar la quitina por medio de la enzima quitina-desacetilasa, que cataliza la reacción de conversión de los monómeros 2-Acetilamina-2-desoxi-β-D-(+)-Glucopiranososa a 2-amino-2-desoxi-β-D-Glucopiranososa. La limitación de este proceso es que la enzima no es muy efectiva en la desacetilación de quitina insoluble, y por lo tanto es necesario un pre tratamiento (Valenzuela, 2006).

2.3.3 Biodegradabilidad del quitosano

Al igual que muchos otros compuestos orgánicos el quitosano también es bio-absorbible y biodegradable, debido a la acción de enzimas propias del polímero u otras similares, debido a esta propiedad es que su utilización se ha ampliado y ha adaptado a muchos

usos. Entre las enzimas que han sido reportados para ejercer actividad hidrolítica en el quitosano se encuentran: quitosana, lisozima, pectinasa, lipasa, dextranasa, pancreatina, pepsina y papaína. Se ha mostrado que es lentamente degrada principalmente por las enzimas quitosanas y lisozimas; con las primeras, la biodegradación sucede hasta un 75% y hasta en un 35% con lisozimas (Hoyos & Urreco, 1997).

2.3.4 Aplicaciones del quitosano

- a) **En la industria de alimentos:** Este compuesto de origen biológico se ha convertido en los últimos años en el preferido debido a su capacidad para formar RC y PC, el derivado de la quitina se utiliza para dar consistencia, por no ser tóxico, su abundancia en la naturaleza y a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas que lo hacen ser de vital interés para la preservación de muchos alimentos (Lárez , 2006).
- b) **Dietéticos:** se utiliza como adelgazantes, existe una amplia variedad de productos comerciales que ofrecen el polímero como atrapador de grasas en el estómago (Lárez , 2006).
- c) **Agricultura y ganadería:** se utiliza como recubrimiento de semillas para su conservación durante el almacenamiento, sistemas liberadores de fertilizantes, aditivo para alimento de animales, en formulación de pesticidas, etc. (Lárez , 2006).
- d) **Tratamiento de agua:** sirve como agente floculante, agente coagulante, tratamientos de flotación para la remoción de aceite de pescado en agua, agentes filtrantes para piscinas y spas, remoción de metales, remoción de surfactantes, etc. (Lárez , 2006).
- e) **Química analítica:** en aplicaciones cromatograficas, intercambiadores de iones, absorción de iones de metales pesados y absorción de ácidos, fabricación de electrodos específicos para metales, etc. (Lárez , 2006).
- f) **Biomedicina:** membrana de hemodiálisis, suturas biodegradables, sustituyentes artificiales de la piel, agente cicatrizante en quemaduras, sistemas liberadores de fármacos, liberación de insulina, transporte de agentes anticancerígenos, tratamiento de tumores (leucemia), control del virus del SIDA, etc.
- g) **Industria de los cosméticos:** el quitosano se introduce en cremas humectantes, es una molecula que absorbe el agua. Algunos fabricantes de shampoo lo

utilizan como ingrediente, ya que desarrolla una película que da protección y brillo al cabello. Espumas de afeitar, cremas para la piel y el cuerpo (Lárez , 2006).

- h) **En la industria papelera:** donde el principal insumo es la celulosa, el quitosano sirve para fijar y dar resistencia al papel, mientras que una de sus más prometedoras aplicaciones podría ser como plástico biodegradable, sustituyendo al plástico tradicional derivado del petróleo, uno de los materiales más utilizados en el mundo y más difíciles de degradarse, lo que genera mucha contaminación (Lárez , 2006).

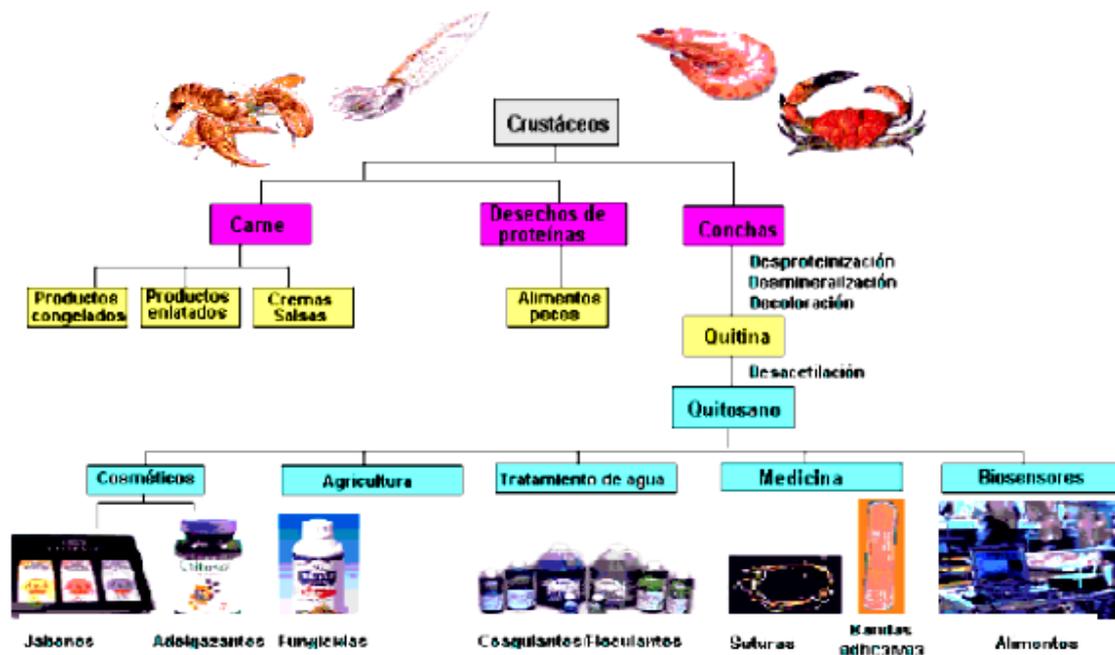


Figura 6. Aplicaciones de Crustáceos a partir de sus subproductos quitina y quitosano. Fuente: Lalaleo (2010).

2.4 Cañihua (*chenopodium pallidicaule* Aellen)

2.4.1 Descripción general

La cañihua (*chenopodium pallidicaule aellen*) es un grano andino originario del Altiplano de Perú y Bolivia, durante cientos de años ha sido de gran relevancia para la alimentación de los pobladores andinos. Actualmente está retomando auge, en la alimentación humana por la calidad de su proteína y un mejor cómputo químico que los cereales comunes. Además de componentes nutricionales como calcio y magnesio, la cañihua puede ser fuente importante de componentes funcionales o nutraceuticos como fibra dietaria y compuestos fenólicos, pero los pocos estudios no permiten el

conocimiento del real potencial de esta especie para su aprovechamiento en la industria alimentaria (Apaza, 2010).



Figura 7. Cañihua

Se cultiva en las zonas altas de Arequipa, Cusco y el Altiplano de la Región Puno, a altitudes de 3812 a 4100 msnm. A pesar de ser el Altiplano Perú-Bolivia, el centro de origen de esta especie y contar con gran variedad genética y morfológica, no se cuenta con variedades comerciales que satisfagan las expectativas de los agricultores y la agroindustria y es producida con la aplicación de criterios y tecnología tradicional, las mismas que se traducen en bajos rendimientos generando así niveles mínimos de ingresos económicos a los agricultores dedicados al cultivo de kañiwa (Apaza, 2010).

Según (Tapia M. , 1986), es una planta terofita herbáceo de porte bajo, de 20 a 80 cm de alto muy ramificada desde la base, la parte superior de los tallos, el diámetro. Tiene un periodo vegetativo entre 120 y 180 días, el tallo es generalmente erguido o semi-erguido ramificado, el color del tallo y follaje puede variar desde el amarillo, verde, anaranjado, rosado, rojo o púrpura. Las hojas contienen vesículas con oxalatos que permiten mantener la humedad de la planta en condiciones muy secas. El fruto es de color blanquecino y coloreado, cubierto por el perigonio de color generalmente gris y de pericarpio muy fino y traslúcido, el diámetro del fruto es de 0,5 a 1,5 mm. Las semillas pueden germinar sobre la propia planta al tener humedad suficiente. El grano de cañihua no contiene saponina y no es amargo (Cáceres, 2013).

La cañihua tiene una gran variedad genética bien representada en la colección de la estación experimental de camacani de la UNA PUNO, consistente en 339 accesiones del Perú y 26 accesiones de Bolivia. (Lescano, 1997).

2.4.2 Clasificación taxonómica

Reino : Vegetal eukarionta

División: Angiospermophita

Clase: Dicotyledonea

Sub Clase : Archichlamydea

Orden: Centros permates

Familia : Chenopodeaceae

Género: Chenopodium

Especie: Chenopodium pallidicaule Aellen

Nombre: Qañihua, Cañihua, Cañahua

2.4.3 Variabilidad Genética

El Altiplano es un centro de diversificación y variabilidad muy importante de kañiwa. Su producción se concentra en terrenos comunales, campos donde es posible encontrar una gran diversidad de ecotipos con variabilidad genotípica y fenotípica.

Tabla 4. Distritos de mayor diversificación y área cultivada de Kañiwa

Provincia	Distrito	Comunidades Campesinas
El Collao	Collao	Churo maquera, Churo Lopez, Jachocco
Puno	Laraqueri	Nuño marca, Ancacca
Puno	Acora	Amparani, Totorani
Melgar	Llalli	Llalli, Checasica, Kenemari
Melgar	Orurillo	Balsa pata, Caluyo
Melgar	Macari	Alto collana, Bajo collana, Huamanruro
Melgar	Umachiri	Sora, Umasi
Chucuito	Zepita	Tanka tanka (Alto pavita, Bajo pavita)
Chucuito	Juli	San Pedro de Llinqui
Chucuito	Kelluyo	Kelluyo
Carabaya	Crucero	Pueblo joven Carlos Gutiérrez
Lampa	Lampa	Isla cantería, Enrique Torres Belón

Fuente: Proyecto conservación *in situ* – INIA, 2005.

El Banco de Germoplasma de la EEA. Illpa-INIA, Puno, conserva 430 accesiones de

kañiwa, de las cuales el 41% corresponde a la provincia de Melgar, 21% a la provincia de Puno, 13% a San Antonio de Putina, 10% a la provincia de Lampa y 6% a la provincia de Huancané. Sin embargo, es imprescindible realizar colectas más minuciosas de material genético en forma amplia, como método rápido para obtener genotipos con valor agronómico y fuente de germoplasma (Apaza, 2010).

Tabla 5. Principales ecotipos de kañiwa colectados en ferias rurales.

N°	Nombre común	N°	Nombre común	N°	Nombre Común
1	Choque sillihua	17	Estrella	33	Sayiri sillihua
2	Cunacutama	18	Pusi esquina	34	Janko alverja
3	Kitay llama	19	Chuwa kañiwa	35	Choque uta
4	Chuto	20	Chiji kañiwa	36	Chupica
5	Kello	21	Ara	37	Condor nayra
6	Illama	22	Naranja	38	Tonko kello
7	Alfenica	23	Rojo	39	Huancatama
8	Alverja	24	Amarilla	40	Sullka illama
9	Airampo kañiwa	25	Pasankalla	41	Wila chuto
10	Pito jiura	26	Kancolla	42	Chuto sillihua
11	Kello kañiwa	27	Cupi blanca	43	K'uytu kañiwa
12	Chillihua	28	Luntusa	44	Rosada alfeñica
13	Wila alfeñica	29	Ishualla c	45	Kañiwa comunal
14	Isillihua chiara	30	Leche pito	46	Alverja chuto
15	Coque pito	31	Peske kañiwa	47	Janko
16	Isillihua oke	32	Morado	48	Cunacutama rosada

Fuente: (Apaza, 2010)

Se ha intentado la clasificación agronómica basándose en la forma de la planta y color de la semilla. Clasificándose en tres ecotipos: una planta recta saihua de crecimiento determinado; un tipo semirrecto, lasta de crecimiento indeterminado y uno denominado pampalasta (Fig 8). Cada uno de estos tipos es clasificado por el color de las semillas. (Descriptor para la cañiwa, IPGRI. International Plant Genetic Resources Institute).

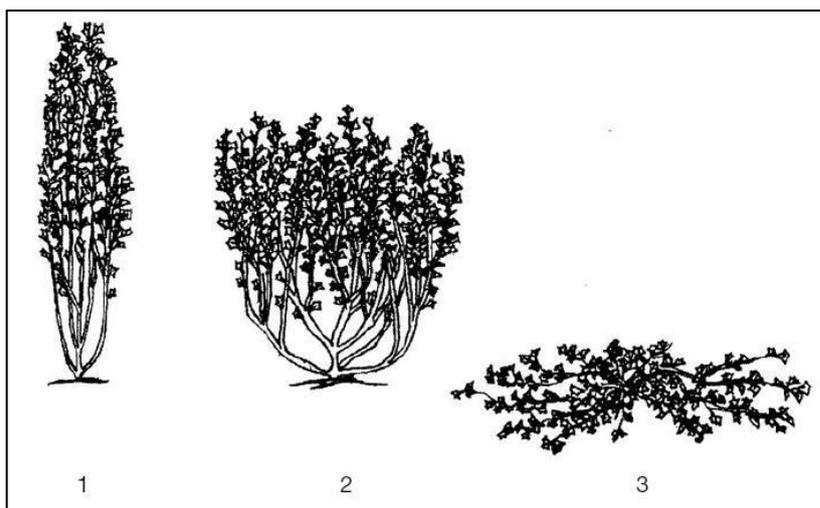


Figura 8. Hábito de crecimiento de la cañihua

Fuente: IPGRI (2005). Descriptores para la Cañihua.

La cañihua muestra una amplia diversidad genética, Variando desde el color de las plantas y semillas, la precocidad, contenido de proteínas, adaptación a diferente tipo de suelo, precipitación, tolerancia a plagas y enfermedades. Normalmente se encuentran especies cultivadas y silvestres.

3.4.4 Producción y Rendimiento de la cañihua

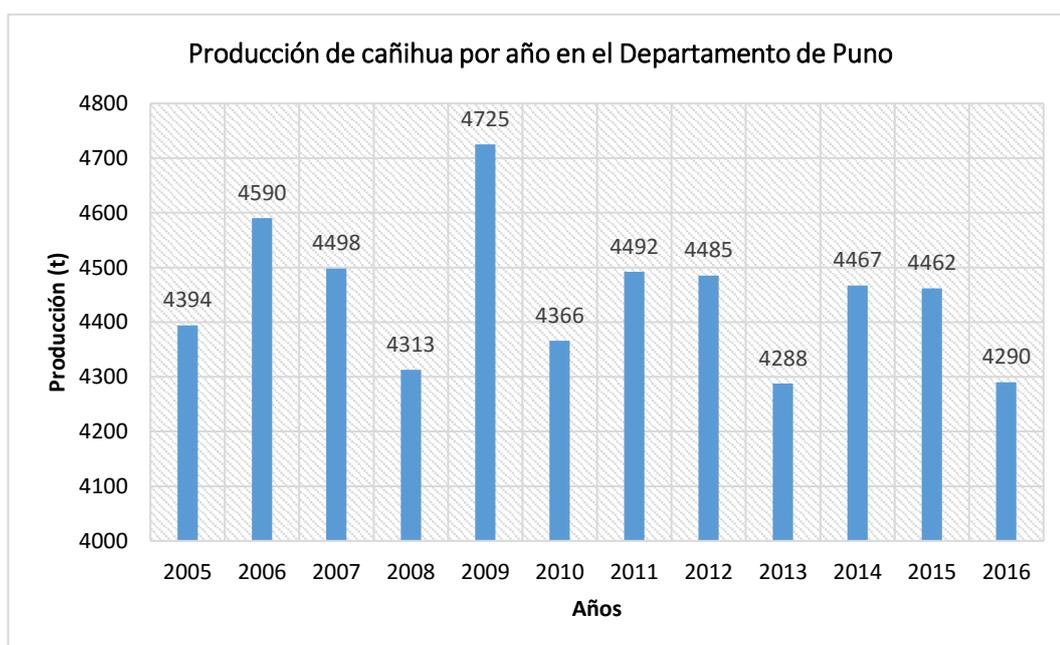


Figura 9. Área cultivada, rendimiento y producción de Cañihua en el Perú.

Fuente: Minagri (2013).

2.4.5 Composición Química y Valor Nutricional

2.4.5.1 Composición química

La composición química de la *cañihua* presenta características similares a las de la quinua. Los estudios realizados reportan la presencia de flavonol-glucósidos, y de tres tipos de saponinas terpenoides, perteneciendo el mayor grupo de compuestos aislados a la familia de los flavonoides (Rastrelli, Saturnino, Schettino, & Dini, 1995).

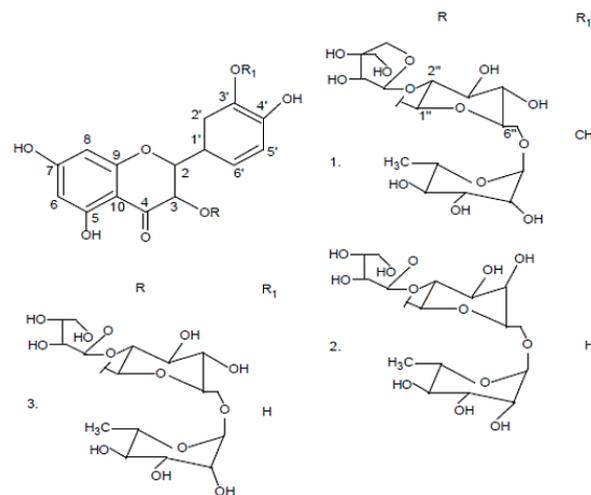


Figura 10. Estructura de *flavonol-apiosidos* aislados de las semillas de *Ch. pallidicaule*: (1) isorhamnetina 3-O-β-D-apiofuranosil-(1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosil (1→6)]-β-D-glucopiranosido; (2) quercetin 3-O-β-D-galactopiranosido; (3) quercetin 3-O-β-D-apiofuranosilo (1→2)-O-[α-L-rhamnopyranosilo (1→6)]-β-D-glucopiranosido.

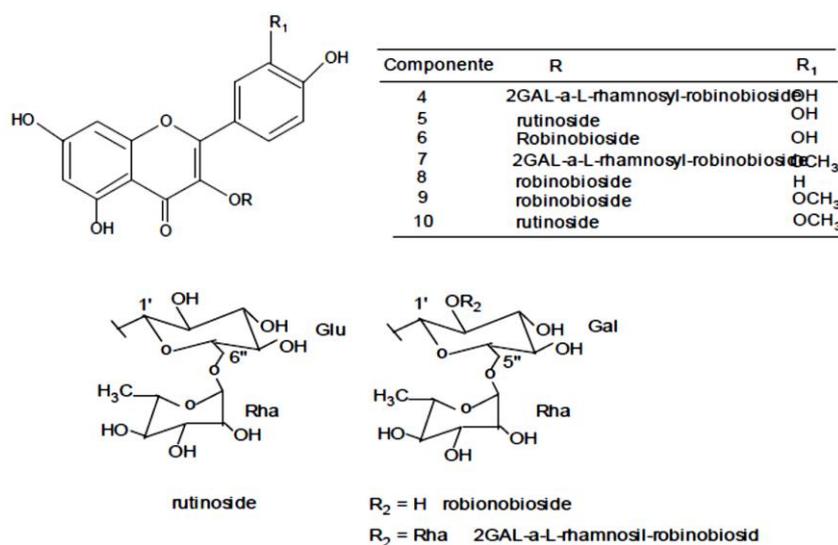


Figura 11. Flavonol-glucósidos (4-10) aislados de las semillas de *Ch. pallidicaule*

Fuente: (Rastrelli, De Simone, Schettino, & Dini, 1996)

3.4.5.2 Valor Nutricional

- a) **Agua.** El grano de cañihua posee un rango de humedad entre 10,0 y 12,4%, esta característica tiene importancia en la conservación y almacenamiento del grano por un tiempo relativamente prolongado.
- b) **Proteínas.** La Cañihua se compara favorablemente con otros cereales en cuanto a valores nutritivos. Su contenido de proteína varía entre 13 a 19 % y son del tipo albúmina y globulina, siendo este el componente más importante en las células, los tejidos y los músculos del cuerpo humano, así como de la sangre, de la piel y de todo los órganos internos, los huesos también están formados por proteínas de colágeno, sobre los que se asientan el calcio y otros minerales; no se almacenan en el organismo como las grasas o los hidratos de carbono (Mujica, 2002).
- c) **Fibra.** La cañihua contiene entre 3,8 y 10,2 g/100g de fibra en comparación con el trigo que tiene solamente 3g/100g, es un tipo especial de hidrato de carbono que no se absorbe (no pasa del intestino a la sangre) y por lo tanto el organismo no utiliza como fuente de energía, hasta una décadas, no se le otorgaba ninguna importancia fisiológica, en la actualidad se comprende que la fibra vegetal aparentemente inútil, actúa como una auténtica escoba en el intestino, absorbiendo toxinas y arrastrando sustancias nocivas como los ácidos biliares precursores del colesterol aunque no proporciona energía, ni pasa a la sangre, en un componente imprescindible en una dieta sana y equilibrada, porque evita el estreñimiento a obesidad, los trastornos intestinales, afecciones coronarias, entre otros (Mujica, 2002).
- d) **Carbohidratos.** El contenido de carbohidratos conocidos también como hidrato de carbono o glúcidos varía entre 56,41 y 65,2g/100g de grano en el campo de nutrición el empleo de los carbohidratos permite sobre todo ajustar la digestibilidad y es fuente de energía calórica del alimento (Mujica, 2002).
- e) **Grasas.** En el grano de cañihua el contenido de grasas o lípidos, que son compuestos químicos insolubles en el agua, varía de 4,5 a 8,4g/100g de grano, por ser de origen vegetal corresponde al tipo de ácidos grasos insaturados y son los más saludables en relación a los ácidos grasos saturados de origen animal, tienen la propiedad de

reducir la producción de colesterol en el organismo, el déficit de estos ácidos grasos se manifiesta por retraso en el crecimiento, sequedad de la piel y alteraciones nerviosas y genitales (Mujica, 2002).

Tabla 6. Composición por 100g de porción

	Cañihua amarilla	Cañihua gris	Cañihua hojuelas	Cañihua parda
Energía Kcal	340	344	379	340
Agua g	12,0	12,4	8,1	12,2
Proteína g	14,3	14,0	17,6	13,8
Grasa g	5,0	4,5	8,3	3,5
Carbohidratos g	62,8	64,0	61,7	65,2
Fibra g	9,4	9,8	11,0	10,2
Ceniza g	5,9	5,1	4,3	5,3
Calcio mg	87	110	171	141
Fósforo mg	335	375	496	387
Hierro mg	10,8	13,0	15,0	12,0
Tiamina mg	0,62	0,47	0,57	0,67
Riboflavina mg	0,51	0,65	0,75	0,30
Niacina mg	1,20	1,13	1,56	1,45
Ácido ascórbico	2,2	1,1	0,0	0,0

Fuente: (Mujica, 2002)

2.5 Aislados proteicos

2.5.1 Proteínas

Son compuestos químicos muy complejos que se encuentran en todas las células vivas: en la sangre, en la leche, en los huevos y en toda clase de semillas y pólenes. La composición elemental de las proteínas básicamente está conformada por nitrógeno, oxígeno, hidrógeno y carbono, además de azufre, y en algunos fósforos y hierro (Torres, 1987).

Las proteínas estructuralmente están formadas por la unión de ciertas sustancias llamadas aminoácidos, que los vegetales sintetizan a partir de los nitratos y las sales

amoniacaes del suelo. Existen 24 aminoácidos de los cuales 9 son denominados esenciales para la vida (la leucina, isoleucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, triptofano y para los lactantes se considera la histidina), y en las proteínas animales se encuentran en mayor cantidad (Simone, Dini, Pizza, Saturnino, & Schettino, 1990); (Drzewiecki et. al, 2003); (Girault, 1987).

Las proteínas se clasifican en: *homoproteínas* que constan sólo de aminoácidos y *heteroproteínas* que contienen aminoácidos y otros 20 compuestos no proteicos (grupos prostéticos). Las proteínas poseen una diversidad de funciones y se les clasifican en tres grupos (Badui, 1987):

- ❖ **Proteínas estructurales** (queratina, colágeno, elastina, etc.), que se encuentran en todos los tejidos: músculos, huesos, piel, órganos, etc.
- ❖ **Proteínas con actividad biológica**, que cumplen un papel activo en todos los procesos biológicos. Las más importantes son: enzimas, catalizadores específicos, hormonas, funciones transportadoras, las proteínas que protegen la sangre de los vertebrados y aquellas que desempeñan funciones de almacenamiento.
- ❖ **Proteínas alimentarias**, son aquellas que son digeribles, no tóxicas y organolépticamente aceptables para los seres humanos, estas no presentan un grupo especial, porque la mayor parte de las proteínas estructural o biológicamente activas antes descritas son proteínas de los alimentos.

2.5.2 Propiedades funcionales de las proteínas

Para el estudio de las proteínas, es importante conocer sus propiedades, las cuales nos permiten evaluar y/o predecir su comportamiento en las diferentes condiciones de trabajo para planificar y elaborar un método adecuado de extracción y aislamiento de proteínas. Entre las propiedades más importantes y significativas tenemos:

a) Solubilidad: La solubilidad de las proteínas en diversos disolventes está en función de factores físico químicos propios de cada polímero (peso molecular, estructura secundaria y terciaria, forma, composición de aminoácidos, ionización, etc.) y de factores del sistema en que se encuentran (pH, fuerza iónica, constante dieléctrica, temperatura, etc.), estas propiedades de las proteínas, permiten contribuir a que los

alimentos exhiban características deseables (Girault, 1987).

b) Desnaturalización: En un sentido termodinámico se refiere al cambio de un estado ordenado de las moléculas a otro desordenado, en este proceso se pierde las estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, desnaturalizándose así la estructura interna de la proteína. La desnaturalización puede ser producida por todos aquellos agentes que rompen los puentes de hidrogeno, los enlaces iónicos o hidrófobos como son: cambios de temperatura, pH, aumento de la tensión interfacial, adición de disolventes orgánicos, sales, etc. (Badui, 1987).

c) Hidratación: Al igual que otras sustancias orgánicas, las proteínas en estado seco tienden a retener una cierta cantidad de agua hasta alcanzar el equilibrio con la humedad relativa del medio que lo rodea, presentando diferentes capacidades de retención del solvente, es importante considerar la estructura terciaria de la proteína, pues la presencia de residuos hidrofílicos en el área externa, facilitara la interacción con el agua (Girault, 1987).

d) Gelificación: Es el proceso que se realiza en dos etapas, la primera de desenrollamiento y desnaturalización de las proteínas a elevadas temperaturas, y la segunda de formación de una red que retiene agua (cuyo resultado es un gel) y se lleva a cabo a bajas temperaturas (Kester & Fennema, 1986).

e) Viscosidad: La viscosidad depende de los factores extrínsecos como son la temperatura, el pH. La viscosidad es una medida de la resistencia que presentan los fluidos para moverse en un plano: es una función de la red u ordenamiento tridimensional de las moléculas y, por tanto, aumenta con la concentración del polipéptido. Al aumentar la temperatura se reduce la viscosidad ya que los puentes de hidrogeno se rompen, lo que lleva consigo que estos polímeros pierdan su hidratación, así mismo, cuando se acercan a su punto isoeléctrico se reduce la cantidad de agua retenida y con ello la viscosidad (Badui, 1987); (Girault, 1987).

Las propiedades funcionales típicas, desempeñadas por las proteínas en un sistema alimenticio, son presentadas en la tabla 7.

Tabla 7. Propiedades funcionales de proteínas en alimentos

Propiedad Funcional	Modo de acción	Sistema alimenticio
Solubilidad	Solvencia de proteínas dependiendo del pH	Bebidas
Absorción y fijación de agua	Enlace hidrógeno H-OH	Carnes, embutidos, panes y cakes
Viscosidad	Espesante: fijador del HOH	Sopas, salsas
Gelificación	Formador de la matriz proteica y endurecedor	Carnes, cuajos, quesos
Cohesión-adhesión	La proteína actúa como material adhesivo	Carnes, embutidos y pastas
Elasticidad	Enlace hidrofóbico en gluten, enlace disulfuro en geles (deformables)	Carnes, productos de pastelerías
Emulificación	Formación y estabilización de emulsiones de grasa	Embutidos, sopas, cakes
Absorción de grasas	Fijación de grasa libre	Carnes, embutidos
Espumante	Forma redes estables para atrapar gas	Cubiertas batidas de postres, cakes, chiflon

Fuente: Drzewiecki, et. al (2003).

2.6 Biopelículas

Las películas comestibles son consideradas como una capa continua y delgada de un material polimérico que puede incrementar la vida útil y mejorar los atributos sensoriales de un sistema alimentario (González, Urbina, & Alcázar, 2015).

Según estudios de Krochta y Mulder, 1997, una película comestible se define como aquella capa delgada de material comestible formada sobre un alimento como un recubrimiento, o colocada (lo que implica que debe ser preformada) sobre o entre los componentes de los alimentos. Ambos sistemas ofrecen una barrera selectiva a la migración de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aromas, lípidos, etc.; además pueden servir como agentes acarreadores de otros ingredientes o aditivos (antioxidantes, saborizantes, antimicrobianos y colorantes) para mejorar el potencial de conservación y las características de manejo del alimento. En algunos casos las películas comestibles con buenas propiedades mecánicas pueden llegar a sustituir las películas de empaque sintéticas.

En términos generales, las películas y recubrimientos comestibles son elaborados a base

de fuentes renovables tales como carbohidratos, lípidos y proteínas (Lim, Mine, & Tung MA, 1999). Entre estos materiales poliméricos, la goma gelana se ha empezado a utilizar en la elaboración de películas comestibles debido a sus propiedades espesantes y gelificantes (González, Urbina, & Alcázar, 2015).

(Kester & Fennema, 1986) Cita que las películas comestibles no están diseñadas con la finalidad de reemplazar los materiales de empaques sintéticos ni a las películas no comestibles, señalando que la importancia de las películas comestibles recae en la capacidad de actuar como un conjunto para mejorar la calidad del alimento en general, extender el tiempo de vida de anaquel y mejorar la eficiencia económica de los materiales para empaquetamiento. Lo antes descrito comprende que las películas cumplan con los siguientes requisitos:

- ❖ Alta eficiencia mecánica y de barrera
- ❖ Tener cualidades sensoriales
- ❖ Estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiana suficiente
- ❖ No tóxicas
- ❖ Tecnología simple
- ❖ No contaminantes
- ❖ Bajos costos de materiales y procesos.

2.6.1 Interacción de película entre quitosano y proteína

Las interacciones químicas entre el quitosano y las proteínas se dan por la presencia de grupos nucleofílicos como OH, NH₂ en el quitosano y los grupos COOH, NH₂ en la proteína, así como los enlaces heteroátomos-hidrógenos polarizados. Entre las interacciones más importantes están las del tipo de enlace puentes de hidrógeno así también enlaces iónicos interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals; siendo las primeras las más representativas (Sionkowska, Wisniewskia, Skopinska, Kennedy, & Wess, 2004) , por ejemplo:

- ❖ Entre dos grupos hidroxilo (HO-HO).
- ❖ Entre el hidrógeno del grupo amina de la proteína y los oxígenos de los grupos hidroxilo del quitosano y viceversa (HO-HN).
- ❖ Entre el hidrógeno sobre el nitrógeno de la amina del quitosano y el grupo carbonilo de la proteína (C=O-HN).

En la Figura 12, se muestra la posible interacción entre el quitosano y una proteína (sección del aminoácido prolina). Una de las propiedades que caracteriza al quitosano es su grado de saturación, el cual está directamente relacionado con el proceso de hidrólisis de los grupos acetamido de la quitina (CH_3CONH) hasta grupos aminos (NH_2), la cual lleva a la obtención del quitosano. De acuerdo a esto se puede esperar un comportamiento distinto en lo que se refiere a los posibles enlaces que ocurre con la proteína. A mayor masa molar existe mayor cantidad de grupos aminos o acetilos disponibles para enlazarse con la proteína (Medina M, 2005).

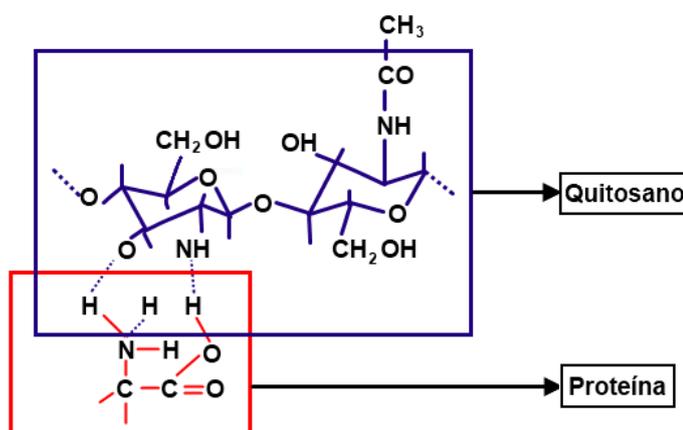


Figura 12. Interacciones propuestas entre el quitosano y proteína.

Fuente: Medina (2005).

2.6.2 Películas comestibles

Las películas comestibles se pueden definir como una o varias capas que pueden ser consumidas por los seres vivos y funcionan a la vez como barrera a la transferencia de agua, gases y solutos de alimentos. Los recubrimientos y films han sido usados por muchas décadas para proteger a los alimentos del ataque microbiológico y para prevenir la pérdida de agua durante el almacenamiento, lo que ha intensificado la investigación del comportamiento de estos de acuerdo a su formulación y procesos seguidos en su elaboración (Morey & Quinde, 2012).

Por otro lado las películas comestibles cumplen funciones importantes, (Kester & Fennema, 1986) consideran que las películas comestibles no están diseñadas con la finalidad de reemplazar los materiales de empaques sintéticos ni a las películas no comestibles, señalando que la importancia de las películas comestibles recae en la capacidad de actuar como un conjunto para mejorar la calidad del alimento en general,

extender el tiempo de vida de anaquel y mejorar la eficiencia económica de los materiales para empaquetamiento. Lo antes descrito comprende que las películas cumplan con los siguientes requisitos:

- ❖ Alta eficiencia mecánica y de barrera
- ❖ Tener cualidades sensoriales
- ❖ Estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiana suficiente
- ❖ No tóxicas
- ❖ Tecnología simple
- ❖ No contaminantes
- ❖ Bajos costos de materiales y procesos.

El Quitosano puede ser solubilizado en soluciones diluidas de ácidos minerales como el clorhídrico o ácidos orgánicos como el acético, láctico y cítrico. Una vez disueltos, los films de Qo se forman simplemente mediante la evaporación del solvente. Esta capacidad se debe a la formación de puentes de hidrógeno intra e intermoleculares en las cadenas de Qo (Ritthidej, Phaechamud, & Koizumi, 2002).

El quitosano, en su calidad de polímero formador de películas comestibles biodegradables, es mirado como una potencial alternativa para reemplazar al plástico como medio de empaque, lo que sin duda, se traduce en un mayor cuidado al medio ambiente (Hoyos & Urreco, 1997). Por otra parte, el quitosano es un biopolímero que forma películas con excelentes propiedades mecánicas, adhesivas y de permeabilidad, además de poseer propiedades antimicrobianas (Khan, Peh, & Ch'ng, 2000).

Las películas de quitosano son transparentes, firmes y algo flexibles y de buena barrera al oxígeno y se forman por moldeo de solución acuosa. Las películas basadas en quitosano protegen los alimentos de la degradación por hongos y modifican la atmósfera de frutos frescos (Sebti, Martial G, Carnet P, Grelier, & Coma, 2005). El comportamiento de la permeabilidad de la película determina la forma en que se liga el agua lo que afectará el comportamiento mecánico y de permeabilidad de las películas, con el objeto de formar un complejo polielectrolito, ambos polímeros tienen que estar ionizados y presentar sus cargas opuestas (Tapia, 2005).

Tabla 8. Propiedades funcionales de la Película Comestible

Función	Efecto	Tipo adecuado de película
Reducir la pérdida de humedad	La velocidad de pérdida de peso se vuelve más lenta, así como la aparición de efectos desagradables en la apariencia por la deshidratación; ablandamiento y encogimiento del alimento.	Lípido, compuesta
Reducir la migración de aceites y grasas	Disminuye la migración hacia la superficie de aceites y grasas y alimentos fritos, contribuyendo a mantener un aspecto físico aceptable.	Hidrocoloide
Reducir el transporte de gases (CO₂ y O₂)	Afectan la velocidad de transferencia de los gases, sobre todo en frutas y verduras, afectando la velocidad de respiración de estas en las etapas de almacenamiento.	Hidrocoloide, lípido o compuesta
Reducir el transporte de solutos	Se reduce la pérdida de solutos propios en el alimento en procesos de deshidratación osmótica, así como también se reduce la entrada de solutos ajenos al alimento.	Hidrocoloide, lípido o compuesta
Mejorar las propiedades mecánicas y de manejo de los alimentos	Permite obtener ventajas para el almacenamiento y transporte de frutas y verduras en la post cosecha. Es importante la adhesividad de la película dentro de esta función.	Hidrocoloide, lípido o compuesta
Proveer integridad estructural a los alimentos	Al reducir la velocidad de pérdida de humedad y de la tasa de respiración, se logra mantener las características de textura y firmeza del alimento. Retardo en los procesos de deterioro del fruto.	Hidrocoloide, lípido o compuesta
Retener los componentes volátiles	Las propiedades de barrera, permiten preservar por más tiempo los componentes volátiles del alimento sobre el cual se aplica la película, lográndose efectos positivos en las características organolépticas durante el almacenamiento.	Hidrocoloide, lípido o compuesta
Contener aditivos	Las películas pueden contener aditivos, que contribuyan a los procesos de conservación del alimento, mejorando las propiedades de la película o recubrimiento.	Hidrocoloide, lípido o compuesta

Fuente: Bósquez (2003).

3.6.3 Aplicación de biopelículas

Las biopelículas, tienen diversas aplicaciones en el área de alimentos, los cuales se muestran en la tabla 9:

Tabla 9. Recubrimientos comestibles aplicados a frutas y hortalizas

Aplicación	RC	Función	Referencia
Mango	Quitosano Almidón de papa y yuca	Reducción en la pérdida de agua, propiedades sensoriales y se inhibió el crecimiento de microorganismos. Mantuvo la apariencia, color, firmeza y reducción de respiración.	(Chien et al., 2007) (Navarro et al., 2011)
Banano	Ácido ascórbico, cloruro de Calcio, cisteína, Carragenina	Reducción del pardeamiento enzimático y mantenimiento de la firmeza.	
Brócoli	Quitosano	Reducción de la carga microbiana mesófila.	
Manzana	Alginato, goa gellan	Reducción de pérdida de humedad. Ralentización de la respiración.	(Rojas-Graü et al., 2007)
Zanahoria	Cera de abeja, gomas (Guar y Xanthan), aceite de canola, tintura de propóleo.	Inhibición del crecimiento de mohos y levaduras. Reducción de pérdida de peso y color.	Moreno Herrera, 2013
Fresa	Mucílago de cactus Quitosano Quitosano, almidón con aceite esencial de canela	Mantuvo la textura, color y atributos sensoriales. Barrera a los gases, reducción de pérdida de humedad y efecto antifúngico. Mantuvo el contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante. Retrasó el desarrollo microbiano.	(Del-Valle et al., 2005) (Assis y Pessoa, 2004) (López et al., 2012)
Pera	Metilcelulosa	Reducción del pardeamiento.	(Olivas et al., 2003)
Tomate	Cera de laurel, aceite de oliva, Tween 80, propilenglicol, glicerol, glucosa	Buenas características funcionales y mecánicas. Reducción de la pérdida de peso, una mayor firmeza y buena apariencia.	Andrade et al., 2014

Fuente: Revista Ciencias Técnicas Agrícolas (2015).

Según Hoyos (1997), la aplicación de recubrimientos de quitosano se ha utilizado para aumentar la vida útil de diversas frutas como: peras, naranjas, melocotón y ciruelas como barrera para el dióxido de carbono y el oxígeno. Las coberturas de quitosano se han utilizado también en las semillas de trigo con el fin de incrementar la producción en el cultivo; por otro lado estudios realizado por Chunran (2005) presentaron resultados

favorables al aplicar películas de solución de quitosano al 1% en frambuesas, también estudios relacionados a la efectividad de las películas basadas en quitosano aplicadas a frambuesas, éstas son altamente percibles debido a su alta tasa de respiración y su vulnerabilidad al ataque de hongos,

2.7 Recubrimiento de alimentos

El recubrimiento de alimentos a base películas de quitosano, son una alternativa de gran importancia, es biodegradable, no tóxico, biocompatible, comestible y antimicrobiano; una de las propiedades más interesantes del quitosano es su capacidad de formación de películas fuertes, flexibles, transparentes, resistentes a las grasas y aceites, y con buenas propiedades mecánicas y de permeabilidad y, además, estos recubrimientos tienen ventajas adicionales debido a que son antimicrobianas.

Las cubiertas comestibles pueden ser aplicadas directamente a la superficie del alimento como una barrera adicional de protección para mantener la calidad y estabilidad de un alimento. Para el caso de frutas y vegetales, los recubrimientos con polímeros comestibles y biodegradables ofrecen una alternativa de empaque sin causar daño al medio ambiente (Pachence, Bohrer, & Kohn, 2007).

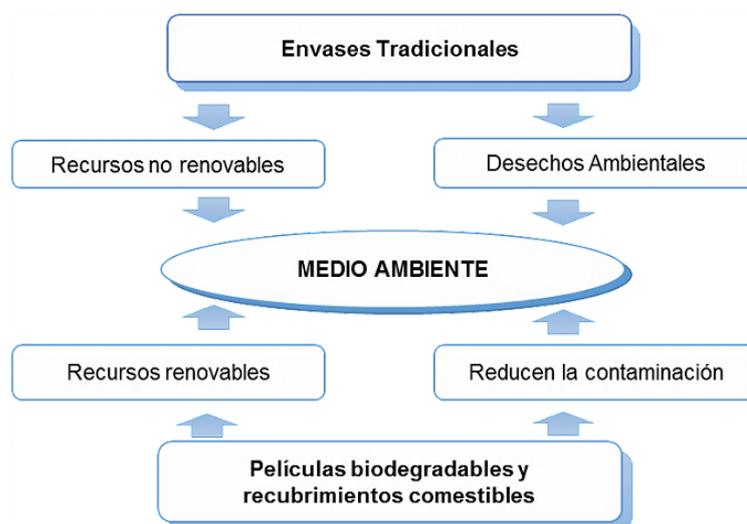


Figura 13: Película biodegradable

Fuente: Bósquez (2003).

La actividad antimicrobiana del quitosano es de amplio espectro y por lo tanto es capaz de actuar contra un número considerable de bacterias (Gram positivas y Gram

negativas), hongos filamentosos y levaduras. Durante años se han llevado a cabo investigaciones (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010), (Martínez, Cortez, & Ezquerro, 2010), (Dutta & Mehrotra, 2009) con el fin de conocer el mecanismo mediante el cual el quitosano ataca los microorganismos y los principales factores que influyen en éste. De esta forma, se ha encontrado que la actividad antimicrobiana es una característica que depende de diversos factores entre los que se cuentan: los factores microbianos, factores intrínsecos del quitosano, estado físico y factores ambientales.

Factores microbianos: La actividad antimicrobiana del quitosano será diferente dependiendo del tipo de microorganismo contra el cual se esté trabajando y la edad celular del mismo. Cada microorganismo, bien sea una bacteria (Gram positiva o Gram negativa), un hongo o una levadura posee una estructura celular diferente y con el tiempo ésta también varía, haciendo que la efectividad del quitosano para combatir a los microbios sea también diferente.

Actividad antimicótica: El quitosano suprime la esporulación, evitando la reproducción de los hongos. Ésta característica se ve favorecida por valores bajos de pH.

Actividad antibacterial: En general las bacterias son menos sensibles que los hongos a la actividad antimicrobiana del quitosano y existen también discrepancias entre las bacterias Gram positivas y Gram negativas debido a las diferencias superficiales entre éstas.

Las bacterias Gram negativas poseen una membrana externa que contiene Lipopolisacáridos (LPS), los cuales le confieren un carácter hidrofílico y poseen además grupos aniónicos (fosfatos y carboxilos) que le brindan estabilidad a través de su interacción con grupos catiónicos de la célula. Se convierte la membrana externa entonces, en una barrera contra compuestos hidrofóbicos, haciendo resistente a las bacterias contra antibióticos de este tipo y contra drogas tóxicas.

Por su parte, la pared celular de las bacterias Gram positivas se componen de peptidoglicano y ácido teicoico, este último es un polímero polianiónico responsable de la estabilidad estructural de la pared.

La actividad antibacterial del quitosano depende entonces de las características superficiales de las células. Es necesario tener en cuenta que una célula microbiana no se puede concebir como una superficie lisa y uniforme, sino que ésta es un complejo heterogéneo formado por diferentes compuestos orgánicos, que dependiendo de su naturaleza van a interactuar de forma diferente con el quitosano, haciendo más o menos eficiente la actividad antimicrobiana del mismo.

Factores intrínsecos: Existen también características propias del quitosano que influyen directamente en su actividad antimicrobiana; por ejemplo, dependiendo del proceso y las condiciones de obtención, este biopolímero adquiere un mayor o menor Grado de Desacetilación (GD) y por consiguiente una Densidad de Carga Positiva (DCP) mayor o menor. Así, con un GD del 97.5%, la DCP aumenta, incrementando la actividad antimicrobiana (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010).

Otros aspectos que no se pueden descartar a la hora de evaluar la actividad antimicrobiana del quitosano y sus derivados son sus variaciones hidrofílicas y lipofílicas, así como su morfología (tamaño de partícula, espesor, etc.) en estado sólido o en solución, características que modifican la forma cómo el biopolímero interactúa con las células de las bacterias y los hongos, conduciendo a resultados diferentes en la capacidad inhibitoria.

Mecanismo de acción antibacterial: Los mecanismos mediante los cuales el quitosano y sus derivados ejercen su actividad antimicrobiana no son aun comprendidos en su totalidad. Actualmente se cuenta con algunas hipótesis, las cuales dan a entender la manera en que este biopolímero afecta la estructura celular de los microorganismos, provocando su muerte y/o inhibiendo su crecimiento y reproducción.

En términos generales, el mecanismo mediante el cual un agente bactericida catiónico actúa se puede resumir en los siguientes pasos:

- ❖ Adsorción en la superficie celular de las bacterias.
- ❖ Difusión a través de la pared celular.
- ❖ Adsorción en la membrana citoplasmática.
- ❖ Ruptura de la membrana citoplasmática.
- ❖ Salida de los compuestos constituyentes del citoplasma.

❖ Muerte celular.

En el caso particular del quitosano se ha encontrado que reduce la tasa de crecimiento de las bacterias, además, afecta los procesos de generación de energía dentro de la célula, causando un inadecuado funcionamiento de todo el aparato celular. De esta forma, se han planteado (Martínez, Cortez, & Ezquerro, 2010), tres modos de operación con el fin de explicar las propiedades antimicrobianas del biopolímero, los cuales se describen brevemente a continuación:

a) El quitosano es un polímero en cuya estructura existe un número de cargas positivas que se debe a la presencia de grupos amino. Estas cargas positivas interactúan con las cargas negativas de las macromoléculas constituyentes de la membrana celular, interfiriendo con el intercambio de nutrientes, vital para la célula.

Las cargas positivas del quitosano compiten además con el Calcio por los sitios electronegativos en la membrana celular, causando inestabilidad de la misma y comprometiendo su integridad, generando liberación de material intracelular y finalmente la muerte de la célula. En el caso del quitosano de alto peso molecular (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010), soluble en agua y el quitosano sólido (incluyendo nano partículas), se presenta una interacción del biopolímero con la superficie celular que altera su permeabilidad o puede formarse una capa impermeable que impide el transporte de solutos esenciales para la célula.

b) El quitosano puede actuar como un agente quelante (Dutta & Mehrotra, 2009) creando nuevos compuestos a partir de metales esenciales para la célula, impidiendo que ésta los aproveche, causando descompensación celular por la ausencia de nutrientes y consecuentemente la muerte del microorganismo.

c) El quitosano soluble en agua y de bajo peso molecular (incluyendo nano partículas ultra finas) es capaz de penetrar la pared celular, ingresar al núcleo de las células, interactuar con el ADN e inhibir la síntesis de ARN mitocondrial, impidiendo la transcripción del ADN, la síntesis de proteínas y desestimulando la acción de varias enzimas (Kong, Chen, Xing, & Park, 2010).

La actividad antimicrobiana de las películas de quitosano se ve influenciada por características intrínsecas como el tipo de quitosano, el grado de polimerización, la composición de nutrientes de los sustratos y las condiciones ambientales. Además, a la hora de explicar el mecanismo de acción se deben tomar en cuenta factores como las condiciones anaeróbicas y de asfixia (Martínez, Cortez, & Ezquerro, 2010); (Dutta & Mehrotra, 2009).

2.7.1 Ventajas y propiedades que presentan los recubrimientos comestibles

Un RC o PC es un material de envoltura (empaque) delgado empleado en la industria de alimentos y que puede ser consumido como parte del mismo, debido a que proviene de polímeros biodegradables, no tóxicos y que ayudan a incrementar la calidad de los alimentos durante su conservación (Sánchez G, Pastor, Vargas, Chiralt, & González M, 2011). Por otra parte (Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz, & Ibarz, 2011) las películas y recubrimientos deben presentar ciertas exigencias funcionales que permitan controlar o aminorar las causas de alteración de los alimentos a recubrir, algunas de estas ventajas y propiedades son:

- ❖ Ser libres de tóxicos y seguros para la salud.
- ❖ Deben requerir una tecnología simple para su elaboración.
- ❖ Ser protectores de la acción física, química y mecánica.
- ❖ Presentan propiedades sensoriales: deben ser transparentes y no ser detectados durante su consumo.
- ❖ Mejoran las propiedades mecánicas y preservan la textura.
- ❖ Prolongan la vida útil de alimentos a través del control sobre el desarrollo de microorganismos.
- ❖ Pueden regular distintas condiciones de interfase o superficiales del alimento, a través del agregado de aditivos como antioxidantes, agentes antimicrobianos y nutrientes.
- ❖ Presentan propiedades de barrera como transferencia de distintas sustancias, adecuada permeabilidad al vapor de agua, solutos y una permeabilidad selectiva a gases y volátiles, desde el alimento hacia el exterior y viceversa.

2.7.2 Métodos de conservación de alimentos

En la tabla 10 se presentan los diferentes métodos de conservación de alimentos, para el

caso de la fresa se determinó llevar a cabo la conservación mediante el uso de una biopelícula con actividad antioxidante como recubrimiento alimentario sobre el fruto.

Tabla 10. Recursos para conservar los alimentos.

Recursos físicos y químicos		Casos de aplicación
Modificación de la temperatura	Escaldado Pasteurización Esterilización Almacenamiento en frío Almacenamiento en congelador	Frutas, hortalizas Leche, productos frutícolas, cerveza Conservas: lácteas, hortícolas, cárnicos Frutas, hortalizas, carnes y pescado Carnes, pescado, frutas, hortalizas, pan
Extracción de humedad	Desecado Liofilizado Refrigeración en vacío Espesado/desecado Salazón Salmuera Azucarado	Hortalizas, frutas, café, pastas, tabaco Hortalizas, frutas, leche, carne, pescado Zumos de frutas, zumos de hortalizas Extractos de carne, leche, zumos de fruta Carne, tocino, pescado, mantequilla Carne, pescado Confituras, mermeladas, gelatinas
Actuación de sustancias conservantes	Ahumado Uso de alcohol Adición de conservantes alimenticios	Carne, embutidos, pescado Licores, vino Mermeladas, margarina, pan, preparados de frutas
Disminución de pH	Acidificación	Hortalizas, frutas, carnes, pescado
Reducción del grado de actuación del aire (Oxígeno)	Almacenamiento en atmosfera modificada Almacenamiento en atmosfera con gas a presión Empleo de grasas y aceites	Huevos, futas Leche, zumos de frutas Conservas de pescado, semiconservas

Fuente: Horst (2001).

2.7.3 Recubrimientos de frutas y hortalizas

Los recubrimientos comestibles se han utilizado desde hace tiempo para mantener la calidad y extender la vida de anaquel de algunas frutas y hortalizas, tales como cítricos, manzanas y pepinos. Las frutas y hortalizas son frecuentemente cubiertas al sumergir o asperjar un variado número de materiales comestibles. De esta manera, se forma una membrana semipermeable en la superficie para reducir la respiración, controlar la pérdida de humedad y proporcionar otras funciones (Eissa, 2007). Una variedad de

materiales comestibles, incluyendo lípidos (Famá, Rojas, Goyanes, & Gerschenson, 2004), polisacáridos, y proteínas, solos o en combinaciones, se han formulado para producir recubrimientos comestibles. Los recubrimientos a base de lípidos hechos de monoglicéridos acetilados (AM), ceras (cera de abeja, carnauba, candelilla, parafina, y salvado de arroz) y surfactantes se han utilizado exitosamente en frutas y hortalizas enteras, para reducir la superficie de abrasión durante el manejo y como barrera ante la pérdida de humedad. Suspensiones coloidales de aceites o ceras dispersas en agua fueron la primera formulación típica como recubrimiento para frutas (Valverde, et. al, 2005).

Los recubrimientos formulados apropiadamente pueden ser utilizados en la mayoría de los alimentos para responder a los retos asociados con la estabilidad de la calidad, seguridad comercial, valor nutrimental y los costos económicos de producción. A reserva de la industria de productos frescos, los beneficios potenciales de utilizar recubrimientos comestibles incluyen (Figura 14):

1. Proporcionar una barrera contra la pérdida de humedad en la superficie del producto.
La pérdida de humedad durante el almacenamiento postcosecha de productos frescos lleva a la pérdida de peso y a cambios de textura, sabor, y apariencia.
2. Proporcionar una barrera de gases suficiente para controlar el intercambio gaseoso entre el producto fresco y la atmósfera que lo rodea, lo que retardará la respiración y el proceso de deterioro. La función como barrera gaseosa podría retardar la oxidación enzimática y proteger a los productos frescos de la decoloración por encafecimiento y ablandamiento de textura durante el almacenamiento.
3. Restringir el intercambio de compuestos volátiles entre el producto fresco y el ambiente que lo rodea al proporcionar barreras gaseosas, que previenen la pérdida natural de compuestos volátiles de sabor, color de productos frescos y la adquisición de olores extraños.
4. Proteger de daño físico causado por impacto mecánico, presión, vibraciones y otros factores mecánicos.
5. Actuar como acarreadores de otros ingredientes funcionales, tales como agentes antimicrobianos, antioxidantes, nutraceuticos, ingredientes de color y sabor para reducir la carga microbiana, retardar la oxidación y decoloración y mejorar la calidad (Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz, & Ibarz, 2011).



Figura 14. Propiedades funcionales de un recubrimiento comestible en frutas y hortalizas frescas.

Fuente: Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz, & Ibarz (2011).

El mecanismo por el cual los recubrimientos conservan la calidad de frutas y vegetales es debido a que crean una barrera física a los gases, permitiendo modificar la atmósfera interna de la fruta y de esta manera retardar la maduración y senescencia (Rojas, 2006). El desarrollo de recubrimientos a base de polisacáridos ha conllevado un incremento significativo en la industria alimenticia por las variedades de aplicaciones que estos confieren y en la magnitud de productos que pueden ser tratados, entre los polisacáridos más utilizados en la elaboración de PC y RC se encuentran los derivados de la celulosa, el almidón, quitosano, alginato, carragenina, pectina, entre otros (Cagri, Ustunol, & Ryser, 2004). Ellos presentan una interesante alternativa debido a su fácil procesamiento, bajo costo, abundancia, no tóxico, y fácil manipulación, lo que ayudaría a las necesidades de alcanzar una agricultura sostenible (Bautista, Velázquez, Hernández, & Hernández, 2005).

La utilización de polímeros comestibles y biodegradables tiene mayor interés a partir de macromoléculas de origen natural; aunque el uso de biopolímeros parece algo novedoso, la realidad es que ya se empleaban en la antigüedad, aunque quizás con otra perspectiva. Durante los siglos trece y catorce, ya se practicaba en China el recubrimiento de naranjas y limones por inmersión en ceras para retardar la pérdida de agua y con igual fin se recubría la carne con manteca en Inglaterra en el siglo dieciséis y desde 1930 en Estados Unidos se empezó a utilizar comercialmente la cera en naranjas y manzanas para mejorar su presentación y calidad, reducir la pérdida de agua o aplicar fungicidas superficiales para retardar sus modificaciones (Cagri, Ustunol, & Ryser, 2004).

2.7.3.1 Fresa

Según Flórez y Mora (2010) la fresa es catalogada como una especie hortícola herbácea, aunque las raíces funcionales, hojas y otros órganos se forman sobre la parte leñosa de la corona, similar a lo que ocurre en una especie caducifolia. La fresa puede ser considerada como una planta perenne y leñosa de vida corta a la cual se le aplican los mismos parámetros fisiológicos de los árboles y arbustos de hoja caduca.

Es una fruta de apariencia atractiva y exquisito sabor, es altamente perecedera y con una vida pos cosecha corta debido a la fragilidad de sus tejidos, el rápido marchitamiento del cáliz, la susceptibilidad a infecciones, el elevado contenido de agua y la alta tasa de respiración. La fresa es un fruto no climatérico y por consiguiente la madurez organoléptica se alcanza solamente en la planta.

2.7.3.2 Estado de maduración de la fresa



Figura 15. Estados de maduración de la fresa

Fuente: Instituto Colombiano de Normas Técnicas, NTC 4103.

Tabla 11. Fisiología pos cosecha de la fresa

Proceso Fisiológico	Descripción
Producción de etileno	Muy baja $<0,1 \text{ mL/Kg/h}$
Tasa respiratoria	Alta 50 a 100 mL $\text{CO}_2 / \text{Kg/h}$ a 20°C en las primeras 48 horas. Los valores se reducen a rangos entre 25 y 50 mL $\text{CO}_2 / \text{Kg/h}$ a 10°C y entre 6 y 10 mL $\text{CO}_2 / \text{Kg/h}$ a 0°C .
Transpiración	Alta debida a la fragilidad de la epidermis. Las pérdidas de peso entre el 3 y 6% se traducen en disminución de brillo y de la frescura del fruto.
Maduración	El desarrollo de las propiedades organolépticas como el color, los sólidos solubles totales, la acidez titulable, el índice de madurez, la jugosidad, el aroma, la textura y la firmeza depende de la variedad, las condiciones climáticas y el manejo del campo.

Fuente: Flórez & Mora (2010).

De acuerdo con la figura 15 y la tabla 11 es posible identificar cambios presentes en el fruto a medida que madura, así mismo se pueden observar características de la fresa en cuanto a la producción de etileno y la tasa respiratoria.

2.7.3.3 Parámetros de uso de fresa

a) Maduración: El acetileno es la sustancia responsable de la llevar a cabo la maduración de los frutos, puede ser producido por las mismas o añadido a los alimentos previamente a su venta (Vaclavik, 2002). Para determinar el estado de madurez de un fruto se realiza por medio de la relación entre el valor mínimo de los sólidos solubles totales y el valor máximo de la acidez titulable, expresado como $^\circ\text{Bx}/\% \text{ácido cítrico}$.

b) Empaque: Citado por Flórez y Mora (2010) los empaques finales de la fresa para el consumo en fresco son recipientes de plástico, de cartón comprimido o madera con un contenido neto de 250, 500, 1000 y 2000g y cuentan con orificios que permiten la circulación de aire.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Diseño metodológico

3.1.1 Tipo y diseño de investigación

El presente trabajo de estudio corresponde al tipo experimental y con diseño experimental (3^k). Este diseño permite seguir la secuencia completa de los pasos que se debe tomar para asegurar la obtención de toda la información relevante y adecuada con respecto a los variables. El diseño implica los siguientes factores experimentales y el rango de valores y se calcula mediante la siguiente expresión:

$$M = m^n$$

$$M = 3^2 = 9$$

Dónde:

M = Número de experimentos

m = Número de niveles

n = Número de variables

En la tabla 12, según Software STATGRAPHICS, se tiene los factores y niveles del desarrollo de las pruebas experimentales:

Tabla 12. Combinaciones para el recubrimiento de fresa

Nº Experimentos	Quitosano (g)	Cañihua (g)
1	0,1	0,01
2	0,2	0,01
3	0,3	0,01
4	0,1	0,02
5	0,2	0,02
6	0,3	0,02
7	0,1	0,03
8	0,2	0,03
9	0,3	0,03

Fuente: Software de STATGRAPHICS.

Según tabla 12, se realiza 9 pruebas de experimento de recubrimiento de fresa, de acuerdo al análisis de STATGRAPHICS para un peso de Quitosano de langostino 0,1;

0,2 y 0,3 (g); y peso de proteína de cañihua 0,01; 0,02 y 0,03 (g).

3.1.2 Población y muestra

La población de estudio está conformada por las escamas de langostino que fueron obtenidas de los residuos generados por el frigorífico UNA-PUNO y la muestra de Cañihua son procedentes de la provincia de Ilave.

Muestra representativa está constituido por 200 g de escamas de Langostino y 100 g de Cañihua.

Materiales

a) Materiales de vidrio

- ❖ Fiolas: 50, 100, 500 y 1000 mL
- ❖ Probetas: 10, 15, 50, y 150 mL
- ❖ Vasos de precipitado
- ❖ Matraz Erlenmeyer: 50, 100, 250 mL
- ❖ Pipetas
- ❖ Mortero
- ❖ Embudo buchner
- ❖ Cápsula de porcelana
- ❖ Placas Petri de vidrio
- ❖ Embudos.
- ❖ Gradilla con tubos de ensayo
- ❖ Micropipetas
- ❖ Picnómetro

b) Reactivos químicos

- ❖ Acetato de potasio p.a.
- ❖ Ácido láctico 85% Merck
- ❖ Alcohol etílico (Etanol Absoluto) (C₂H₅O) p.a
- ❖ Hexano de grado técnico
- ❖ Hidróxido de sodio (NaOH) Merck
- ❖ Sulfato de potasio, Merck

- ❖ Ácido Clorhídrico HCl Merck
- ❖ Hipoclorito de Sodio NaClO (7%) Comercial
- ❖ Glicerol C₃H₈O₃
- ❖ Ácido Cítrico C₆H₈O₇
- ❖ Ácido Acético CH₃COOH Merck
- ❖ Fenolftaleína
- ❖ Biftalato de potasio Merck
- ❖ Heliantina
- ❖ Soluciones buffer 4, 7 y 10
- ❖ Tetrahidruro de boro y sodio (NaBH₄) Merck
- ❖ Ioduro de Potasio. Merck
- ❖ Yodo. Merck

c) Insumos y Utensilios

- ❖ Agua destilada
- ❖ Cubetas de plástico
- ❖ Espátulas
- ❖ Frascos de vidrio para almacenar muestras
- ❖ Papel filtro Whatman N°40, 42
- ❖ Pinzas
- ❖ Frascos de vidrio
- ❖ Tubos para centrífuga

d) Equipos e instrumentos

- ❖ Agitador Thermo Star A 2115. X32278
- ❖ Agitador eléctrico CAT, M6.1
- ❖ Balanza analítica Mettler Toledo, AB209 SWITZERLAND
- ❖ Centrífuga Heraeus Sepatech Suprafuge.
- ❖ Espectrofotometro Infrarrojo FT-IR con Transformada de Fourier. Marca: ZHIMADZU. Modelo: IR AFFINITY 1
- ❖ Estufa CORNELIUS DR 97113 1300U-2 USA
- ❖ Potenciómetro Thermo Scientific Orion Star A211. USA
- ❖ Refrigerador SANSUNG CFC-FREE
- ❖ Tamizador Erweka AR400

- ❖ Refractómetro
- ❖ Equipo Soxhlet

3.2 Metodología de investigación

3.2.1 Descripción de muestreo

Para la recolección de la muestra de escamas de langostino (*Penaeus kerathurus*), se zonificó el lugar del frigorífico UNA-PUNO, de los cuales se ha obtenido residuos generados de escamas de langostino, procedentes de la ciudad de Arequipa; la muestra de Cañihua (*Chenopodium pallidicaule*) se ha recogido de la Comunidad Campesina de San Juan de Queacachi de la provincia de El Collao; para los cuales se aplicó la técnica del muestreo aleatorio simple.

3.2.2 Variables

El presente informe de investigación consta de dos variables:

Variable independiente: Quitosano con aislado proteico de Cañihua:

Variable dependiente: Biopelícula para el envasado de alimentos.

3.3 Procedimiento del experimento

3.3.1 Obtención del Quitosano y aislado proteico de Cañihua

3.3.1.1 Quitosano

En la primera etapa se procede con el acondicionamiento de la materia prima:

- ❖ Los exoesqueletos de los crustáceos fueron proporcionados de forma gratuita por el Frigorífico de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno y fueron colocados en bolsas plásticas para poder ser trasladados al laboratorio de la facultad de Ingeniería Química.
- ❖ Se realizó un lavado con agua a temperatura ambiente para eliminar al máximo restos de carne, pellejos, colas, posteriormente se procedió a un lavado con agua a 80°C durante 20 minutos para retirar por completo residuos orgánicos y enjuagar con agua a presión varias veces.
- ❖ Ecurrir y secar en bandejas acondicionadas en espacio ventilado sin presencia directa de los rayos solares por un tiempo de tres días a temperatura ambiente, con

el propósito de eliminar toda la humedad posible.

- ❖ Moler en un molino de discos hasta un tamaño de partícula adecuado para la extracción de la quitina.
- ❖ Tamizar las escamas en una malla N° 60
- ❖ Almacenar en envases de vidrio.

a) Despigmentación o decoloración química: La materia prima molida se somete a un proceso de despigmentación o decoloración química, mediante el proceso:

Se prepara solución de NaClO de 3% p/v

- ❖ Para la despigmentación se utilizó una relación de 1:10 (Kg de escama por L de disolvente).
- ❖ Se pesa 100 g de harina de langostino y se coloca en un vaso precipitado, luego se adiciona el disolvente de 3% de NaClO, sometiéndose la mezcla a un proceso de agitación continua por un tiempo de 2 h a una temperatura de 30°.
- ❖ Posteriormente se procede a lavar varias veces con abundante agua destilada, hasta llegar a un pH neutro.
- ❖ Filtrar la muestra con una bomba de vacío y finalmente se secó a una temperatura ambiente por un tiempo de 12 h.

b) Desmineralización: El producto obtenido en la decoloración se somete a desmineralización en los siguientes pasos:

- ❖ Se prepara una solución de HCl 1N.
- ❖ Mezclar la materia desproteinizada con la solución HCl en una relación de 1:15 (Kg de sólido por 15 mL de solución).
- ❖ Agitar constantemente la mezcla a 350 rpm, durante 2.5 h a temperatura de 30°C.
- ❖ Lavar con abundante agua destilada hasta alcanzar un pH 7 y filtrar con una ayuda de una bomba al vacío.
- ❖ El producto ya neutralizado se seca a temperatura ambiente por un tiempo de 12 h.

c) Desproteinización: Se realiza el siguiente procedimiento:

- ❖ Se prepara una solución de NaOH al 5% (p/v).
- ❖ La materia prima desmineralizada se coloca en un vaso precipitado con la solución de hidróxido de sodio en una relación de 1:15 (g de sólido por 15 mL de solución).
- ❖ Agitar constantemente a 350 rpm por un tiempo de 2 h a temperatura de 80°C con

el fin de eliminar las proteínas presentes.

- ❖ Lavar el producto obtenido con agua destilada hasta alcanzar un pH 7, eliminando el exceso de base utilizada en el proceso (Para acelerar el proceso y poder llegar a un pH 7 se puede adicionar una solución de HCl a baja concentración).
- ❖ Luego se seca a una temperatura ambiente por un tiempo de 12 h.

d) Desacetilación de la quitina

Este es un proceso de modificación química de la quitina en el cual las unidades acetilo son sustituidas por grupos amino:

- ❖ Preparar una solución de NaOH al 50 % p/v.
- ❖ La materia prima obtenida en la desproteínización, se coloca en un vaso precipitado y se añade la solución de NaOH en relación de 1:15 (Kg de sólido por L de solución), la mezcla se mantiene en agitación constante durante 2 h, a una temperatura de 90°C.
- ❖ Por medio de la reacción química llevada a cabo en el paso anterior se obtiene como producto el biopolímero quitosano, el cual se llevó a un pH de 7 con un lavado por filtración con agua destilada, una vez alcanzada estas condiciones se seca a temperatura ambiente para eliminar la humedad y registrar su peso en seco.

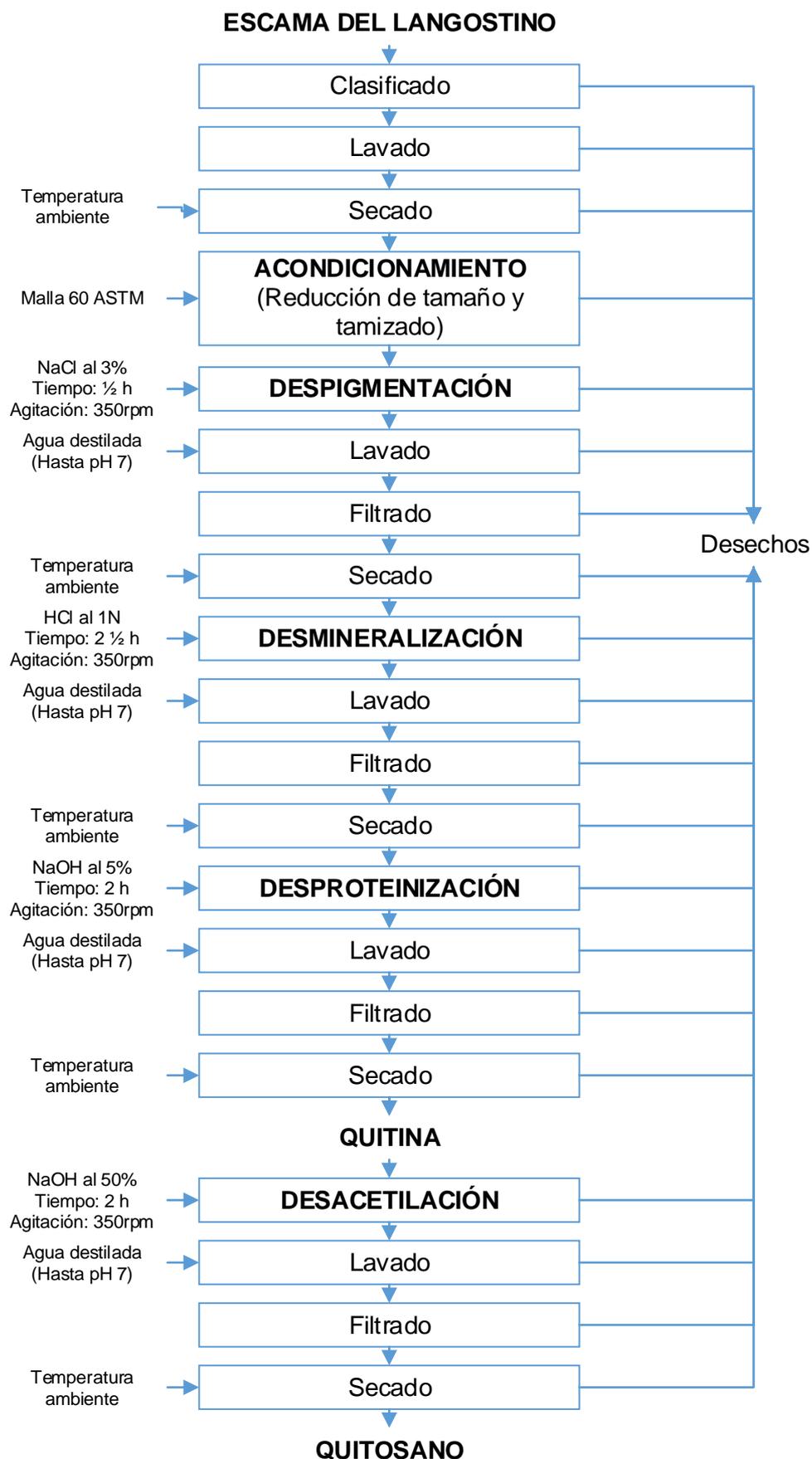


Figura 16. Diagrama de flujo para la elaboración de quitosano a partir de langostino.

3.3.1.2 Determinación del grado de desacetilación mediante el método de valoración potenciométrica

Para realizar este procedimiento se toma como referencia el trabajo de Vásquez, et al (2011), se realizan mediciones del pH con un potenciómetro marca THERMO CIENTIFIC modelo ORION STAR A211, con número de serie X13875; con el propósito de determinar el DD (Grado de desacetilación), el cual es equivalente al porcentaje de grupos amino (% NH₂) presentes en la cadena polimérica del quitosano para lo cual se realiza los siguientes procedimientos:

- ❖ Preparar una solución de HCl 0,20 N
- ❖ Preparar una solución de NaOH 0,25 M
- ❖ Pesar aproximadamente 0,5 g de quitosano
- ❖ Mezclar en un matraz Erlenmeyer el quitosano con 50 mL de HCl 0,20 N
- ❖ Agitar esta dispersión constantemente hasta disolver el quitosano por un lapso de tiempo de 2 h a temperatura ambiente.
- ❖ Adicionar unas gotas de una solución de fenoftaleina antes de la valoración, para poder observar el cambio en el primer punto de inflexión, pasado el punto final de la fenoftaleina se incorpora posteriormente el anaranjado de metilo para detectar el segundo punto final.
- ❖ Titular con una solución de NaOH 0,25M (previamente estandarizado).
- ❖ Medir con potenciómetro el cambio de pH que experimenta cada mezcla al añadir 2 mL de NaOH, después de cada adición se agita la solución, y registrar tanto el volumen añadido y el pH.
- ❖ En la proximidad de los puntos finales se agrega incrementos más pequeños de volumen del valorante más o menos de 0,1 a 0,2 mL, hasta adicionar un volumen de 60 mL de NaOH. Reportar resultados.
- ❖ Los resultados obtenidos se tabulan en una tabla, para determinar el punto final de la titulación, esto se determina calculando el cambio del potencial por unidad de cambio del volumen del reactivo (es decir $\Delta E/\Delta V$).
- ❖ Se grafica la curva de titulación de donde se obtiene dos puntos de inflexión, cuyos valores se determinan según el criterio de la primera derivada.
- ❖ Calcular la concentración del grupo amino, para posteriormente determinar el DD.

3.3.1.3 Caracterización del Quitosano mediante la determinación del espectro por FT-IR de procedente del Langostino y determinación del grado de desacetilación

La caracterización del quitosano obtenido de las escamas del langostino se realiza a través de la espectroscopia de infrarrojos, la cual se basa en la relación de absorbancias entre dos bandas de absorción, característica que le da el grado de desacetilación del quitosano a partir de la quitina obtenida de las escamas del langostino.

El análisis estructural del quitosano extraído de la quitina procedente de las escamas de langostino, se realiza empleando el equipo Espectrofotómetro Infrarrojo FT- IR con Transformada de Fourier, marca SHIMADZU, Modelo: IR AFFINITY 1 del laboratorio USAQ de la UNMSM de Lima, para lo cual se sigue el siguiente procedimiento:

- ❖ Preparar las muestras de quitosano en forma de discos con bromuro de potasio (KBr), para ello tomar 40 – 60 mg de polvo de quitosano y 120 mg de KBr. (Khan et al., 2002).
- ❖ Mezclar y triturar la muestra anterior en un mortero por 10 minutos.
- ❖ Compactar aproximadamente 40 mg de la mezcla en forma de disco mediante una prensa hidráulica de infrarrojo a una presión de 8 toneladas por 6 segundos.
- ❖ Colocar los discos en un horno a 80 °C por 16 horas antes del análisis.
- ❖ Preparar el equipo y proceder a realizar las lecturas correspondientes.
- ❖ Realizar el análisis del espectro infrarrojo de los quitosanos, trabajando en el intervalo de frecuencias de 4000 a 500 cm^{-1}
- ❖ Para calcular el DD se busca la banda amida y otra que sirve como referencia interna.
- ❖ Se proyecta y se lee la transmitancia de las bandas correspondientes.
- ❖ Se determina la absorbancia de cada una de las bandas.
- ❖ Se realiza la interpretación de los resultados del grado de desacetilación.

3.3.1.4 Aislado proteico de cañihua

Para la obtención de aislado proteico de Cañihua se sigue los siguientes procedimientos:

a) **Limpieza:** Esta se efectúa tamizando las semillas de cañihua utilizando zarandas con

la finalidad se separar las impurezas presentes (pajas, hojas, pedazos de tallo, inflorescencias y perigonio, etc).

b) Escarificado: Consiste en someter a los granos de cañihua a un pelado por fricción donde se separa la cascara que cubre el grano.

c) Lavado: Se realiza con el fin de que el grano quede libre de impurezas después de que haya pasado por el escarificador (equipo que separa la cascara del grano) con el fin de que el grano esté libre de arena, tierra.

d) Secado: Los granos de cañihua fueron secados en bandejas con recirculación de aire caliente a 50°C por un espacio de 12h.

e) Molienda: Se efectuó en un molino de discos, con una abertura de 1mm, de esta manera se permitió la ruptura fácil del grano.

f) Tamizado: Para determinar el tamaño de partícula, se pesa la materia prima de 250 g, al azar, y se coloca en la parte superior del conjunto de tamices, se agita durante 15 min y luego se pesa el residuo en la bandeja, calculando el porcentaje con relación al peso inicial. Se vuelve a montar el conjunto de tamices y se agita por 3 min. Se pesa de nuevo el residuo y se calcula su porcentaje, y si ha aumentado más del 1% de los 14-15 min, se vuelve a agitar un minuto más, y si el porcentaje de finos cae por debajo del 1, se puede considerar que el ensayo a concluido. Se anota el tiempo total de ensayo para los siguientes análisis.

Para la obtención del aislado proteico de Cañihua se sigue el siguiente procedimiento:

a) Solubilización de la proteína: Se solubilizan las proteínas y carbohidratos, consiste en poner en contacto directo la harina de cañihua de granulometría de malla 60 (granulometría óptima) con el solvente (agua), en un medio de pH 10 (pH óptimo) que se logra añadiendo una solución de NaOH 0,1 N, a temperatura de 50°C (T° óptima), con un tiempo de 60 min (tiempo optimo) y con un grado de agitación de 50 rpm (grado de agitación optimo).

b) Separación del extracto de cañihua solubilizado: Esta operación se realiza por filtración donde se separan las sustancias insolubles, seguidamente se realiza la centrifugación para separar el resto de las sustancias insolubles del extracto solubilizado.

c) Precipitación de la proteína solubilizado: La separación de la proteína que contiene el extracto solubilizado, se logra por el cambio del punto isoelectrico de la proteína dentro de la solución, la proteína de cañihua precipita al acidificar la solución del extracto proteico con una solución de HCl 0,1N a un pH de 4,7 que es el punto isoelectrico de la proteína de cañihua a una T° de 16°C. Este proceso se observa físicamente cuando se forma un precipitado de cristales coloidales en la base del reactor agitado.

d) Separación: esta operación se realiza utilizando la centrifuga DYNAC Modelo 420101 de 1000 – 10 000 rpm, la muestra se centrifuga por el tiempo de 20 minutos separados así el extracto solubilizado de las fibras insolubles.

e) Lavado y neutralización del aislado precipitado: El lavado se realiza con agua destilada para remover la solución acida, la neutralización del aislado proteico se realiza añadiendo una solución de NaOH 0,1N y agua destilada hasta lograr una solución neutra con 45 % de solidos totales.

f) Secado del aislado neutralizado: El secado del aislado neutralizado se seca hasta construir un polvo, existen varios métodos de secado, el más usado es el secado por atomización, antes del secado, los aislados pueden someterse a distintos tratamientos (químico, térmico o enzimático) para mejorar sus propiedades funcionales. El aislado obtenido fue secado a vacío a menos de 20 psi.

El producto final del aislado proteico de cañihua es de color blanquesino.

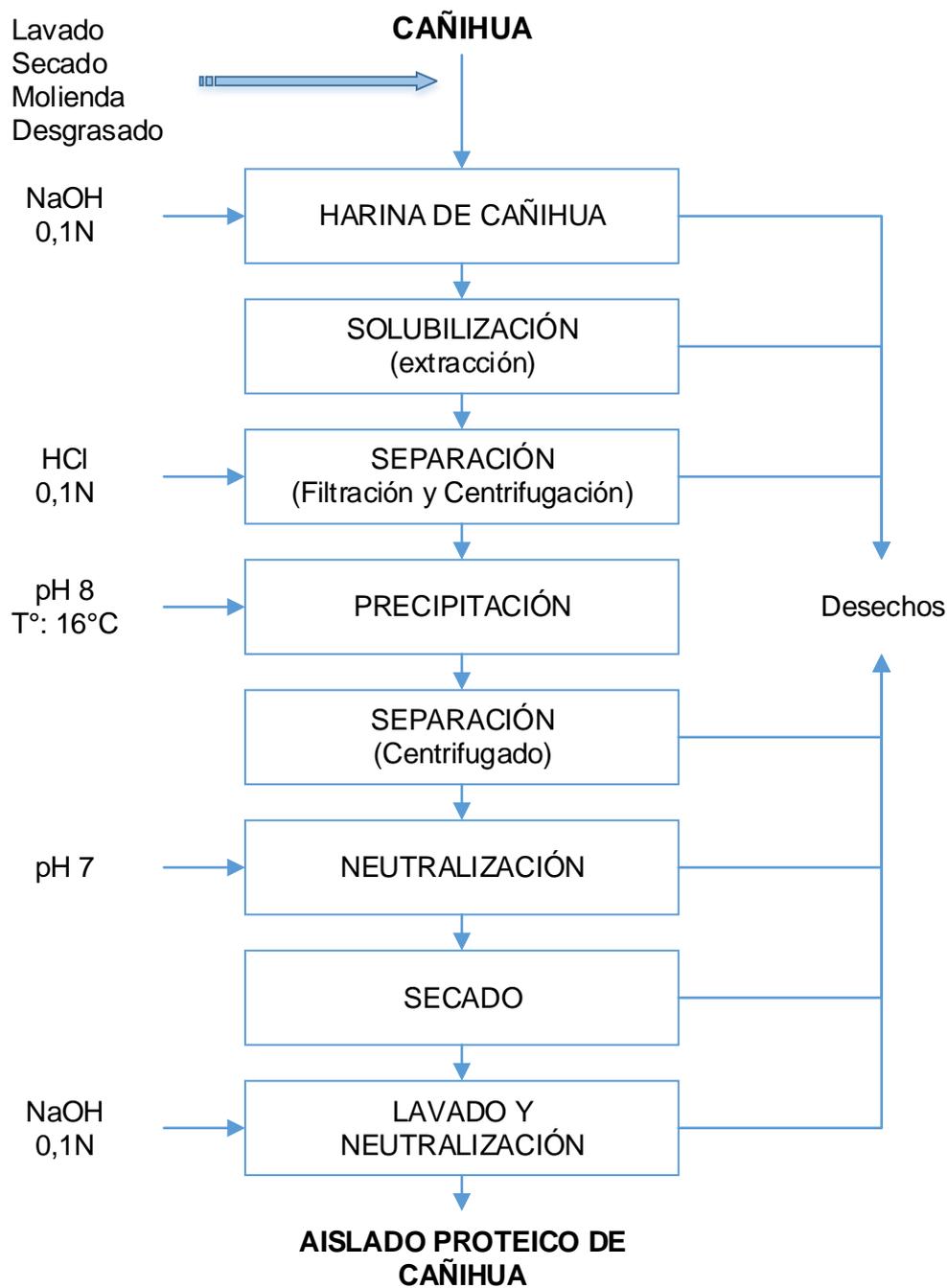


Figura 17. Diagrama de flujo de obtención de APC

3.3.2 Preparación de la solución de mezcla de Quitosano con APC para elaboración de películas

Para la elaboración de películas a partir de solución de mezcla de Quitosano con APC, se sigue el siguiente procedimiento:

- ❖ Se prepara solución de $C_3H_6O_3$ (Ácido láctico) al 1% (p/v).
- ❖ En un vaso precipitado se agrega 25 mL de solución de $C_3H_6O_3$, con la mezcla de quitosano y APC (0,1:0,01; 0,2:0,01; 0,3:0,01; 0,1:0,02; 0,2:0,02; 0,3:0,02; 0,1:0,03; 0,2:0,03; 0,3:0,03).
- ❖ Luego se procede con agitación constante durante 1 h y 30 min, a temperatura de 30 °C y agregar 0,5 mL de $C_3H_8O_3$ (Glicerina).
- ❖ Se procede a verter en placas de polietileno y luego se seca a temperatura ambiente.

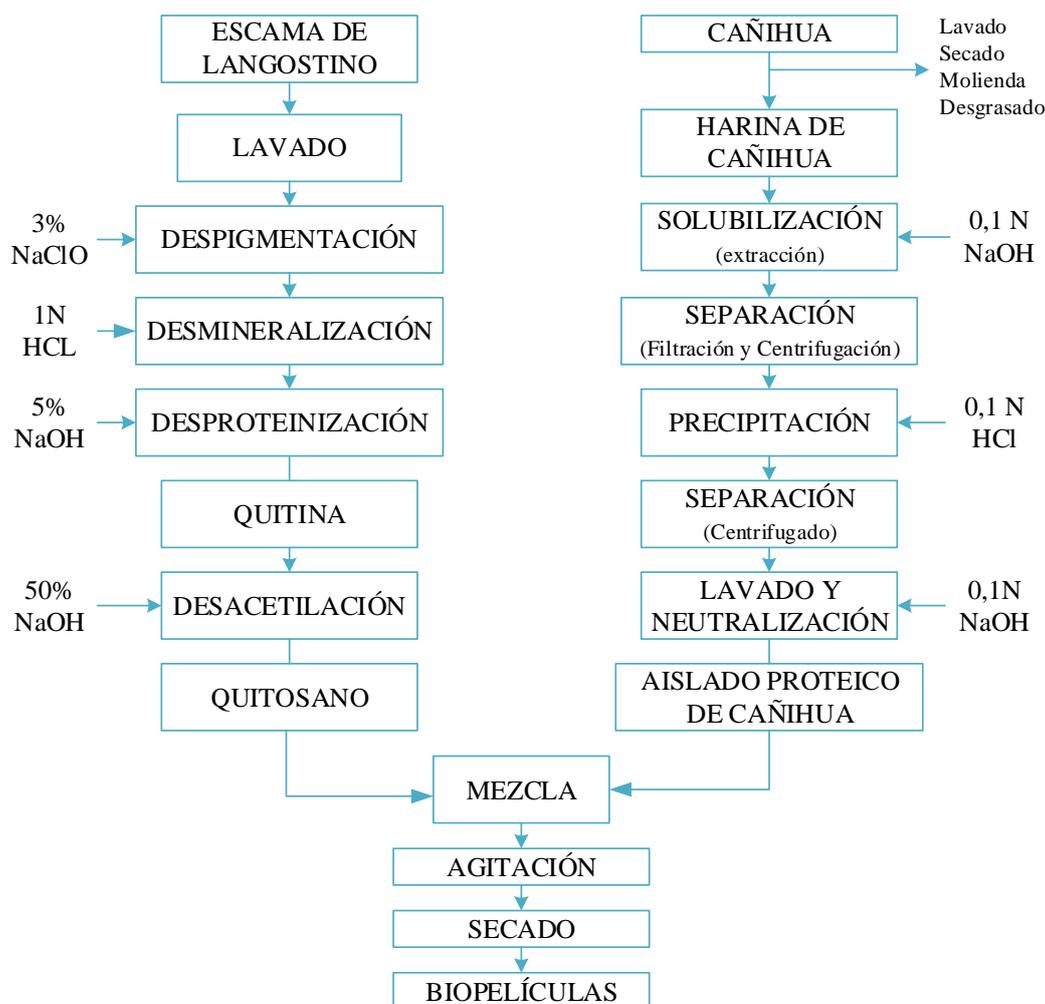


Figura 18. Diagrama de flujo de obtención de biopelícula a partir de quitosano de langostino y el aislado proteico de cañihua.

3.3.2.1 Aplicación de solución del quitosano y APC para conservación de fresa

Se utilizan fresas frescas cosechadas en la ciudad de cusco, las cuales se obtuvieron en un puesto de frutas del mercado Unión Dignidad, de condiciones sin defectos físicos.

a) Selección de frutas

- ❖ Las fresas se seleccionan de manera uniforme por madurez, tamaño, libres de microorganismos y sin defectos físicos.
- ❖ Lavar las fresas con una solución clorada durante 3min y secadas a temperatura ambiente.

b) Preparación de soluciones de quitosano con APC

- ❖ En 9 vasos precipitados se agrega 25 mL de $C_3H_6O_3$ al 1%. (p/v) a cada vaso precipitado con las diferentes mezclas de quitosano y aislado proteico de la cañihua (0,1:0,01; 0,2:0,01; 0,3:0,01; 0,1:0,02; 0,2:0,02; 0,3:0,02; 0,1:0,03; 0,2:0,03; 0,3:0,03).
- ❖ Procediéndose con la agitación constante de las soluciones, hasta disolver en su totalidad el quitosano por un lapso de tiempo de 1 h y 30min.
- ❖ Se mide el pH de las soluciones de las mezclas resultantes.

c) Aplicación de recubrimiento comestible

- ❖ Distribuir las fresas por separado para cada tratamiento.
- ❖ Las fresas se sumergen en la solución por 2 min y realizar con agitación suave para garantizar homogeneidad.
- ❖ Se coloca las fresas recubiertas en capsulas pequeñas con cierta distancia de una a la otra y dejar secar a temperatura ambiente, haciendo uso de pinzas.

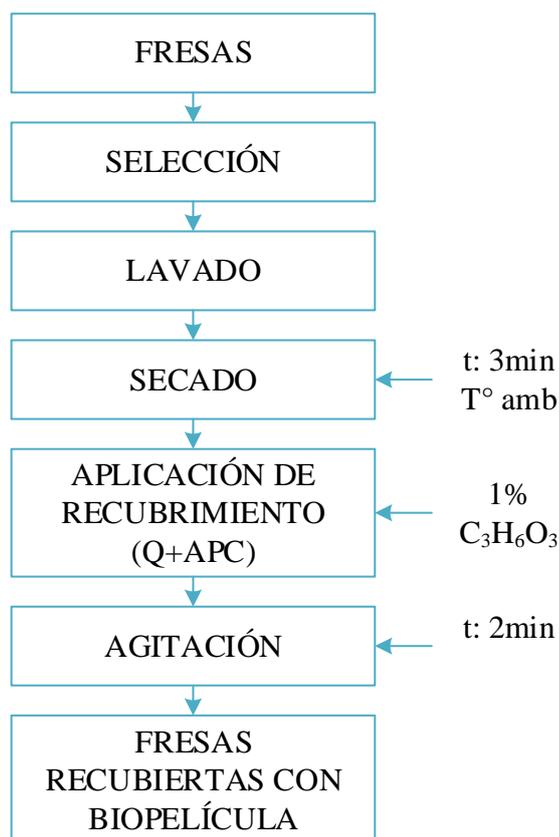


Figura 19. Diagrama de flujo de la aplicación de solución de quitosano y APC para la conservación de fresa.

d) Diseño experimental: El desarrollo de los experimentos se maneja con el diseño experimental (3^k), para lograr la determinación de la significancia de cada variable independiente. En la tabla 13, se muestra los factores y niveles que se han considerado:

Tabla 13. Factores y niveles

Variable Independiente				Variable dependiente
Factores	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Biopelículas para el envasado de alimentos.
Quitosano (g)	0,1	0,2	0,3	
Aislado proteico (g)	0,01	0,02	0,03	
Solución (ácido láctico) (mL)	25			
C ₃ H ₈ O ₃ (Glicerina) mL	0,5			

El número de experimentos se calcula considerando el número de factores y el número de niveles que asume cada factor.

3.3.3 Propiedades fisicoquímicas de conservación de fresa con recubrimiento

Se evalúan las propiedades fisicoquímicas de las frutas frescas en el primer día de ser obtenidas. Estas propiedades fisicoquímicas fueron los mismos atributos de calidad evaluados durante el experimento:

a) color: A través de la figura 15 el índice de madurez se puede visualizar el color de la fresa como un patrón de referencia.

b) Sólidos solubles: El contenido de sólidos solubles se determina con el índice de refracción y los grados °Brix son suficientes para determinar el contenido de sólidos solubles en el producto (SST).

- ❖ Se utiliza un refractómetro manual el cual cuantifica de manera directa el porcentaje del contenido de sólidos solubles expresados como grados °Brix.

c) Pérdida de peso:

- ❖ Para las fresas, se toman 9 muestras, se debe mantener para analizar la pérdida de peso en los días correspondientes.
- ❖ Se registra el peso inicial en el día cero que se aplique el recubrimiento.
- ❖ Para determinar la pérdida de peso (expresado en porcentaje) se aplica la siguiente ecuación:

$$PFS = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

PFS: Pérdida fisiológica de peso

P_i: Peso inicial de la muestra.

P_f: Peso final de la muestra.

Las pérdidas de peso durante el almacenamiento se expresan como porcentaje respecto al peso inicial de la fruta.

d) pH

- ❖ Tomar una muestra de frutas de conservación
- ❖ Tomar la muestra cuidadosa con ayuda de un exprimidor extraer con rapidez el

jugo de la fruta.

- ❖ Se determinó el pH del jugo con ayuda del potenciómetro previamente calibrado.

e) Acidez

- ❖ Diluir 1mL de jugo con 10 a 20 mL de agua destilada, recién hervida y enfriada.
- ❖ Agregar unas gotas de fenolftaleína y titular con NaOH 0.1N.
- ❖ Se observa el color rosada persistente.
- ❖ El índice de acidez se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\%_{Ac.Lactico} = \frac{V_{NaOH} - P_f}{V_{muestra}} \times 100\% \quad (2)$$

f) **Análisis microbiológico:** Se realiza un análisis microbiológico (Bacterias mesófilos aerobios, mohos y levaduras) en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria para las frutas recubiertas con mayor tiempo de vida útil.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Obtención del Quitosano y aislado proteico de Cañihua

4.1.1 Quitosano

El quitosano, se obtuvo a partir de escamas de Langostino como derivado de la reacción de desacetilación de la quitina color blanco-amarillento de forma cristalino. El criterio utilizado para distinguir entre quitina y quitosano es precisamente mediante la solubilidad en soluciones ácido diluido, en cambio el quitosano no es una entidad química única y definida, sino un grupo de polisacáridos que varía entre sí en su composición y tamaño molecular. Esta variabilidad se asocia especialmente a las condiciones del proceso de obtención.



Figura 20. Obtención de materia primera

4.1.1.1 Rendimiento del Quitosano

El rendimiento del quitosano se ha determinado aplicando la ecuación 4, para cada proceso, tal como se tiene en las siguientes tablas:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso de materia despigmentada}}{\text{peso de las escamas de langostino}} * 100 \tag{3}$$

Tabla 14. Despigmentación química

Peso de muestra (g)	NaClO (%)	Numero de lavados	Peso de materia despigmentada (g)	Rendimiento (%)
100	3	5	68,49	68,49

Según la tabla 14, se observa la despigmentación química de las escamas del langostino, a partir de 100 g de escamas en solución diluida de NaClO al 3%, se ha obtenido 68,49 g de materia despigmentada, equivalente a un rendimiento de 68,49 %, este resultado de la pérdida de materia, es debido por acción de ataque de NaClO sobre las escamas y por las secuencias de lavado hasta el pH neutro. El producto decolorado fue pesado, registrándose un dato de 68,49.

Fong (2012), en su trabajo de investigación, reporto que para decolorar exoesqueleto del abdomen del camarón trabajo con 300 mL de hipoclorito de sodio al 3% por 30 minutos. Por lo que se puede concluir que los parámetros de operación que se consideran en este proceso son válidos porque se encuentra dentro del rango óptimo.

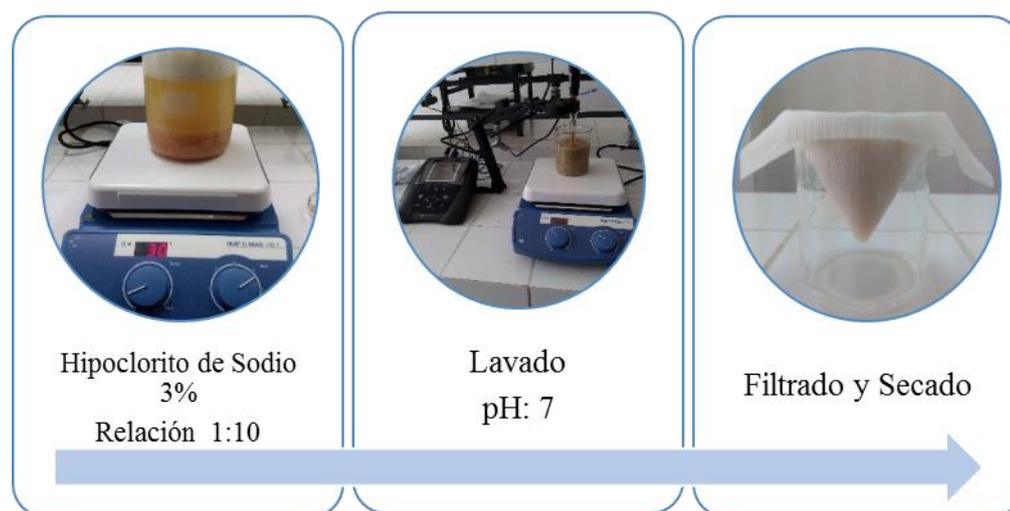


Figura 21. Despigmentación química

Tabla 15. Desmineralización de materia despigmentada.

Peso de muestra (g)	HCl	Numero de lavados	Peso de materia desmineralizada (g)	Rendimiento (%)
68,49	1 N	5	54,73	79,909

En la tabla 15, se observa la desmineralización de la materia despigmentada, a partir de 68,49 g en solución diluida de HCl 1N, este proceso se ha determinado con el fin de reducir la concentración de CaCO_3 de las escamas de langostino, obteniendo como resultado de 54,73 g de materia desmineralizada, equivalente a un rendimiento de 79,298 %. El producto desmineralizado fue pesado, registrándose un valor de 54,73.

Parada, et. al, (2004) y López (2014), en sus trabajos de investigación, reportaron que para la desmineralización de exoesqueleto del camarón trabajaron con una concentración de HCl 1N en una relación de 1:10 (g/mL), durante 3 h a temperatura ambiente, con agitación constante y con HCl 1,25 N en una relación de 1:15 (g/mL), durante 1 h a temperatura ambiente. El resultado del rendimiento en la tabla 15 respecto al proceso de desmineralización se encuentra dentro del rango óptimo.

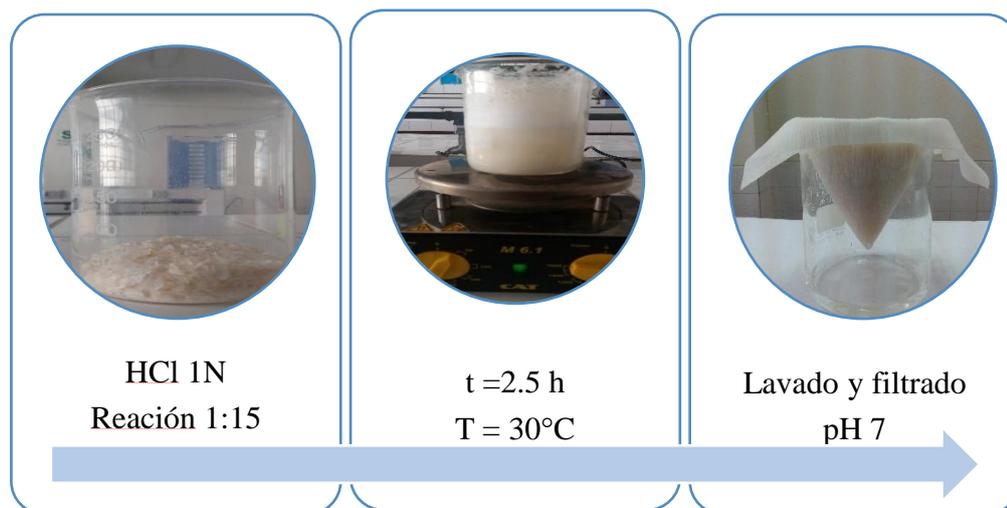


Figura 22. Proceso de desmineralización

Tabla 16. Desproteínización de la materia desmineralizada

Peso de muestra (g)	NaOH (%)	Numero de lavados	Peso de materia desproteínizada (g)	Rendimiento (%)
54,73g	5	5	43,4	79,298

En la tabla 16, se observa la desproteínización de la materia desmineralizada, a partir de 54,73 g en solución diluida de NaOH al 5%, se logra 43,4 g de materia desproteínizada, equivalente a un rendimiento de 79,298 %, este proceso se ha realizado con el fin de romper los enlaces de Hidrógeno que unen las moléculas de proteína. El producto desproteínizado final (Quitina), fue pesado, registrándose un valor de 43,4.

Parada, et. al, (2004), en su trabajo de investigación, reporto que para desproteínizar el exoesqueleto del camarón trabajo con la solución de NaOH al 4,5% en una relación de (1:15 g/mL), con un tiempo de agitación de 3 h a 65°C. Por lo tanto, se justifica el resultado obtenido en la tabla 16.

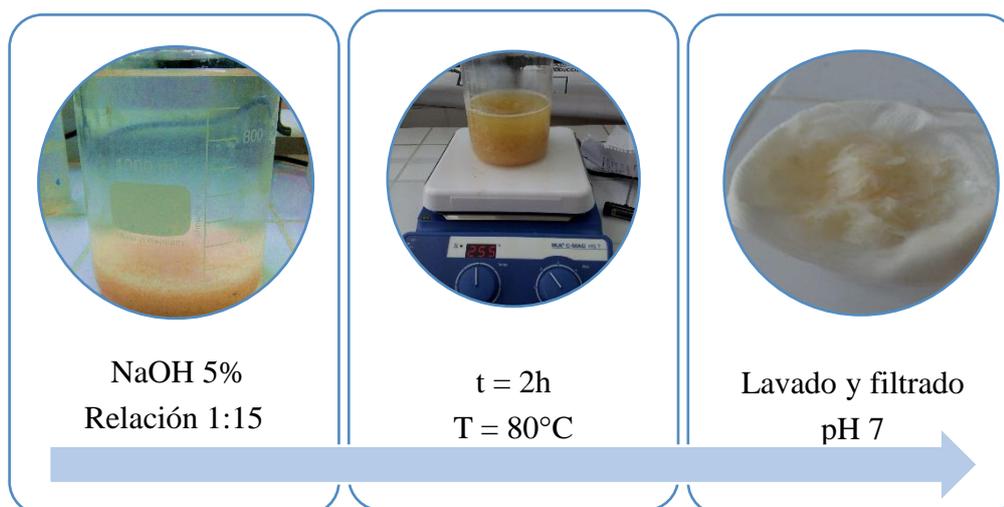


Figura 23. Proceso de desproteinización

Tabla 17. Desacetilación de materia desproteinizada

Peso de muestra (g)	NaOH (%)	Numero de lavados	Peso de Quitosano (g)	Rendimiento (%)
43,4g	50	5	21,2	48,847

Según la tabla 17, se observa la desacetilación de materia desproteinizada, a partir de 43,4 g de quitina en solución diluida de NaOH al 50 %, este proceso de desarrolla con el fin de reducir el resto de acetilo del grupo de amido y aumentar la cantidad de grupos amino; como resultado final se obtuvo 21,2 g de Quitosano, equivalente a un rendimiento de 48,847 %. Vásquez (2011) a partir de 100 g de Quitina de langostino, obtuvo solo 12 g de Quitosano. Comparando los resultados con el citado autor, los resultados del presente estudio han sido mucho mejor.

Parada, et. al, (2004) y López (2014), en sus trabajos de investigación, reportaron que para la desacetilación de exoesqueleto del camarón trabajaron con una concentración de NaOH al 70% durante 2 h a 105 °C, con agitación constante y con NaOH al 50% durante 1 h a 120 °C. El resultado del rendimiento en la tabla 17 respecto al proceso de desacetilación se encuentra dentro del rango óptimo.

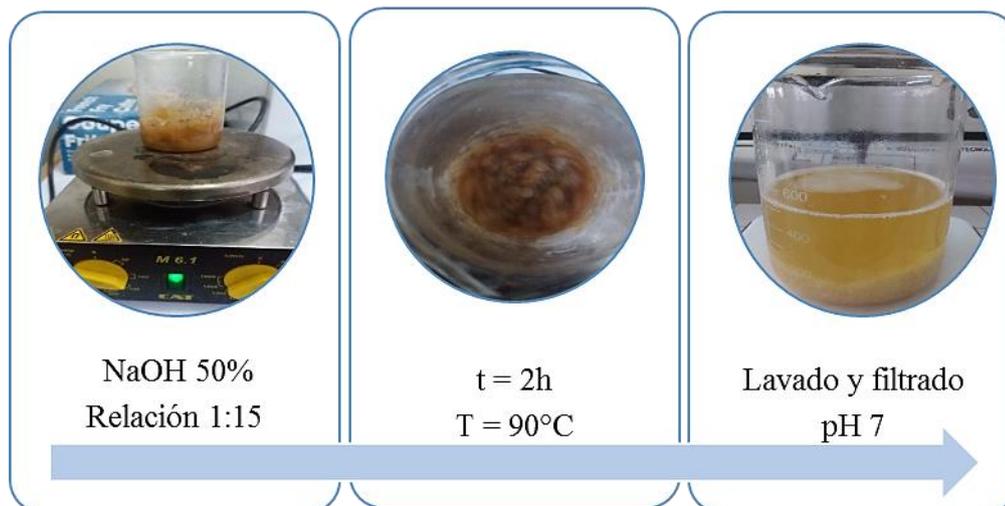


Figura 24. Proceso de desacetilación

4.1.1.2 Determinación del Grado de desacetilación del quitosano por el método de titulación potenciométrica

Para realizar la titulación potenciométrica del quitosano se tomó como referencia el trabajo de Vásquez y Vidal (2011). La determinación de Grado de desacetilación del quitosano por titulación potenciométrica, es equivalente al porcentaje de grupos amino que se encuentran en la cadena polimérica del quitosano y se determinó por triplicado, considerando los siguientes datos:

$W_{(g)}$ = Peso en gramos de la muestra de quitosano.

$V_{(mL)}$ = Volumen de hidróxido de sodio.

pH = pH que experimenta la mezcla por cada mL de base añadida.

V_{prom} = Volumen promedio: $(V_1 + V_2)/2$.

$\Delta pH/\Delta V$ = Cambio de pH con respecto al volumen, en donde: $\Delta pH = pH_2 - pH_1$

$\Delta V = V_2 - V_1$

Tabla 18. Titulación potenciométrica

PRIMERA TITULACIÓN				SEGUNDA TITULACIÓN				TERCERA TITULACIÓN			
W= 0,5g		1ª Derivada		W= 0,5g		1ª Derivada		W= 0,5g		1ª Derivada	
V(mL) NaOH	Ph	Vprom	$\Delta pH/\Delta V$	V(mL) NaOH	Ph	Vprom	$\Delta pH/\Delta V$	V(mL) NaOH	Ph	Vprom	$\Delta pH/\Delta V$
0	0,92			0	0,9			0	0,91		
1	0,93	0,5	0,01	1	0,92	0,5	0,02	1	0,92	0,5	0,01
2	0,94	1,5	0,01	2	0,95	1,5	0,03	2	0,93	1,5	0,01
3	0,96	2,5	0,02	3	0,96	2,5	0,01	3	0,95	2,5	0,02
4	0,98	3,5	0,02	4	0,97	3,5	0,01	4	0,97	3,5	0,02
5	1	4,5	0,02	5	1,01	4,5	0,04	5	0,98	4,5	0,01
6	1,02	5,5	0,02	6	1,02	5,5	0,01	6	1	5,5	0,02
7	1,05	6,5	0,03	7	1,04	6,5	0,02	7	1,03	6,5	0,03
8	1,07	7,5	0,02	8	1,06	7,5	0,02	8	1,05	7,5	0,02
9	1,09	8,5	0,02	9	1,1	8,5	0,04	9	1,07	8,5	0,02
10	1,11	9,5	0,02	10	1,12	9,5	0,02	10	1,09	9,5	0,02
11	1,14	10,5	0,03	11	1,14	10,5	0,02	11	1,13	10,5	0,04
12	1,17	11,5	0,03	12	1,16	11,5	0,02	12	1,17	11,5	0,04
13	1,2	12,5	0,03	13	1,19	12,5	0,03	13	1,2	12,5	0,03
14	1,22	13,5	0,02	14	1,23	13,5	0,04	14	1,22	13,5	0,02
15	1,25	14,5	0,03	15	1,26	14,5	0,03	15	1,26	14,5	0,04
16	1,29	15,5	0,04	16	1,28	15,5	0,02	16	1,29	15,5	0,03
17	1,33	16,5	0,04	17	1,31	16,5	0,03	17	1,32	16,5	0,03
18	1,37	17,5	0,04	18	1,35	17,5	0,04	18	1,36	17,5	0,04
19	1,41	18,5	0,04	19	1,39	18,5	0,04	19	1,4	18,5	0,04
20	1,45	19,5	0,04	20	1,43	19,5	0,04	20	1,44	19,5	0,04
21	1,5	20,5	0,05	21	1,48	20,5	0,05	21	1,49	20,5	0,05
22	1,56	21,5	0,06	22	1,54	21,5	0,06	22	1,55	21,5	0,06
23	1,61	22,5	0,05	23	1,59	22,5	0,05	23	1,6	22,5	0,05
24	1,67	23,5	0,06	24	1,66	23,5	0,07	24	1,67	23,5	0,07
25	1,75	24,5	0,08	25	1,73	24,5	0,07	25	1,74	24,5	0,07
26	1,82	25,5	0,07	26	1,81	25,5	0,08	26	1,82	25,5	0,08
27	1,93	26,5	0,11	27	1,91	26,5	0,1	27	1,92	26,5	0,1
28	2,06	27,5	0,13	28	2,04	27,5	0,13	28	2,05	27,5	0,13
29	2,21	28,5	0,15	29	2,19	28,5	0,15	29	2,2	28,5	0,15
30	2,51	29,5	0,3	30	2,49	29,5	0,3	30	2,5	29,5	0,3
31	3,13	30,5	0,62	31	3,11	30,5	0,62	31	3,12	30,5	0,62
32	5,11	31,5	1,98	32	5,10	31,5	1,99	32	5,12	31,5	2
33	5,49	32,5	0,38	33	5,47	32,5	0,37	33	5,48	32,5	0,36
34	5,69	33,5	0,2	34	5,67	33,5	0,2	34	5,68	33,5	0,2
35	5,89	34,5	0,2	35	5,88	34,5	0,21	35	5,87	34,5	0,19
36	6,03	35,5	0,14	36	6,01	35,5	0,13	36	6,02	35,5	0,15
37	6,26	36,5	0,23	37	6,25	36,5	0,24	37	6,26	36,5	0,24
38	6,42	37,5	0,16	38	6,39	37,5	0,14	38	6,41	37,5	0,15
39	6,66	38,5	0,24	39	6,63	38,5	0,24	39	6,65	38,5	0,24

40	6,97	39,5	0,31	40	6,98	39,5	0,35	40	6,97	39,5	0,32
41	8,58	40,5	1,61	41	8,55	40,5	1,57	41	8,56	40,5	1,59
42	11,15	41,5	2,57	42	11,13	41,5	2,58	42	11,14	41,5	2,58
43	11,74	42,5	0,59	43	11,72	42,5	0,59	43	11,73	42,5	0,59
44	11,95	43,5	0,21	44	11,94	43,5	0,22	44	11,93	43,5	0,2
45	12,08	44,5	0,13	45	12,06	44,5	0,12	45	12,07	44,5	0,14
46	12,19	45,5	0,11	46	12,17	45,5	0,11	46	12,18	45,5	0,11
47	12,29	46,5	0,1	47	12,27	46,5	0,1	47	12,28	46,5	0,1
48	12,35	47,5	0,06	48	12,34	47,5	0,07	48	12,35	47,5	0,07
49	12,41	48,5	0,06	49	12,39	48,5	0,05	49	12,4	48,5	0,05
50	12,47	49,5	0,06	50	12,45	49,5	0,06	50	12,46	49,5	0,06
51	12,52	50,5	0,05	51	12,51	50,5	0,06	51	12,52	50,5	0,06
52	12,56	51,5	0,04	52	12,54	51,5	0,03	52	12,55	51,5	0,03
53	12,6	52,5	0,04	53	12,59	52,5	0,05	53	12,61	52,5	0,06
54	12,63	53,5	0,03	54	12,61	53,5	0,02	54	12,62	53,5	0,01
55	12,65	54,5	0,02	55	12,63	54,5	0,02	55	12,66	54,5	0,04

En la tabla 18, se observa los resultados de las pruebas de titulación potenciométrica del grado de desacetilación del quitosano: el cambio del pH con respecto al volumen, incrementa lentamente hasta un punto en el cual se aprecia un cambio acelerado. El volumen promedio en que se da este cambio es un punto de inflexión (punto de inflexión menor); al continuar adicionando hidróxido de sodio, el cambio de pH tiende a disminuir, hasta que nuevamente se observa otro aumento (punto de inflexión mayor). Dichos puntos de inflexión son los que se utilizan para calcular el grado de desacetilación en cada una de las titulaciones.

Con estos resultados se construye los gráficos de volumen de hidróxido de sodio (V_{NaOH}) gastado Vs. pH de muestra. Dichos gráficos producen una curva de titulación con dos puntos de inflexión, cuyos valores exactos se determinaron según el criterio de la primera derivada.

A continuación de se presentan en la figura los gráficos de la titulación potenciométrica y de la primera derivada, respectivamente, para la primera muestra de quitosano.

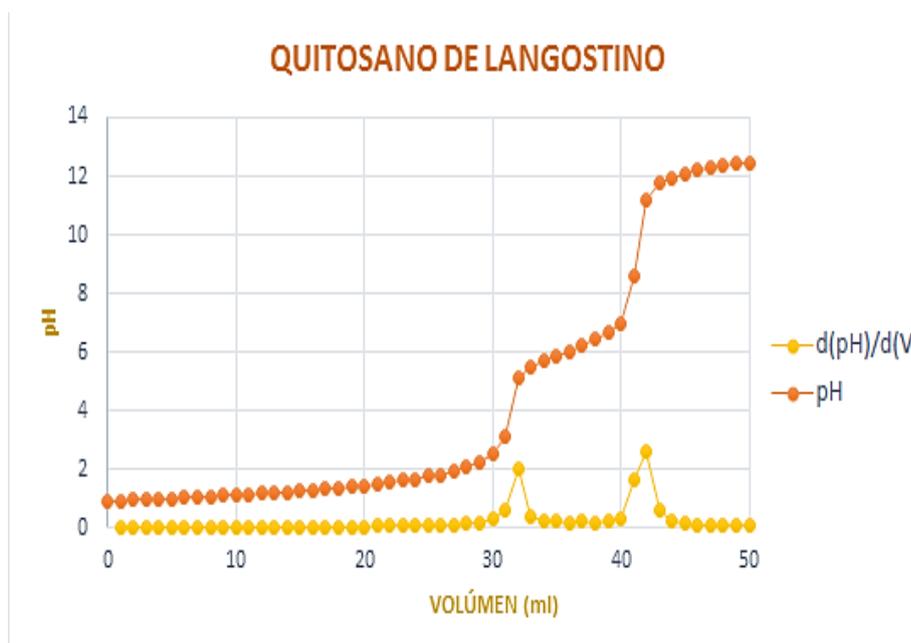


Figura 25. Gráfica de titulación potenciométrica

En la figura 25, se visualiza la Valoración de Quitosano con NaOH y la primera derivada del pH versus la primera derivada del volumen. Los puntos de inflexión, corresponden a los cambios de pH en respuesta a la reacción entre NaOH con los grupos amino (-NH₂) del quitosano; a pH muy básicos el quitosano precipita por su insolubilidad observándose en el fondo material blanco.

Los puntos equivalente X y Y, que se obtuvieron de la primera derivada figura 24, se calcula según la ecuación 5:

$$\%NH_2 = 16.1 * \frac{(y-x)}{w} * f \tag{4}$$

Donde:

Y = volumen equivalente mayor (mL)

X = volumen equivalente menor (mL)

f = concentración del NaOH (mol/L)

w = masa de la muestra de quitosano (g)

16,1 = es el valor relacionado con el peso equivalente del quitosano.

$$\%NH_2 = 16.1 * \frac{(42,00336 - 32,00256)}{0,5} * 0,25$$

$$\%NH_2 = 80,506\%$$

El quitosano obtenido en nuestro proceso alcanza un grado de desacetilación de 80,506% determinado mediante el método potenciométrico habiendo arrojado los resultados mostrados en la tabla 18 y con los cuales se graficó la respectiva curva de calibración en la figura 25.

Morey, R y Quinde, B (2012), en su trabajo de investigación, reportó que el quitosano obtenido en su proceso alcanzó un grado de desacetilación de 85,14%, determinado mediante el método potenciométrico, por lo tanto; se justifica el resultado obtenido.

4.1.1.3 Caracterización de quitosano procedente del de langostino, mediante el método de Espectroscopia Infrarroja FTIR.

Este método se basa en la relación de absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas, con el tanto por ciento de acetilación del quitosano. La selección de las bandas de absorción involucra una señal que depende del grado de N-acetilación “normalmente la banda amida” y otra que sirve como referencia interna para corregir las diferencias de espesor de las películas o de la concentración en las pastillas de bromuro de potasio. Las propiedades del quitosano, son afectadas por el grado de desacetilación (DD) que presenta, el cual constituye uno de los parámetros estructurales del biopolímero.

El espectro infrarrojo fue obtenido en un intervalo de frecuencias de 4000 a 500 cm^{-1} . Las propiedades del Quitosano son afectadas por el grado de desacetilación (DD) que presenta, el cual constituye uno de los parámetros estructurales del biopolímero.

El análisis estructural del quitosano extraído de la quitina procedente de las escamas de Langostino, se realizó empleando el equipo Espectrofotómetro Infrarrojo FT- IR con Transformada de Fourier, marca SHIMADZU, Modelo: IR AFFINITY 1 e la UNMSM de Lima, tal como se observa en la siguiente figura:

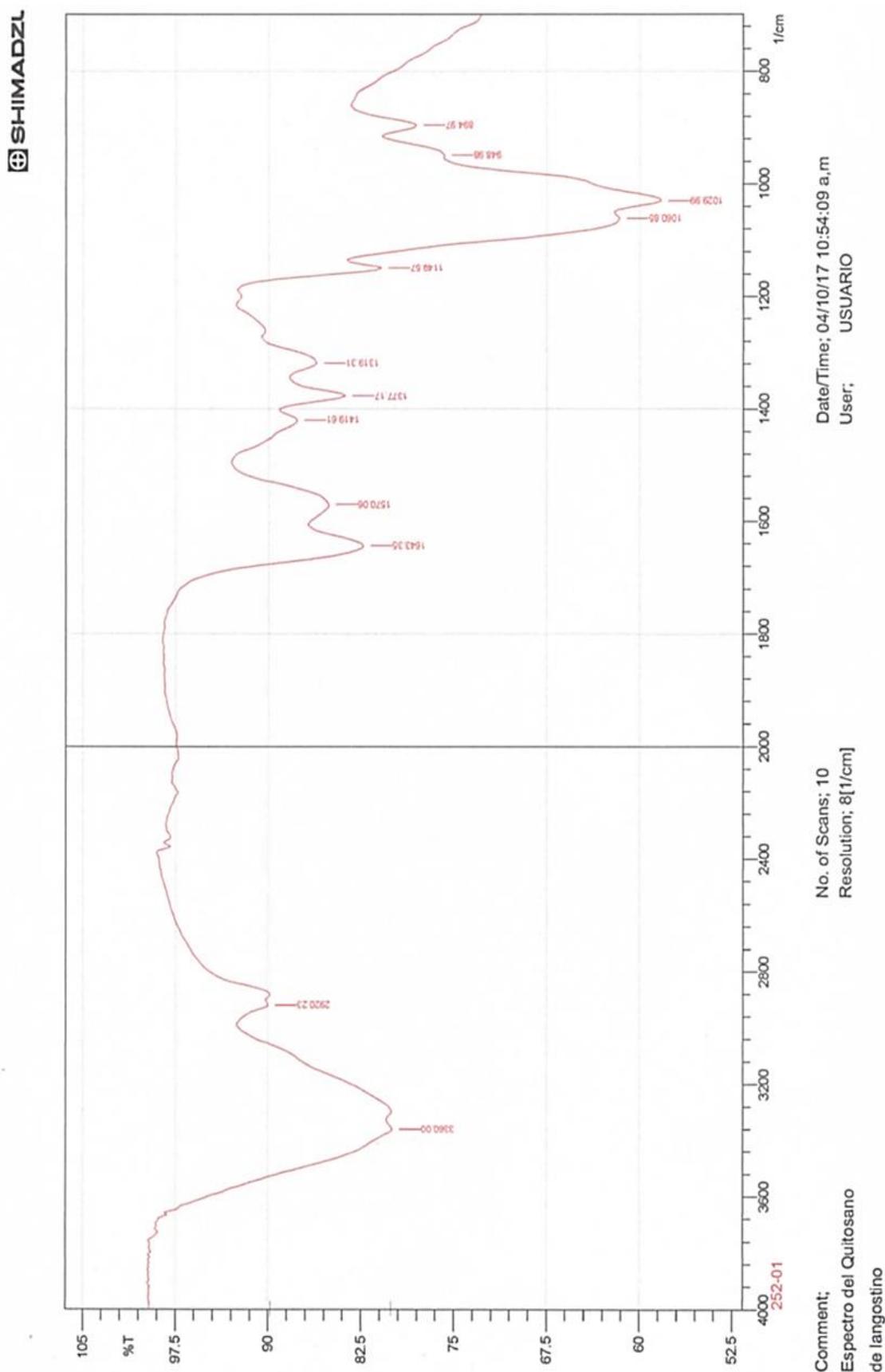


Figura 26. Espectro IR de Quitosano del Langostino

Fuente: Certificado de Análisis de IR de Laboratorio UNMSM

Tabla 19. Grupos característicos de quitosano.

N°	Número de onda (cm-1)	Grupo funcional característico quitosano de langostino
1	3360,00	-OH
2	2920,23	-CH ₃
3	1643,35	C=O
4	1419,61	C-N
5	1377,17	-CH ₃
6	1149,57	C-O-C
7	1029,99	C-OH

Según la figura 26 y tabla 19, Se observa una banda ancha que absorbe fuertemente a $3360,00\text{ cm}^{-1}$, atribuida al estiramiento del enlace O-H. El estiramiento C-H aparece a 2920.332 cm^{-1} , la vibración de tensión del grupo carbonilo (-C=O) aparece a $1643,35\text{ cm}^{-1}$, la banda de torsión para -NH₂ aparece a 1570 cm^{-1} , la vibración de torsión para el enlace -CH₃- se observa a $1377,10\text{ cm}^{-1}$, la vibración del enlace C-N del grupo acetamido aparece a $1319,31$; el estiramiento simétrico del enlace C-O aparece a $1149,57\text{ cm}^{-1}$, esta banda podría también ser asignada a la vibración de flexión del grupo NH₂ y la vibración de tensión a $1060,85$ y $1029,99\text{ cm}^{-1}$ del enlace C-O. Finalmente se observan a $948,98$ y $894,79\text{ cm}^{-1}$ las bandas atribuidas al estiramiento del enlace C-O-C glucosídico.

4.1.1.4. Determinación del grado de desacetilación del quitosano por Espectroscopia Infrarroja

Del espectro infrarrojo del quitosano que se presenta en la figura 26, se obtiene la siguiente información para poder determinar el DD., aplicando la ecuación 6.

El modelo de cálculo del grado de desacetilación DD, en base al análisis por FT- IR se presenta a continuación en base al espectro infrarrojo del quitosano, el cual presenta bandas características de este biopolímero, es así que se observa la banda corresponden a la vibración de estiramiento axial del grupo OH a 3360 cm^{-1} , la banda del carbonilo a 1643 cm^{-1} , las bandas observadas son similares a las descritas en la literatura, con esta información se puede proceder a calcular el DD:

$$A = -\log T$$

Línea base (3360): $79,5 \%T = 0,795 \rightarrow 0,830 A$

Línea base (1643): $84 \%T = 0,84 \rightarrow 0,435 A$

Cálculo del grado de desacetilación:

$$DD = 100 - \frac{100}{1,33} \left(\frac{A_{1643}}{A_{3360}} \right) \quad (5)$$

$$DD = 100 - \frac{100}{1,33} \left(\frac{\log 0,830}{\log 0,435} \right)$$

$$DD = 83,189\%$$

El grado de desacetilación del Quitosano obtenido es de 83,189 %, si se compara con lo reportado en la tabla 2, se encuentra dentro del rango mayor al 60% del grado de desacetilación ó menor al 100 % su grado de acetilación así mismo con lo reportado en la literatura, lo cual se puede corroborar que el quitosano se encuentra dentro del rango óptimo.

Dicho resultado se contrasta con estudios realizado por Escobar et al. (2013), de Espectro de Infrarrojo del quitosano extraído a partir de caparazón de crustáceos; del mismo modo, el citado autor en su estudio reporta el 80,67 % del grado de desacetilación y el presente estudio se obtuvo 83,189 %, del grado de desacetilación de quitosano; del mismo modo Lalaleo (2010), obtuvo un grado de desacetilación del 74,24 % en base al análisis por espectroscopia infrarroja; por lo tanto, los resultados del presente estudio queda validado.

Para poder aseverar lo mencionado anteriormente y poder comparar los resultados de este trabajo, a continuación, se tiene espectro infrarrojo del Quitosano comparado con el espectro del quitosano FABRIC CELLOPHANE que existe en la biblioteca espectral del equipo donde se ha obtenido para este trabajo de investigación.

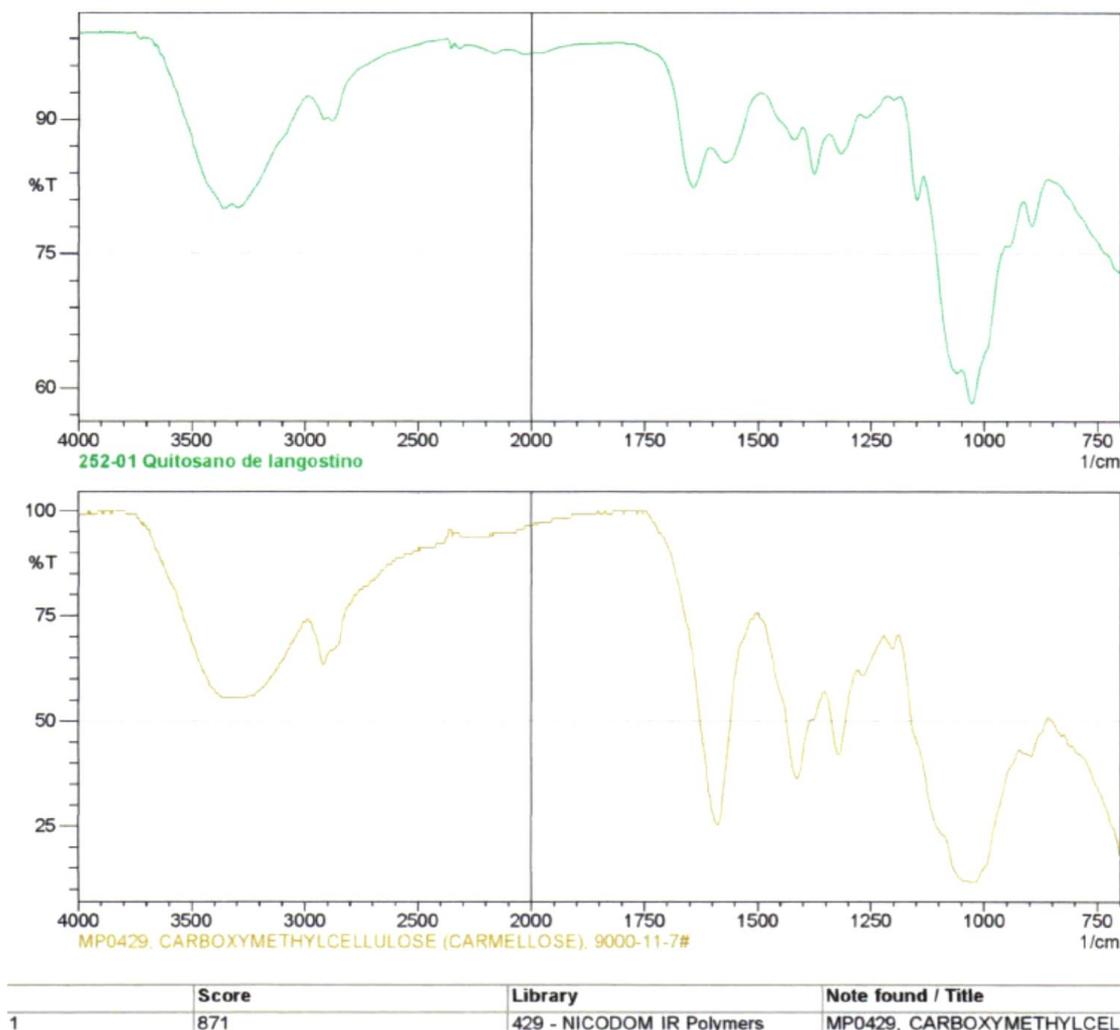


Figura 27. Comparación del Espectro del quitosano, Comercial Patrón “Acros” y quitosano, Patrón del Equipo IR ZHIMADZU.

Fuente: USAQ UNMSM- Lima

Como se observa, el espectro del quitosano obtenido en el trabajo experimental desarrollado, tiene características muy parecidas que el quitosano presentado en la biblioteca espectral del equipo; notándose diferencias en el segmento de longitud de onda de 1000 cm^{-1} . Por lo que se puede concluir que se tiene una semejanza del 90% por lo que se valida el quitosano obtenido mediante este trabajo experimental el mismo que se extrajo de las escamas del langostino utilizado.

4.1.2 Aislado proteico de cañihua

El aislado proteico de Cañihua se ha obtenido añadiendo una solución de NaOH 0,1 N,

a temperatura de 50°C (T° óptima), con un tiempo de 60 min (tiempo óptimo) y con un grado de agitación de 50 rpm (grado de agitación óptimo).

La separación de la proteína que contiene el extracto solubilizado, se ha logrado por el cambio del punto isoeléctrico de la proteína dentro de la solución, la proteína de cañihua precipita al acidificar la solución del extracto proteico con una solución diluida de HCl 0,1N. Esta operación se ha realizado utilizando la CENTRIFUGUE XC-2000, tal como se observa en el Anexo A7, el lavado se ha realizado con agua destilada con el fin de remover la solución acida, y finalmente el aislado proteico se realizó añadiendo una solución de NaOH 0,1N y agua destilada hasta lograr una solución neutra con 45 % de solidos totales y como producto final del aislado proteico de cañihua se ha obtenido de color blanco.

4.1.2.1 Extracción de aislado proteico

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 20. Obtención de aislado proteico de Cañihua

Peso de muestra (g)	Malla	NaOH (M)	HCl (N)	Separación (RPM)	Peso de Proteína (g)	Rendimiento (%)
70g	60	0,1	0,1	1000	1,301	1,857

Según la tabla 20, se observa los valores de obtención de aislado proteico de Cañihua, a partir de 70 g de Cañihua pasado por tamiz de malla 60 a 1000 rpm en centrifugadora durante 20 min se obtuvo como resultado final de 1,301 g de proteína, equivalente a un rendimiento de 1,857 %.

Ramírez (2004), a partir de 16,21 kg de Cañihua obtuvo como resultado 2,8461 Kg de proteína, equivalente a un rendimiento de 17, 56 %. Por lo tanto, los resultados del citado autor son similar a los resultados del presente estudio realizado.

4.1.2.2 Análisis proximal del aislado proteico

Los resultados del análisis proximal se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 21. Características físicas y visuales de APC

Características	Observación de los Aislados Proteicos
Color	Blanco
Olor	Característico
Sabor	Insípido
Textura	Muy fina

Fuente: (Horst, 2001)

Discusión:

Según los resultados obtenidos se discute:

De tabla 15, como resultado final a partir de 43,4 g de quitina, se obtuvo un peso de 21,2 g de Quitosano, equivalente a un rendimiento de 48,847 %; sin embargo, según Vásquez (2011) a partir de 100 g de Quitina de langostino, obtuvo solo 12 g de Quitosano. Comparando los resultados con el citado autor, los resultados del presente estudio han sido mucho mejor.

De la figura 25, los Espectros IR de Quitosano del Langostino son similares a los resultados obtenidos según Escobar et al. (2013), de Espectro de Infrarrojo del quitosano extraído a partir de caparazón de crustáceos; del mismo modo, el citado autor en su estudio reporta el 80,67 % del grado de desacetilación y el presente estudio se obtuvo 83,189 %, del grado de desacetilación de quitosano; del mismo modo Lalaleo (2010), obtuvo un grado de desacetilación del 74,24 % en base al análisis por espectroscopia infrarroja; por lo tanto, los resultados del presente estudio queda validado.

De tabla 18, a partir de 70 g de Cañihua pasado por tamiz de malla 60 a 1000 rpm en centrifugadora durante 20 min se obtuvo como resultado final de 1,301 g de proteína, equivalente a un rendimiento de 1,857 %; sin embargo; según Ramírez (2004), a partir de 16,21 kg de Cañihua obtuvo como resultado 2,8461 Kg de proteína, equivalente a un rendimiento de 17,56 %. Por lo tanto, los resultados del citado autor son similar a los resultados del presente estudio realizado.

4.2 Solución de mezcla de Quitosano con APC para elaboración de películas

Las películas obtenidas a partir de la mezcla de quitosano de Langostino con aislado proteico de Cañihua, son transparentes, firmes y algo flexibles, se forman por el moldeo de solución acuosa y a través de la evaporación del solvente (figura 27), siendo la solución de mezcla más óptima, según el Análisis de STATGRAPHICS y el análisis microbiológico (Anexo F), en pruebas de recubrimiento de fresa es de 0,3:0,03(Q_(g):APC_(g)), diluido en 25 mL de solución C₃H₆O₃, (1%). Las soluciones se han preparado de acuerdo a los factores y niveles según la tabla 11. La elaboración de películas y las pruebas de recubrimiento en fresas se elaboró en el Laboratorio de alimentos de la Facultad de Ingeniería química, considerando los siguientes datos:

- ❖ Solución de C₃H₆O₃, (1%): 25 mL
- ❖ C₃H₈O₃ (Glicerina): 0,05 mL
- ❖ 0,3:0,03(Q_(g):APC_(g))
- ❖ Tiempo: 1 h y 30 min
- ❖ Agitación: 150 rpm

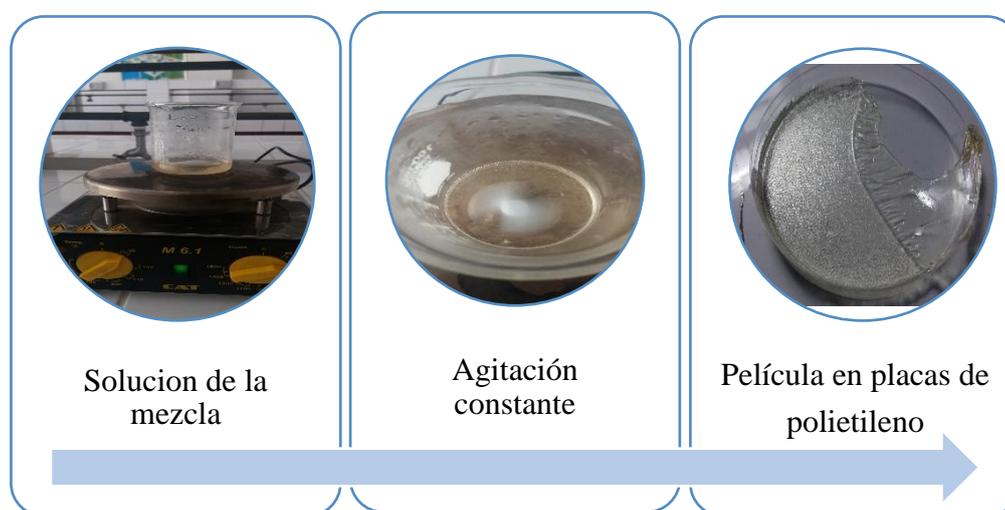


Figura 28. Proceso de obtención de biopelícula.

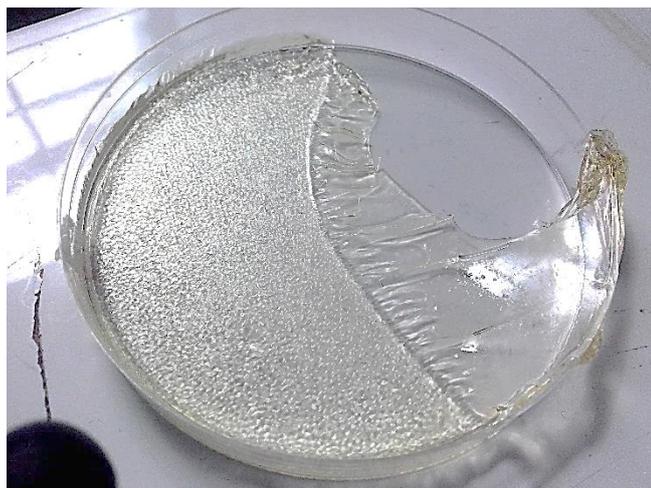


Figura 29. Biopelícula de Quitosano con APC

El método de elaboración de las soluciones formadoras de biopelículas entre Quitosano y proteínas, tiene una importante incidencia en el recubrimiento, pues afecta al grado de polimerización de los componentes, afectando al uso al cual se destina.

4.2.1 Análisis de STATGRAPHICS

El análisis estadístico de los resultados en pruebas de recubrimiento con fresa, se realizó con la ayuda del Software STATGRAPHICS Centurión XVI.I, según los resultados obtenidos de solución de mezclas de acuerdo a la tabla a la siguiente tabla:

Tabla 22. Resultados de pruebas de mezcla de Quitosano con APC en recubrimiento de fresa.

Nº Muestras	Q (g)	APC (g)	Recuento de Bacterias mesófilos aerobios (UFC/g)
M	-	-	1717
M ₁	0,1	0,01	830
M ₂	0,1	0,02	780
M ₃	0,1	0,03	620
M ₄	0,2	0,01	500
M ₅	0,2	0,02	460
M ₆	0,2	0,03	390
M ₇	0,3	0,01	450
M ₈	0,3	0,02	360
M ₉	0,3	0,03	326

Fuente: Certificado de Análisis microbiológico.

Según tabla 22, se observa las pruebas de solución de mezcla de quitosano con APC, pruebas realizadas en recubrimientos de fresa; de los cuales el más óptimo es la muestra M9 con 0,3:0,03 (Q_(g):APC_(g)). Los resultados obtenidos del análisis microbiológico nos indica que a mayor concentración de quitosano y aislado proteico es más eficiente en el recubrimiento de alimentos; los polímeros de quitosano y aislado proteico de cañihua actúan como un agente antimicrobiano; las propiedades antimicrobianas de soluciones y películas de quitosano has sido reportadas en varios estudios, mostrado con gran capacidad de disminuir la multiplicación de una amplia variedad de bacterias; esto implica, que la Biopelícula de la mezcla de Q + APC actúa como un efecto bactericida, inhibiendo el crecimiento de las bacterias mesofilos aerobios, mohos y levaduras. Así mismos estos resultados tienen validez según citado por Aider et al., (2010), quien afirma, que en general se reconoce que levaduras y mohos son los microorganismos más sensibles al quitosano, seguido por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Aider et al., 2010).

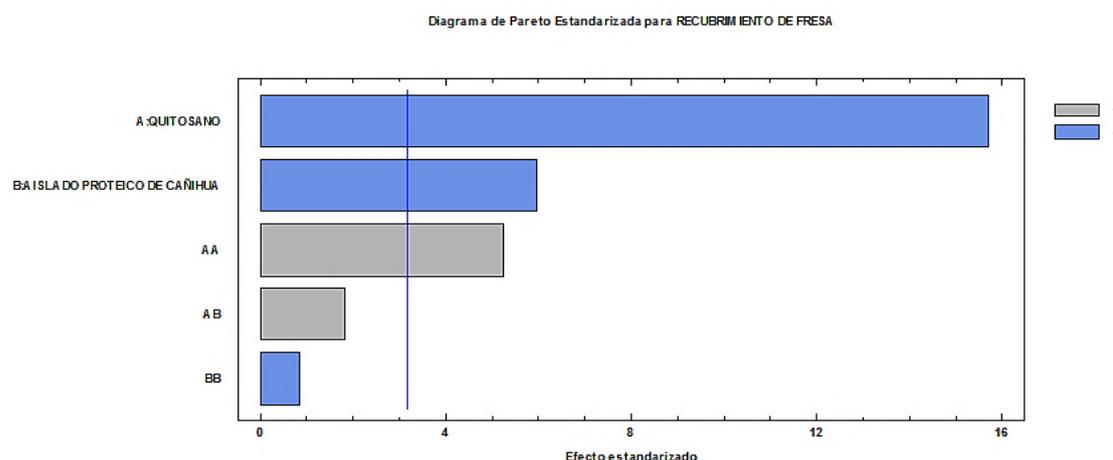


Figura 30. Diagrama de Pareto Estandarizado (DPE)

Fuente: Software de STATGRAPHICS

El diagrama de Pareto de la Figura 30, se observa los efectos más significativos de las variables en recubrimiento de alimentos. El factor A (Quitosano) tiene mayor efecto significativo en el recubrimiento de la fresa, seguido del factor B (Aislado proteico de Cañihua), es el centro de la región experimental del trabajo donde los variables son independientes lo que corresponde a la superficie respuesta.

Tabla 23. Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F
A:QUITOSANO	206833,	1	206833,	246,41
B:AISLADO PROTEICO DE CAÑIHUA	29962,7	1	29962,7	35,70
AA	23184,2	1	23184,2	27,62
AB	2809,0	1	2809,0	3,35
BB	600,889	1	600,889	0,72
Error total	2518,11	3	839,37	
Total (corr.)	265908,0	8		

Fuente: Software de STATGRAPHICS

En la tabla 23, se observa el análisis de la varianza, donde:

R-cuadrada = 99,053 por ciento

R-cuadrada (ajustada por g.l.) = 97,4747 por ciento

Error estándar del est. = 28,9719

Error absoluto medio = 14,4691

Estadístico Durbin-Watson = 1,60515 (P=0,0792)

Autocorrelación residual de Lag 1 = 0,189908

La tabla ANOVA particiona la variabilidad de RECUBRIMIENTO DE FRESA en piezas separadas para cada uno de los efectos. Entonces prueba la significancia estadística de cada efecto comparando su cuadrado medio contra un estimado del error experimental. En este caso, 3 efectos tienen un valor-P menor que 0,05, indicando que son significativamente diferentes de cero con un nivel de confianza del 95,0%.

El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo, así ajustado, explica 99,053% de la variabilidad en RECUBRIMIENTO DE FRESA. El estadístico R-cuadrada ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, es 97,4747%. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos es 28,9719. El error medio absoluto (MAE) de 14,4691 es el valor promedio de los residuos. El estadístico de Durbin-Watson (DW) prueba los residuos para determinar si haya alguna correlación significativa basada en el orden en que se presentan los datos en el archivo. Puesto que el valor-P es mayor que 5,0%, no hay indicación de autocorrelación serial en los residuos con un nivel de significancia del 5,0%.

Tabla 24. Resultados Estimados para recubrimiento de fresa

	Observados	Ajustados	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Fila	Valores	Valores	para Media	para Media
1	830,0	834,722	751,969	917,476
2	500,0	514,889	446,166	583,612
3	430,0	410,389	327,635	493,142
4	780,0	754,889	686,166	823,612
5	460,0	461,556	392,833	530,279
6	360,0	383,556	314,833	452,279
7	620,0	640,389	557,635	723,142
8	390,0	373,556	304,833	442,279
9	326,0	322,056	239,302	404,809

Fuente: Software de STATGRAPHICS

En la tabla 24, contiene información acerca de los valores de RECUBRIMIENTO DE FRESA generados usando el modelo ajustado. La tabla incluye:

- (1) los valores observados de RECUBRIMIENTO DE FRESA (si alguno)
- (2) el valor predicho de RECUBRIMIENTO DE FRESA usando el modelo ajustado
- (3) intervalos de confianza del 95,0% para la respuesta media

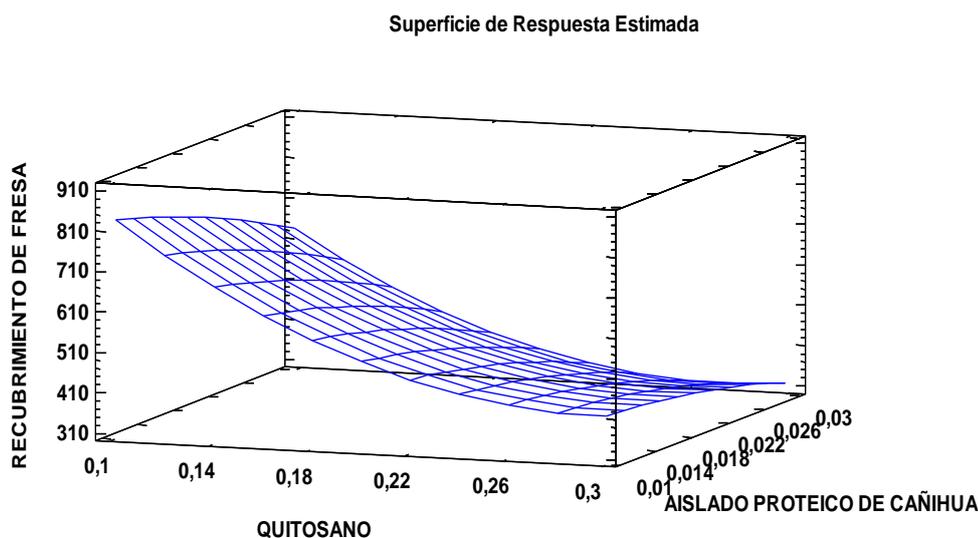


Figura 31. Superficie de respuesta estimada

En la figura 31, se observa la superficie de respuesta estimada de recubrimiento de fresa en equilibrio con respecto a la mezcla de solución entre Q y APC.

Discusión:

Biopelículas, obtenidas a partir de la mezcla de Quitosano de Langostino con aislado proteico de Cañihua, son transparentes, firmes y algo flexibles, se forman por el moldeo de solución acuosa y a través de la evaporación del solvente; este resultado se valida de acuerdo a trabajos realizados por López (2014), quien elaboró películas poliméricas por medio del método de evaporación lenta mediante procesos térmicos y químicos, con el fin de evaluar su posible inhibición de bacterias *B.cereus* (*Baciliuscereus*) y *E. coli* (*Escherichiacoli*). Del mismo modo, Hoyos, (1997) señala que el Quitosano, en su calidad de polímero formador de películas comestibles biodegradables; Por otra parte, Khan et al., (2000) considera que al Quitosano como un biopolímero que forma películas con excelentes propiedades mecánicas, adhesivas y de permeabilidad, además

de poseer propiedades antimicrobianas.

El grado de desacetilación según figura 25, en base al análisis reportado por Laboratorio UNMSM; se obtuvo $DD = 83,189\%$; dicho resultado se contrasta con estudios realizado por Lalaleo (2010), “Desarrollo de un método para la obtención de quitosano a partir de caparzones de camarón (*penaeus vannamei*), quien obtuvo un grado de desacetilación del $74,24\%$ en base al análisis por espectroscopia infrarroja, donde todos los parámetros reportados corresponden a tratamientos con el uso del agente reductor.

Las biopelículas se pueden obtener con agregado o mezcla de proteína de diferentes productos, con una capacidad de barrera selectiva, así como señala Lim et al. (1999), películas y recubrimientos comestibles son elaborados a base de fuentes renovables tales como carbohidratos, lípidos y proteínas. También considera González et al. (2015) Entre estos materiales poliméricos, la goma gelana se ha empezado a utilizar en la elaboración de películas comestibles debido a sus propiedades espesantes y gelificantes. En el presente estudio Biopelículas elaborados a partir de la mezcla de Quitosano de Langostino con aislado proteico de Cañihua, tiene relación con citas mencionados, por lo tanto, se valida el presente trabajo.

4.3 Aplicación de solución del quitosano y APC para conservación de fresa

Las fresas se seleccionaron de manera uniforme por madurez, tamaño, libres de microorganismos y defectos físicos donde se lavaron las fresas con una solución clorada durante 3 min y secadas a temperatura ambiente. En 9 vasos precipitados se agregó 25 mL de $C_3H_6O_3$ al 1% (p/v) a cada vaso precipitado con las diferentes mezclas de quitosano y aislado proteico de la cañihua (0,1:0,01; 0,2:0,01; 0,3:0,01; 0,1:0,02; 0,2:0,02; 0,3:0,02; 0,1:0,03; 0,2:0,03; 0,3:0,03). Procediéndose con la agitación constante las soluciones, disolviendo en su totalidad el quitosano midiendo el pH de las soluciones de mezcla. Donde se aplicó el recubrimiento a las fresas por separado por cada tratamiento, se sumergen en la solución por 2 min y realizar con agitación suave para garantizar homogeneidad, se coloca las fresas recubiertas en capsulas pequeñas con cierta distancia de una a la otra y dejar secar a temperatura ambiente, haciendo uso de pinzas.

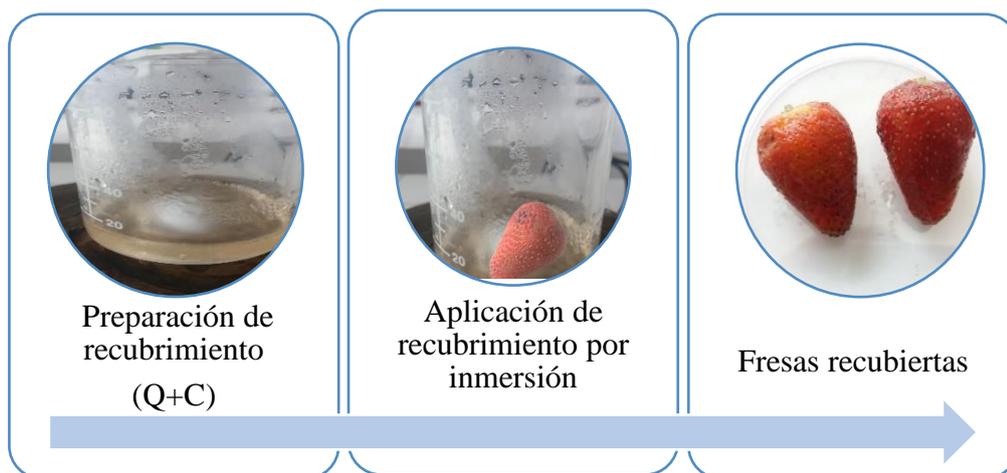


Figura 32. Recubrimiento de fresas

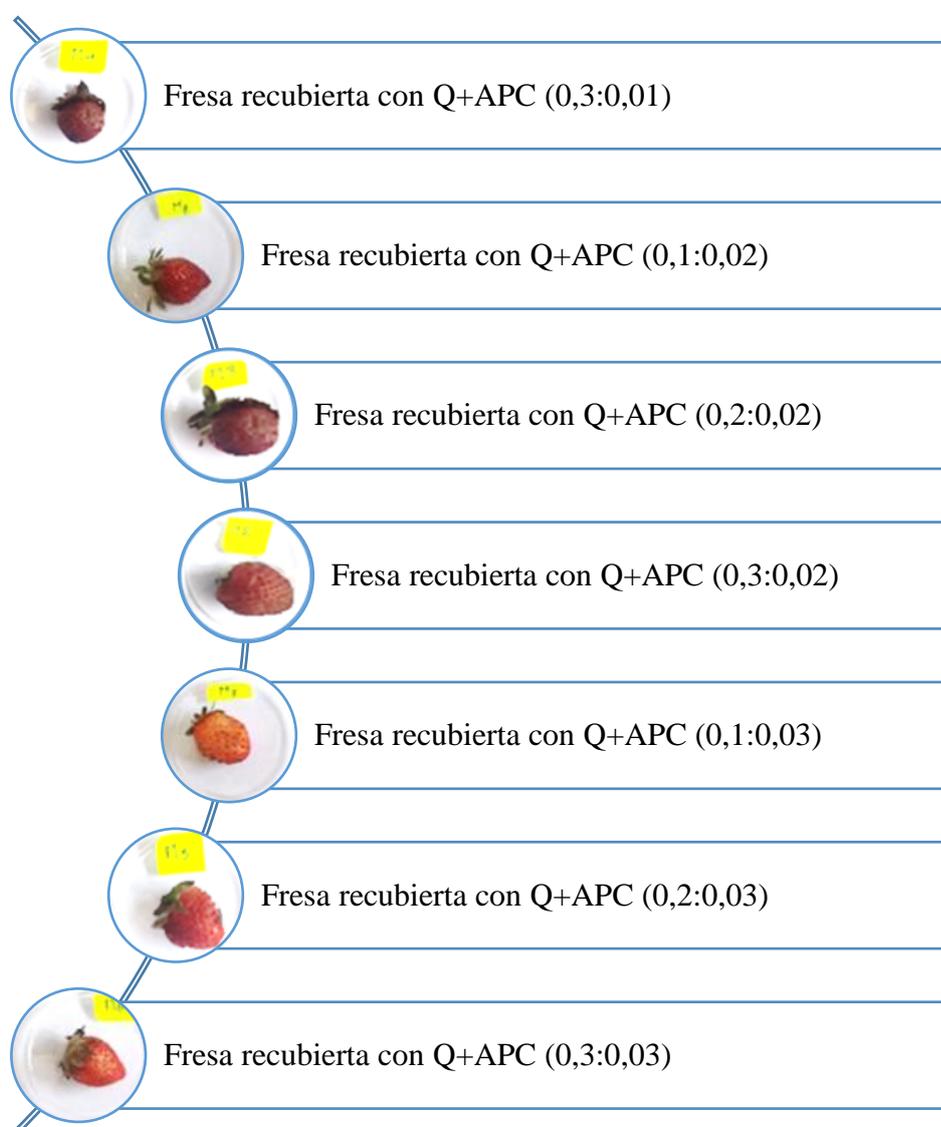


Figura 33. Secuencias de cambios observados durante el almacenamiento de las fresas recubiertas con quitosano más aislado proteico de cañihua.

Se determinó que las fresas recubiertas con más gramos de quitosano y aislado proteico de la cañihua, en las muestras 6, 7, 8 y 9 conservaron sus propiedades organolépticas hasta el día 13, mientras que en la fresa testigo y las muestras 1,2,3,4,5 perdían la aceptabilidad durante el día 10 de almacenamiento, muestran una mayor apariencia de envejecimiento, deshidratación, cambio profundo en la superficie. Se evidencio el comienzo de daño microbiológico por pudrición, en tanto que en todas las muestras con recubrimiento comenzaron a mostrar daño microbiológico a los 13 días.

4.3.1 Propiedades fisicoquímicas de conservación de fresa con recubrimiento

4.3.1.1 Sólidos solubles

El contenido de sólidos solubles se determinó con el índice de refracción. El índice de refracción y los grados °Brix son suficientes para determinar el contenido de solidos solubles en la fresa recubierta (SST). Se utilizó un refractómetro manual el cual cuantifica de manera directa e porcentaje del contenido de solubles expresados como grados °Brix.

Tabla 25. Resultados de solidos solubles de fresas recubiertas.

Determinación de solidos solubles en fresas (°Brix)						
	Muestra	Días				
		1	5	8	11	13
Muestra SR	M₀	7,49	8,27	8,94	9,77	10,68
Fresas CR (Q+APC)	M₁	7,41	7,95	8,46	8,92	9,46
	M₅	7,57	7,84	8,11	8,39	9,04
	M₉	7,27	7,55	7,85	8,24	8,71

Según tabla 25, se observa los resultados de solidos solubles de fresas recubiertas, se nota claramente los cambios que se presentan en cada una de las evaluaciones de las muestras tratadas. En la primera evaluación de muestra M (sin recubrimiento), en el día 1 tiene 7,49 de °Brix y en el día 13 presenta 10,68 de °Brix, esto implica que la fresa en su estado natural, a mayor tiempo aumenta el nivel de °Brix; sin embargo, las muestra de fresas con recubrimiento es menos y retiene el nivel de °Brix, tal como se observa en la M₉ (0,3:0,03) que en el día 1 tiene 7,27 de °Brix y en el día 13 presenta 8,71 °Brix de concentración Solidos solubles, es decir, queda demostrado que la Biopolículas a partir

de las solución de la mezcla de Q con APC, cumple una función importante en la retención de aumento de solidos solubles.

Por lo tanto, estos resultados se valida con Pastor y Ortolá (2005) quienes sostienen que este hecho está relacionado con el papel protector de la película frente al intercambio gaseoso con el ambiente, ralentizando el metabolismo y los procesos de síntesis de compuestos azucarados. Por el contrario, las muestras control, sin barrera de protección, aumentan de forma paulatina su contenido de sólidos disueltos.

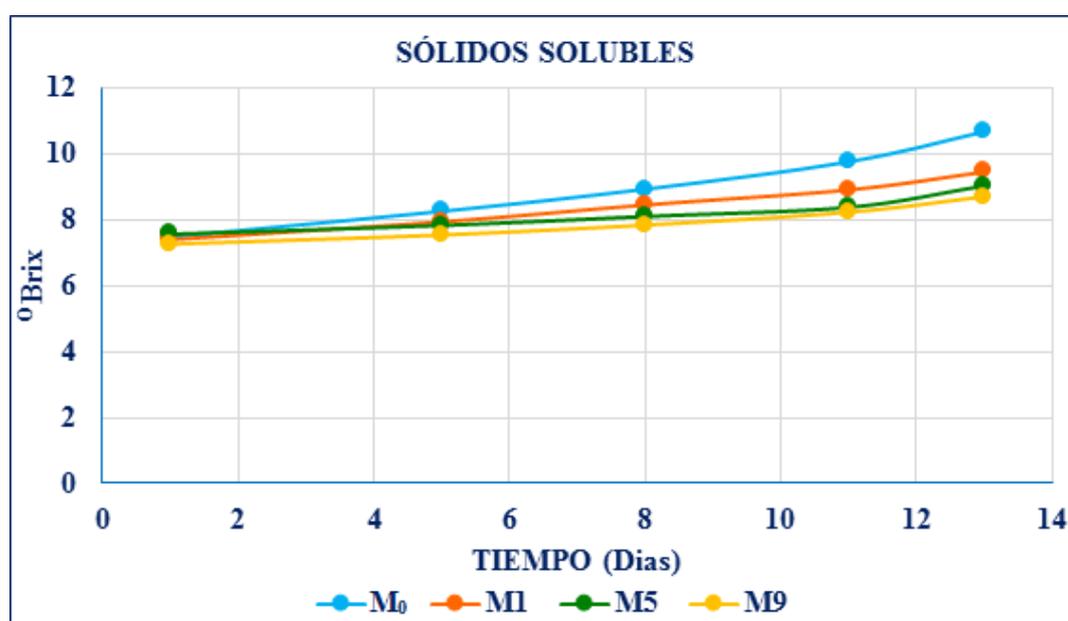


Figura 34. Resultados de la determinación de °Brix de las tres muestras de fresas

En la figura 34, se observa, la fresa M₀ es la que presentó mayor contenido de SST después de los 13 días; mientras que las fresas M₁, M₅ y M₉ recubiertas con biopelículas, el °Brix aumentaron en una menor porción debido a que el recubrimiento aplicado permita una menor formación de sólidos en la matriz de la fresa.

4.3.1.2 Pérdida de peso

Durante el almacenamiento de frutas, se lleva a cabo procesos de respiración y transpiración, en los cuales se da el intercambio gaseoso de CO₂ y O₂ y la eliminación de agua; los mismos que están involucrados con procesos metabólicos y de senescencia. Estos se pueden ver reflejados en los cambios físicos y químicos que sufre el alimento, pudiéndose estimar de forma cuantitativa a través de la determinación de algunas

propiedades. Una de ellas es la estimación de la pérdida de peso, asociada con la eliminación de agua del tejido celular.

En este contexto, se observó el efecto de las biopelículas, de tal forma se registró de forma periódica la pérdida de peso de las 9 muestras de fresas recubiertas con Biopelículas, de las cuales solo se tomaron 4, las más principales, el registro de datos se procesó como porcentaje en pérdida de peso, en base a los valores iniciales y finales obtenidos mediante la siguiente ecuación:

$$PFS = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \tag{6}$$

$$PFS = \frac{3,189 - 3,129}{3,189} \times 100$$

PFS = 1.881

Tabla 26. Resultados de pérdida de peso de fresas tratadas

Nº	Día 1	PFS	Día 5	PFS	Día 8	PFS	Día 11	PFS	Día 13	PFS
M	3,204	0	2,954	7,803	2,589	19,195	1,947	39,232	1,028	67,915
M ₁	3,224	0	3,144	2,481	3,064	4,963	2,984	7,444	2,564	20,471
M ₅	3,303	0	3,223	2,422	3,133	5,147	3,033	8,174	2,823	14,532
M ₉	3,189	0	3,129	1,881	3,069	3,763	3,007	5,707	2,943	7,714

Según tabla 26, Se observa los resultados de la pérdida peso de las fresas tratadas 1 a 13 días, de los cuales la muestra inicial M (fresa en su estado natural), presenta un valor de 67,915% de PFS , sin embargo la muestra M₉ es el más óptimo, en 13 días presenta como resultado de 7,714 % PFS, lo que implica que mayor proporción de mezcla de quitosano con APC dan mayor permeabilidad, y se deduce que las proteínas están interactuando con el Quitosano de tal forma ayuda como barrera en la capacidad de retención de agua influyendo positivamente en esta propiedad de permeabilidad al vapor de agua; lo que implica una mayor permeabilidad al vapor de agua con mezclas entre Q y APC.

Rivera y Silva (2006), señala que podría ser por la capacidad de retención de agua de las proteínas de quínoa, lo cual influye positivamente en esta propiedad de permeabilidad al vapor de agua. En efecto, estos resultados se aproximan a los estudios realizado por

Luna (2012), con recubrimientos de (1%Q+AC5%) y (1,5%Q+AC5%) hasta el día de su evaluación presentaron pérdida de firmeza y color y producción de hongos, mientras que para (1%Q+AC10%) y (1,5%Q+AC10%) no hubo presencia de hongos hasta el último día evaluado, pero aparecieron 2 días. Por consiguiente, la pérdida de peso se ve disminuida por la presencia de dos capas de recubrimiento de las soluciones con biopolímero, esta reacción ha sido reportada por otros investigadores, tales como Colla (2006) y Ruiz (2009), en aplicación de recubrimientos comestibles que tienen presente almidón en su composición. Estos reportan como posible causa, el estrés que sufre el alimento durante el periodo de secado seguido de presencia de grietas en el recubrimiento, lo cual favorecería la transmisión de agua hacia el exterior.

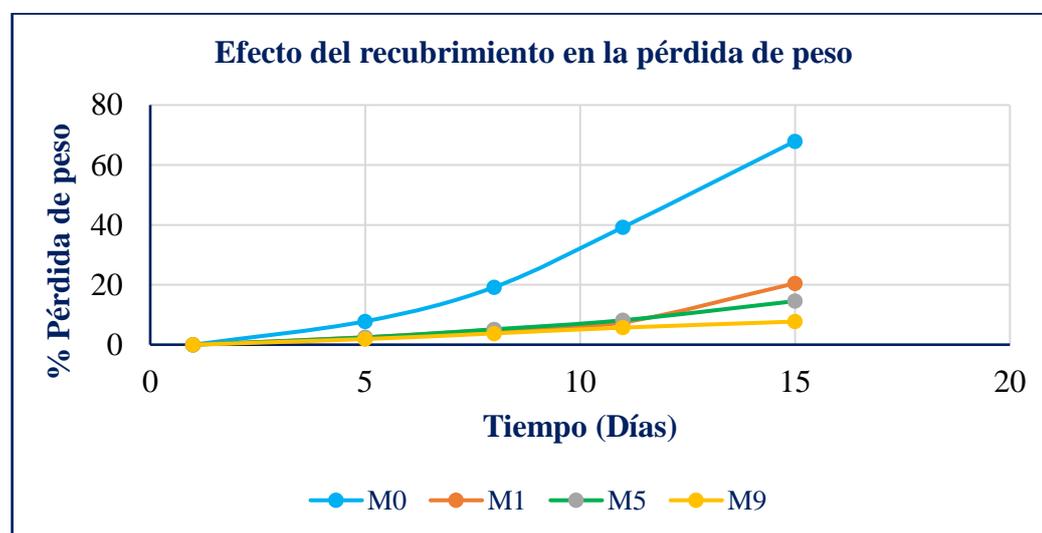


Figura 35. Pérdida de peso de las fresas tratadas con los distintos recubrimientos.

En la figura 35, se observa los efectos del recubrimiento en la pérdida de peso, de los cuales la M_0 de la fresa natural del primer día hasta el día 15, tiene una mayor velocidad de pérdida de peso; sin embargo las muestra recubierta, tiene una menor pérdida que las demás muestras en estudio, esto implica, que la Biopelícula tiene un efecto positivo en la barrera contra la pérdida de humedad; a mayor proporción de Quitosano más APC, es menor la pérdida de peso tal como se observa los efectos de la M_9 .

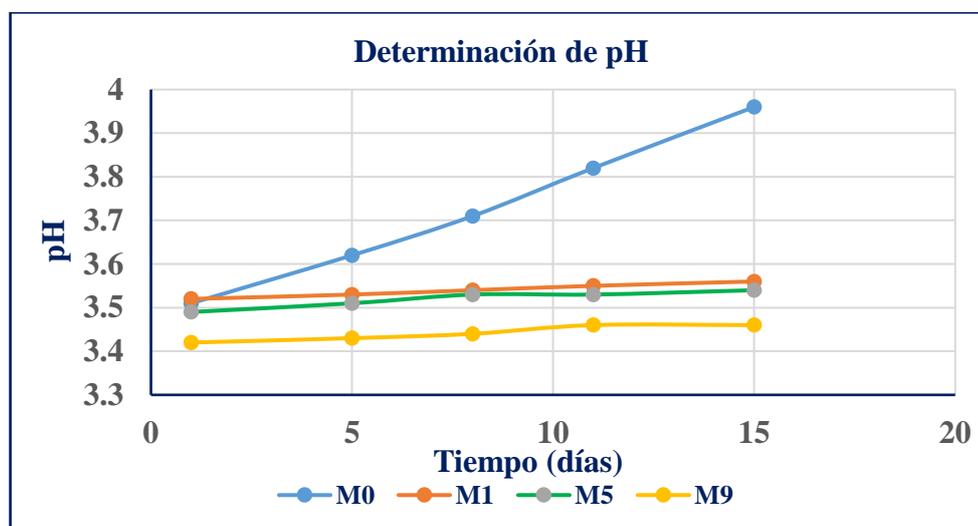
4.3.1.3 pH

Las mediciones del pH se realizaron con un pH TRI-METER, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 27. Resultados de la determinación de pH.

Determinación de pH						
	Muestra	Días				
		1	5	8	11	13
Muestra SR	M ₀	3,51	3,62	3,71	3,82	3,96
Fresas CR (Q+APC)	M ₁	3,52	3,53	3,54	3,55	3,56
	M ₅	3,49	3,51	3,53	3,53	3,54
	M ₉	3,42	3,43	3,44	3,46	3,46

En la tabla 27, se observa los resultados de la medición de pH de las muestra de recubrimiento de fresas, de los cuales en la M₀ (sin recubrimiento) en el día 1 presenta un pH de 3,51 y en el día 13 asciende a un pH de 3,96; sin embargo, en la muestra M₉ inicialmente en día 1, se observa un pH de 3,42 y en día 13 mantiene casi contante a un pH de 3,42; estos resultados nos indica, que la biopelícula a partir de una mezcla de solución de Q con APC preserva la acidez de la fresa.

**Figura 36.** Comparación de pH de fresas tratadas con mezclas Q y APC.

En la figura 36, se observa la comparación de los efectos del pH en recubrimiento de fresas con diferentes mezclas de Q y APC, de los cuales de la muestra testigo M₀ el pH tiene una variación considerable; sin embargo, en las muestras con recubrimiento de biopelículas el pH es casi constante; por lo tanto, entre la fresa testigo y fresa en tratamiento si se observa una diferencia de pH. Siendo la muestra M₉ más eficiente a partir de día 1has el día 13 es casi contante.

4.3.1.4 Resultados de Análisis microbiológico de pruebas de recubrimiento

Para las pruebas de recubrimiento se realizó 9 pruebas en fresas, aplicando el diseño experimental 3^k , según los datos establecidos en la tabla 10, y para el respectivo análisis, se determinó en el Laboratorio de microbiología de Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia; donde:

- M : Fresa en su estado natural
- M₀ : Fresa sin Recubrimiento
- M₁ : Fresa con recubrimiento (Q +APC: (0,1:0,01)
- M₂ : Fresa con recubrimiento (Q +APC: (0,1:0,02)
- M₃ : Fresa con recubrimiento (Q +APC: (0,1:0,03)
- M₄ : Fresa con recubrimiento (Q +APC: (0,2:0,01)
- M₅ : Fresa con recubrimiento (Q +APC: (0,2:0,02)
- M₆ : Fresa con recubrimiento (Q +APC: (0,2:0,03)
- M₇ : Fresa con recubrimiento (Q +APC: (0,3:0,01)
- M₈ : Fresa con recubrimiento (Q +APC: (0,3:0,02)
- M₉ : Fresa con recubrimiento (Q +APC: (0,3:0,03)

Tabla 28. Resultados de mezcla de Quitosano con APC en recubrimiento de fresa

Nº Muestras	Q (g)	APC (g)	Recuento de Bacterias mesófilos aerobios (UFC/g)	Mohos (UFC/g)	Levadura (UFC/g)
M	-	-	1717	30	506
M ₀	-	-	Indefinido	Indefinido	Indefinido
M ₁	0,1	0,01	830	Negativo	100
M ₂	0,1	0,02	780	Negativo	85
M ₃	0,1	0,03	620	Negativo	70
M ₄	0,2	0,01	500	Negativo	80
M ₅	0,2	0,02	460	Negativo	75
M ₆	0,2	0,03	390	Negativo	60
M ₇	0,3	0,01	450	Negativo	70
M ₈	0,3	0,02	360	Negativo	62
M ₉	0,3	0,03	326	Negativo	50

Fuente: Certificado de Análisis microbiológico.

En la tabla 28, se observa los resultados en Unidades Formadoras de Colonia (UFC/g), indica el grado de contaminación microbiológica de fresas recubiertas con mezcla de Quitosano con APC durante 13 días en las mismas condiciones de refrigeración, de los cuales el análisis microbiológico de la fresa en su estado natural (M) contiene el recuento de Bacterias mesófilos aerobios de 1717 UFC/g, mohos 30 UFC/g y Levaduras 506 UFC/g. La muestra de fresa sin recubrimiento (M_0) según el reporte de análisis microbiológico, el recuento de Bacterias mesófilos aerobios, mohos y Levaduras es indefinido, debido a un notable crecimiento acelerado de microorganismos; en cambio el resto de las muestras de fresa con recubrimiento de mezcla de Quitosano mas el APC, presenta resultados muy eficientes.

La muestra de fresa con recubrimiento (M_9) en comparación con la muestra de fresa en su estado natural (M), que a partir de 1717 UFC/g de Bacterias mesófilos aerobios ha reducido a 326 UFC/g, siendo el máximo 10^4 UFC/g según RM MINSA; Mohos de 30 UFC/g a negativo siendo el máximo 10^2 y el recuento de Levaduras 506 UFC/g a 50 UFC/g, siendo el máximo 10^2 . Estos resultados óptimos de recubrimiento, es debido a que la película de la mezcla de Q + APC actúa como un efecto bactericida, inhibiendo el crecimiento de las bacterias mesófilos aerobios, mohos y Levaduras; siendo la solución óptima de la mezcla de Q +APC es de 0,3:0,03 para el recubrimiento de la fresa, donde se encuentra dentro de los límites máximos permisibles según la norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano (RM N° 591-2008/MINSA), nos indica que todos los parámetros analizados se encuentran dentro de los límites máximos permisibles, por lo tanto es apto para consumo humano.

El mecanismo de la acción de las Biopelículas a partir de la de la mezcla de solución de Quitosano (Q) con aislado proteico de Cañihua (APC), se produce una interacción electrostática entre el Q que se encuentra disuelto en medio ácido y el extracto EAP a pH alcalino, produciendo un complejo Q-APC, comportamiento mecánico y la permeabilidad de las películas de Q-APC mediante la modificación del pH; este mecanismo se fundamenta según citado por Tapia et al.(2005); quienes consideran que el objeto de formar un complejo polielectrolito, ambos polímeros tienen que estar ionizados y presentar sus cargas opuestas. Por otro lado, Ritthidej et al. (2002), Afirma que esta capacidad se debe a la formación de puentes de hidrógeno intra e

intermoleculares en las cadenas de Quitosano; por lo tanto, la presencia de una alta concentración de proteínas dentro de las soluciones formadoras de biopelículas, tiende a aumentar la permeabilidad al vapor de agua y la pérdida de peso, sobre el fruto en el que se aplica.

Discusión:

Según resultados de la tabla 25, se nota claramente los cambios que se presentan en cada una de las evaluaciones de las muestras tratadas, en la muestra M (sin recubrimiento), en el día 1 tiene 7,49 de °Brix y en el día 13 presenta 10,68 de °Brix, esto implica que la fresa en su estado natural, a mayor tiempo aumenta el nivel de °Brix; sin embargo, según figura 30, las muestra de fresas con recubrimiento su nivel de °Brix es casi constante; por lo tanto, estos resultados se valida con Pastor y Ortolá (2005) quienes sostienen que este hecho está relacionado con el papel protector de la película frente al intercambio gaseoso con el ambiente, ralentizando el metabolismo y los procesos de síntesis de compuestos azucarados. Por el contrario, las muestras control, sin barrera de protección, aumentan de forma paulatina su contenido de sólidos disueltos.

De tabla 26, peso de las fresas tratadas 1 a 13 días, de los cuales la muestra inicial M (fresa en su estado natural), presenta un valor de 67,915% de PFS, sin embargo la muestra M₉ el más óptimo con recubrimiento de (0,3Q+0,03APC) en 13 días presenta como resultado de 7,714 % PFS, lo que implica que mayor proporción de mezcla de quitosano con APC dan mayor permeabilidad, y se deduce que las proteínas están interactuando con el Quitosano de tal forma ayuda como barrera en la capacidad de retención de agua influyendo positivamente en esta propiedad de permeabilidad al vapor de agua; lo que implica una mayor permeabilidad al vapor de agua con mezclas entre Q y APC; similar resultado obtuvo Rivera y Silva (2006), señala que podría ser por la capacidad de retención de agua de las proteínas de quínoa, lo cual influye positivamente en esta propiedad de permeabilidad al vapor de agua. En efecto, estos resultados se aproximan a los estudios realizado por Luna (2012), con recubrimientos de (1%Q+AC5%) y (1,5%Q+AC5%) hasta el día de su evaluación presentaron pérdida de firmeza y color y producción de hongos, mientras que para (1%Q+AC10%) y (1,5%Q+AC10%) no hubo presencia de hongos hasta el último día evaluado, pero aparecieron 2 días. Por consiguiente, la pérdida de peso se ve disminuida por la

presencia de dos capas de recubrimiento de las soluciones con biopolímero, esta reacción ha sido reportada por otros investigadores, tales como Colla (2006) y Ruiz (2009), en aplicación de recubrimientos comestibles que tienen presente almidón en su composición. Estos reportan como posible causa, el estrés que sufre el alimento durante el periodo de secado seguido de presencia de grietas en el recubrimiento, lo cual favorecería la transmisión de agua hacia el exterior.

En alimentos, la función más importante de las biopelículas comestibles es la reducción de la pérdida de humedad debido a que se deben mantener ciertos niveles de actividad de agua; Según los resultados obtenidos las biopelículas comestibles funcionan a la vez como barrera a la transferencia de agua, gases y solutos de alimentos al mismo tiempo sirve para proteger a los alimentos como un inhibidor del ataque microbiológico y para prevenir la pérdida de agua durante el almacenamiento, tal como señala Sebtí et al. (2005) que las películas basadas en quitosano protegen los alimentos de la degradación por hongos y modifican la atmósfera de frutos frescos; el quitosano puede ser solubilizado en soluciones diluidas de ácidos minerales como el clorhídrico o ácidos orgánicos como el acético, láctico y cítrico.

Los polímeros formadores de películas como recubrimiento presentan características funcionales de cada uno de los componentes que buscan fusionar las mejores características de estos materiales en busca de mejorar las propiedades mecánicas y de barrera, en su calidad de polímero formador de películas comestibles biodegradables, ambiente según Hoyos (1997) considerada como una potencial alternativa para reemplazar al plástico como medio de empaque, lo que sin duda, se traduce en un mayor cuidado al medio. Por otra parte, el quitosano es un biopolímero que forma películas con excelentes propiedades mecánicas, adhesivas y de permeabilidad, además de poseer propiedades antimicrobianas (Khan y col., 2000).

Los datos de la tabla 28, nos indica que las películas sobre las fresas recubiertas actúan como un prolongar de la vida útil, esto se corrobora citado por Hoyos (1997) que las películas de quitosano se aplican para prolongar la vida útil de diversas frutas como: peras, naranjas, melocotón y ciruelas como barrera para el dióxido de carbono y el oxígeno. También existen estudios relacionados a la efectividad de las películas basadas en quitosano aplicadas a frambuesas, éstas son altamente perecibles debido a su alta tasa

de respiración y su vulnerabilidad al ataque de hongos, el estudio fue desarrollado por Chunran y col. (2005) quienes presentaron resultados favorables al aplicar películas de solución de quitosano al 1% en frambuesas.

La solución óptima de la mezcla de Q con APC es de 0,3:0,03, es similar a los resultados obtenido por Valenzuela (2012), en su trabajo de Bio-películas comestibles en base a mezclas entre proteínas de quínoa y quitosano. Con respecto a los mecanismos de acción antimicrobiana del quitosano; la actividad antimicrobiana del quitosano defiende el microorganismo, en el caso de los hongos, este polímero ejerce un efecto antifúngico inhibiendo la formación de esporas e hifas (Hernandez-Lauzardo et al., 2008). Respecto al mecanismo de acción antimicrobiana del quitosano no está totalmente definido, según estudios realizados, los investigadores coinciden que posee tres posibles acciones.

Carácter catiónico: el primer mecanismo se basa en las cargas positivas que posee el quitosano (NH_3^+), debido a la presencia de un cambio sobre en C-2 del monómero de la glucosamina, cuando este polímero se solubiliza en soluciones acidas con pH menor a su pKa (pH=6-7) y para el caso de las soluciones de quitosanos llevadas a pH 5,5 se ha estimado que los grupos aminos se encuentran parcialmente protonados; y para pHs menores estos grupos se encuentran protonados (Helander et al., 2001; No et al., 2017), reaccionando potentemente con los grupos hidrofílicos aniónicos (tales como lipopolisacárido), que juegan un papel primordial en la actividad antibacteriana de las membranas celulares de los microorganismos (Rabea et al., 2003).

Agente quelante: el quitosano puede actuar como agente quelante, formando complejos con metales trazas (incluyendo Ni_2^+ , Zn_2^+ , Co_2^+ , Fe_2^+ , Mg_2^+ y Cu_2^+) en condiciones acidas, inhibiendo el desarrollo microbiano y producción de toxinas, y la disponibilidad de micronutrientes esenciales para las actividades celulares vitales de los microorganismos (Rabea et al., 2003).

Penetración al interior de la célula: como tercer mecanismo se ha postulado que oligómeros de quitosano de bajo peso molecular penetran en las células de los microorganismos e impiden el crecimiento de estas, ya que inhibe la acción de varias enzimas e interfiere en la síntesis de proteínas por inhibición de la transformación de ADN en ARN (Tharanathan y Kittur, 2003).

V. CONCLUSIÓN

Se elaboró Biopelículas para envasado de alimentos a partir del Quitosano (escamas de Langostino) con el aislado proteico de Cañihua de aspecto transparente, firme y algo flexibles, se formó por el moldeo de solución acuosa y a través de la evaporación del solvente; siendo la solución de mezcla más óptima, según el Análisis de STATGRAPHICS y el análisis microbiológico en pruebas de recubrimiento de fresa es de 0,3:0,03(Q_(g):APC_(g)), diluido en 25 mL de solución C₃H₆O₃, (1%) con 0,05 mL C₃H₈O₃ (Glicerina) en tiempo de 1 h y 30 min con Agitación de 150 rpm.

El quitosano se obtuvo a partir de 43,4 g de quitina en solución diluida de NaOH al 50 %; como resultado final se obtuvo 21,2 g de Quitosano con un rendimiento de 83,189 % y el aislado proteico a partir de 70 g de Cañihua pasado por tamiz de malla 60 a 1000 rpm en centrifugadora durante 20 min, como resultado final se obtuvo 1,301 g de proteína, equivalente a un rendimiento de 1,857 %.

La solución de mezcla se ha preparado según los factores y niveles establecidos en el diseño experimental de quitosano en gramos de 0,1; 0,2; y 0,3 con APC en gramos de 0,01; 0,02 y 0,03 diluidos en solución entre 25 mL de C₃H₆O₃ (Ácido láctico) al 1% y 0,5 mL de C₃H₈O₃ (Glicerina) en tiempo de 1 h y 30 min con Agitación de 150 rpm a 30 °C; lo más importante de las biopelículas comestibles es la reducción de la pérdida de humedad debido a que se deben mantener ciertos niveles de actividad de agua.

Las propiedades fisicoquímicas del análisis microbiológico de la conservación de fresa con recubrimiento durante 13 días, el más óptimo fue en la muestra M₉ con sólidos solubles: 8,71 °Brix, pérdida de peso: 7,714 % PFS, pH: 3,42; en las mismas condiciones de refrigeración, de los cuales la fresa en su estado natural contiene un alto crecimiento del recuento de Bacterias mesófilos aerobios de 1717 UFC/g, mohos 30 UFC/g y Levaduras 506 UFC/g; en cambio la muestra de recubrimiento con solución de mezcla más óptima reduce el crecimiento de Bacterias mesófilos aerobios a 326 UFC/g; Mohos negativo y levaduras 30 UFC/g; por lo tanto, en análisis microbiológicos indica, que la biopelícula a mayor concentración de quitosano y APC es más eficiente en el recubrimiento de alimentos, actúa como un efecto bactericida, inhibiendo el crecimiento de las bacterias mesófilos aerobios, mohos y Levaduras.

VI. RECOMENDACIONES

Con respecto al presente informe se recomienda los siguientes:

Evaluar en condiciones controladas la permeabilidad a gases como O_2 y CO_2 de Biopelículas con la finalidad de obtener información sobre la barrera y el comportamiento de mezcla entre Q y APC en recubiertas de frutas.

Llevar a cabo evaluaciones de estabilidad de las mezclas evaluadas, a diferentes temperaturas y porcentajes de humedad, y así determinar si las películas pueden ser adecuadas para recubrir alimentos como los hortofrutícolas

Promover en el sector industrial la extracción de quitina y obtención de quitosano a partir de los desechos de Langostino, con la finalidad de dar valor agregado a productos naturales de Crustáceo.

Realizar investigaciones de Quitosano y Aislado Proteico de Cañihua y su aplicación en la medicina, y remoción de metales pesados en aguas residuales contaminados.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Apaza, M. V. (2010). *Manejo y Mejoramiento de Kañiwa. Convenio Instituto Nacional de Innovación Agraria INIA-Puno, Centro de Investigación de Recursos Naturales y Medio Ambiente-CIRNMA, Bioversity International y el International Fund for Agricultural Development-IFAD*. Puno, Perú.
- Badui D, S. (1987). *Química de los alimentos*.
- Bautista, S., Hernández L, A. N., Velázquez, M. G., & Hernández L, M. (2005). *Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities*.
- Bermúdez, A., Hernando, N., Gabriel, R., & Navas, S. (2002). *Litopenaeus vannamei*. Bogotá: INVEMAR. Ministerio de medio ambiente.
- Bósquez, E. (2003). *Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquile y cera de canderilla para reducir la cinética de deterioro en fresco, del limón persa*. México.
- Cáceres, J. (2013). *Cultivos Andinos*. Producciones FM.
- Cagri, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. T. (2004). *Antimicrobial edible films and coatings*. Journal of Food Protection.
- Chiu, L., & Radisic, M. (2013). *Cardiac tissue engineering. Current Opinion in chemical Engineering*.
- Chunran, H., Lederer, C., Daniel, M., & Zhao, Y. (2005). *Sensory evaluation of fresh strawberries (Fragaria ananassa) coated with chitosan-based edible coatings*. J.Food Sci., 70(3):172-178.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R., & Chiellini, E. (2011). *Chitosan-A versatile semisynthetic polymer in biomedical. Progress in polymer science*.
- Descriptores para la cañihua, IPGRI. International Plant Genetic Resources Institute*. (s.f.). 2005.
- Drzewiecki, J., Licon D, E., Haruenkit, R., Pawelzik, E., Martin B, O., Seo P, Y., & Teck J, S. (2003). *Identification and differences of total protein and their soluble fractions in some pseudocereals based on electrophoretic patterns*. J. Agric. Food Chem.
- Dutta, P. K., & Mehrotra, G. K. (2009). *Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications*. Food chemistry.

- Eissa, A. A. (2007). *Effect of chitosan coating on shelf life quality of fresh-cut mushroom*. Journal of Food Quality.
- Escobar, D., Castro, A., & Vergara, N. (2013). *Determinacion de la relacion entre el porcentaje del grupo amino y el grado de desacetilacion del quitosano*. Universidad de Antioquia.
- Falguera, V., Quintero, P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). *Edible films and coatings: structures, active function and trends in their use*. Trends in Food Science & Technology.
- Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S., & Gerschenson, L. (2004). *Comportamiento mecánico dinámico de películas comestibles a bajas temperaturas, influencia del contenido de sorbato y grado de acidez*. Congreso CONAMET.
- Flórez, R., & Mora, R. (2010). *Fresa (Fragaria por ananassa Duch). Producción y manejo post cosecha*. Produmedios.
- Fong, L. (2012). *Evaluación del grado de conversión de quitina a quitosano procedente del exoesqueleto del abdomen del camarón (Litopenaeus Vannamel) en función del contenido de nitrógeno total medido durante la hidrólisis alcalina a nivel laboratorio*. Tesis de grado. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala.
- Girault, L. (1987). *Chenopodium Pallidicaule*. In Kallawaya. *Curanderos itinerantes de los Andes*. . Ist. ed.; Servicio Grafico Quipus. La Paz, Bolivia.
- González, R. E., Urbina, N. M., & Alcázar, L. B. (2015). *Caracterización Viscoelastica de Biopelículas Obtenidas a Base de Mezclas Binarias*.
- Horst, D. (2001). *Fundamentos de tecnología de los alimentos*. Zaragoza (España):Acribia.
- Hoyos, R., & Urreco, M. (1997). *Empaques y/o películas comestibles y biodegradables*. Facultad de Química Farmacèutica. U de A:8-107.
- Ikada, Y. (2006). *Scope of Tissue Engineering*. In *Tissue engineering: Fundamentals and Applications*.
- Juárez, C. (2012). *Obtención y caracterización de quitina biológica y su desacetilación a quitosano*. Tesis de grado de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México .
- Kester, J. J., & Fennema, O. (1986). *Edible films and coatings: A review*. Food Technology. Chicago, United States.

- Khan , T., Peh, K., & Ch'ng, H. (2000). *Mechanical bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing*. J Pharm Pharmaceut Sci, 3(3):303-311.
- Kong, M., Chen, X., Xing, K., & Park, H. (2010). *Antimicrobial properties of chitosan and mode of action*. A state of the art review. International Journal of food microbiology.
- Krochta , J. M., & Mulder Johnston, C. (1997). *Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportinities*. Food Technol.
- Lalaleo, L. P. (2010). *Desarrollo de un método para la obtención de quitosano a partir de caparzones de camarón (Penaeusvannamei), utilizando un agente reductor químico*. Tesis de grado. Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en alimentos. Ecuador.
- Lárez V, C. (2006). *Quitina y Quitosano: Materiales pasado para el presente y el futuro*. Avances en Química. Universidad de los Andes Merida. Venezuela.
- Lescano, J. (1997). *Cultivo de cañihua*. En: IX Congreso Internacional de Cultivos Andinos "Oscar Blanco Galdos" . Cuzco, Perú: Ariwa, CICA.
- Lim, L. T., Mine, Y., & Tung MA. (1999). *Barrier and tensible properties of transglutaminase cross linked gelatin films as affected by relative humidity and temperature and glycerol content* J Food Sci 64:616-622.
- López, C. P. (2014). *Obtención de quitosano a parti de desechos del exoesqueleto de camarón titi (xiphopenaeusriveti) para el desarrollo de películas poliméricas plastificadas con glicerina* . Tesis de grado. Universidad de San Buenaventura, Faultad de Ingeniería de Materiales. Santiago de Cali.
- Majeti, N., & Kumar, R. (2000). *A reviem of chitin an chitosan applications*. Reactive & functional polymers.
- Martínez, A., Cortez, J., & Ezquerra, A. (2010). *Chitosan composite films:Thermal, strcutural, mechanical and antifungal properties*. . Carbohydrate polymers.
- Medina M, L. (2005). *Estudio de la Acción de Quitosano como Absorvedor de proteínas Hidrosolubles: Optimización de Parámetros* . Facultad de Ciencias. Universidad Católica de Temuco Concepción. Chile.
- Méndez, M. (1981). *Clases de identificación y distribución de los langostinos y camarones (Crustacea:Decápoda) de mar y ríos de la costa del Perú*. Bol. Inst. Mar Perú. (Vol. 5). Callao-Perú.

- Mero, F. (2010). *Análisis de parámetros físicos y químicos en la maduración en cautiverio de camarones.* .
- Morey R, A. S., & Quinde B, A. L. (2012). *Obtención de Quitosano y su aplicación en Recubrimientos Comestibles en Mezcla con almidón.* Universidad de Guayaquil.
- Mujica, A. (2002). *La cañihua (Chenopodium Pallidicaule Aellen) en la nutrición Humana del Perú.*
- Pablo V, L. (2010). *Evaluación de cubiertas de quitosano aplicadas en papa para prolongar la vida de anaquel.* Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
- Pachence, J.M., Bohrer, M.P. & Kohn, J. (2007). *Biodegradable polymers. In principles og tissue engineering.*
- Parada, Luis; Crespín, G; Miranda , R; Katime, Issa;. (2004). *Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. Revista Iberoamericana de Poímeros.* (Vol. 5).
- Pereda. (2014). *Bio-películas para el envasado de alimentos: proteínas y carbohidratos.* Institutos de Investigaciones en Ciencias y Tecnología de Materiales INTEMA-CONICET. Universidad Nacional de Mar del Plata .
- Rastrelli, L., De Simone, F., Schettino, O., & Dini, A. (1996). *Constituents of Chenopodium pallidicaule (Cañihua) seeds: isolation and characterization of new triterpene saponins – J. Agric. Food Chem.*
- Rastrelli, L., Saturnino, P., Schettino, O., & Dini, A. (1995). *Studies on the constituents of Chenopodium Pallidicaule (cañihua) seeds. Isolation and characterization of two new Flavonol. J. Agric. Food Chem.*
- Revista Ciencias Técnicas Agrpecuarias .* (2015). ISSN-1010-2760, RNPS-0111, Vol.24, N° 3.
- Ritthidej, G., Phaechamud, T., & Koizumi, T. (2002). *Moist heat treatment on physicochemical change of chitosan salt films.* Int J of Pharm, 232 (1-2):11-22.
- Rojas, M. A. (2006). *Recubrimiento y sustancias de origen natural en manzana fresca cortada: una nueva estrategia de conservación.* Tesis de doctorado. Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad de Lleida. España.
- Sánchez G, L., Pastor , C., Vargas , M., Chiralt , A., & Gonzáles M, C. (2011). *Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold stored grapes.* Postharvest Biology and Technology.

- Savé, B. P. (2011). *Elaboración de nanopartículas de quitosano e incorporación en películas de quitosano-quinoa (chenopodium quinoa willd)*. Tesis de grado. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago, Chile.
- Sebti, I., Martial G, A., Carnet P, A., Grelier, S., & Coma, V. (2005). *Chitosan polymer as bioactive coating and film against Aspergillus Niger Contamination*. Journal of food science, 70(2):100-104.
- Simone, F., Dini, A., Pizza, C., Saturnino, P., & Schettino, O. (1990). *Two Flavonol Glycosides from Chenopodium Quinoa*. (11 ed., Vol. 29). Phytochemistry.
- Sionkowska, A., Wisniewskia, M., Skopinska, J., Kennedy, C. J., & Wess, T. J. (2004). *Molecular interactions in collagen and chitosan blends*. Biomaterials.
- Tapia, C. (2005). *Estudio de matrices hidrofílicas basadas en mezclas y complejos interpoliméricos como sistemas de liberación prolongada de fármaco*. Tesis de Doctorado en Ciencias Farmacéuticas. Universidad de Chile.
- Tapia, M. (1986). *Cultivos Andinos*. Cuzco-Perú.
- Torres, V. (1987). *Bioquímica de los Alimentos*.
- Torres, Z. (2000). *Estudio preliminar sobre métodos de evaluación de algunas propiedades físicas de películas biodegradables (tesis de diploma, Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de la Habana)*.
- Trejo . (2010). *Edible and Biodegradable Polymer Films: Challenges and Opportunities*. . Food Technol.
- Vaclavik, V. (2002). *Fundamentos de ciencia de los alimentos*. Zaragoza (España):Acribia.
- Valenzuela, C. (2006). *Obtención de quitosano de pota empleado altas dosis de radiacion gamma. Tesis para optar el titulo profesional de químico*. Lima Perú.
- Valenzuela, V. C. (2012). *Bio-películas comestibles en base a mezclas entre proteínas de quínoa y quitosano: elaboración, caracterización y su aplicación en frutillas*. Tesis de grado (Nutrición y alimentos). Facultad de Ciencias Agronómicas, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Facultad de Medicina, Facultad de Ciencias Veterinarias y Tecnología de Alimentos. Santiago, Chile.
- Valverde, J. M., Valero, D., Martínez, D., Guillén , F., Castillo, S., & Serrano, M. (2005). *Novel edible coating based on Aloe vera gel to maintain table grapes quality and safety*. J. Agric. Food Chem.

Vásquez, L., & Vidal, B. (2011). *Caracterización y alternativa de uso de una película biodegradable de quitosano a partir de la extracción de quitina de langostino (Pleuroncodes planipes) para la industria de alimentos*. Tesis de grado. Universidad de El Salvador. El Salvador.

Villamán, D. A. (2007). *Elaboración y caracterización de films comestibles basadas en mezclas entre proteínas de quínoa y quitosano*. Tesis de grado. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias de los Alimentos y Tecnología Química. Santiago, Chile. wee

ANEXOS

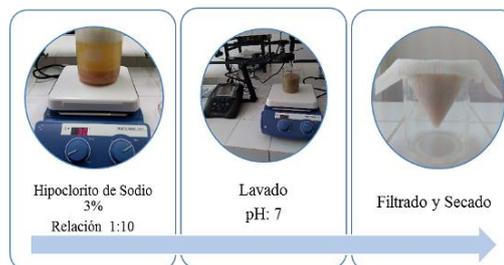
- ANEXO A : Obtención de quitosano y Aislado proteico de Cañihua
- ANEXO B : Obtención de Biopelícula
- ANEXO C : Pruebas de recubrimiento
- ANEXO D : Propiedades fisicoquímicas de conservación de fresa con recubrimiento
- ANEXO E : Certificado de análisis del Quitosano IR
- ANEXO F : Certificado de los resultados de análisis microbiológico.

ANEXO A

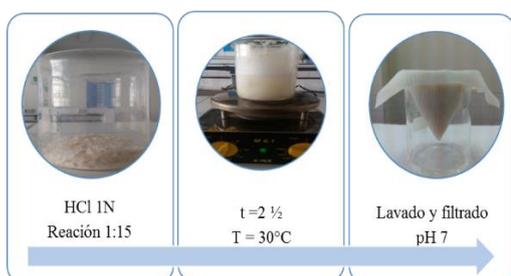
Obtención de quitosano y Aislado proteico



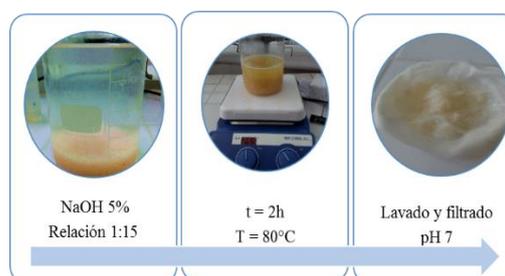
A1: Materia prima



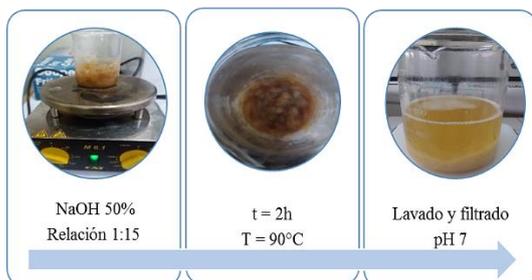
A2: Despigmentación



A3: Desmineralización



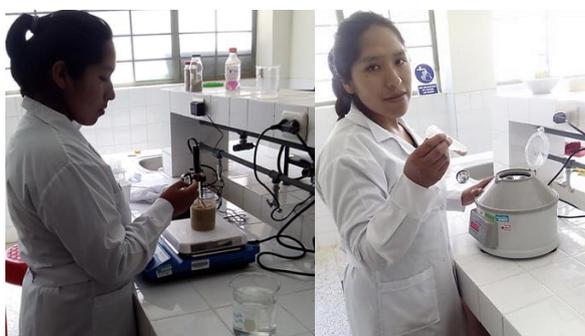
A4: Desproteínización



A5: Desacetilación



A6: Cañihua



A7: Aislado proteico



A8: Proteína de Cañihua

ANEXO B

Obtención de Biopelícula



B1: Preparación de solución



B2: Biopelícula

ANEXO C

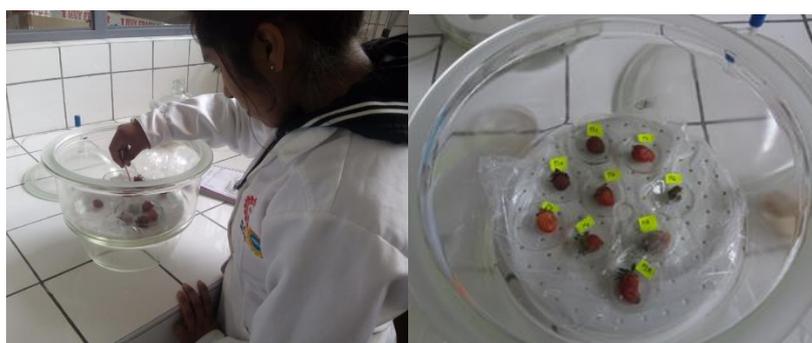
Pruebas de recubrimiento



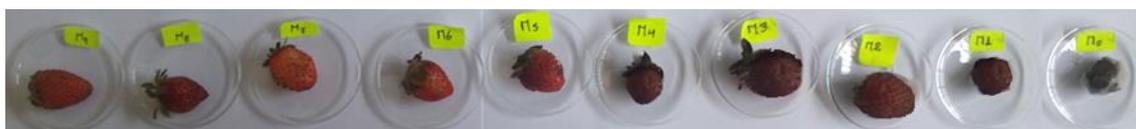
C1: Pesado de fresa



C2: Recubrimiento con solución Q + APC



C3: Refrigeración por días evaluadas



C4: Pruebas de recubrimiento a diferentes concentraciones.

ANEXO D

Propiedades fisicoquímicas de conservación de fresa con recubrimiento



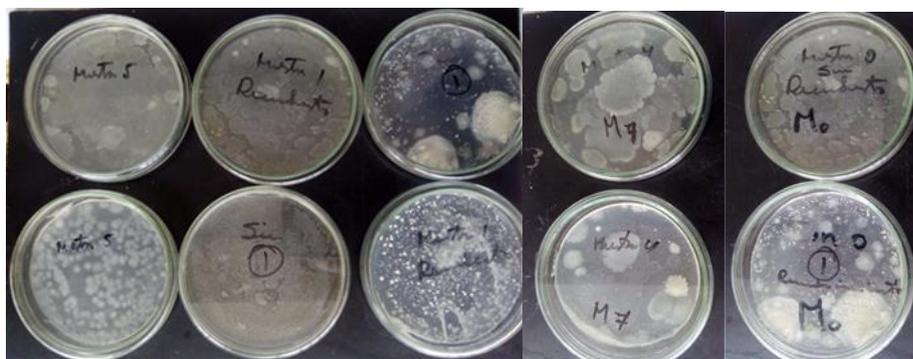
D1: Pesado de fresa inicial



D2: Pesado de fresa después de la prueba



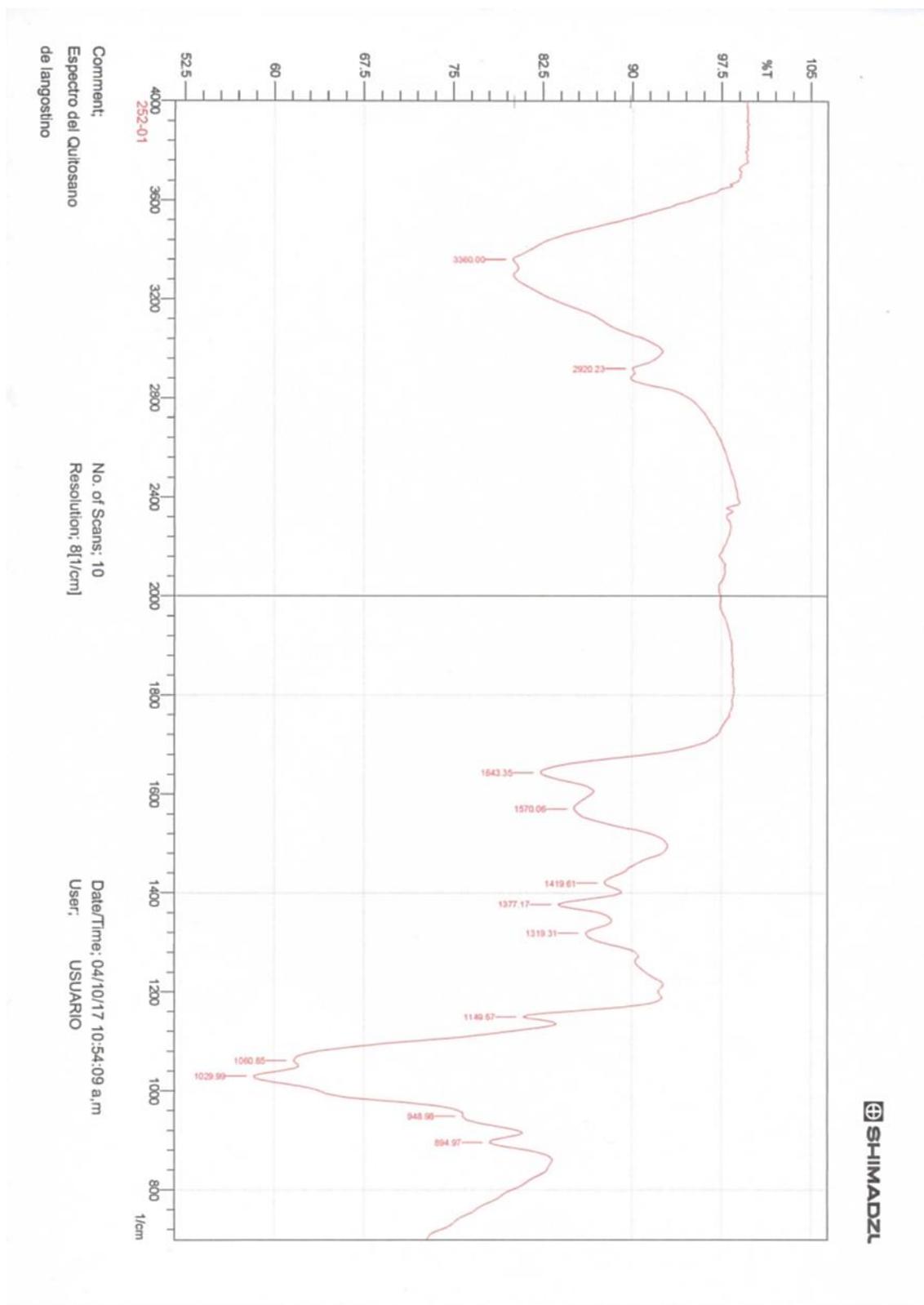
D3: Medición del pH



D4: Recuento de Bacterias mesófilos aerobios, mohos y levaduras

ANEXO E

Certificado de análisis del Quitosano IR



ANEXO F

Certificado de los resultados de análisis microbiológico



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

MUESTRA : Fresa
 PROCEDENCIA : Facultad de Ingeniería química
 INTERESADO : Lady Luz Yanapa Velasquez
 MOTIVO : Evaluación de calidad "Elaboración de biopelículas para envasado de alimentos a partir de quitosano y cañihua (*Chenopodium pallidicaule*)
 MUESTREO : 14 de junio del 2018
 ANÁLISIS : 14 de junio del 2018

Muestras	Recuento bacterias mesofilos aerobios	Mohos	Levaduras
M :Fresa	1717 UFC/g	30 UFC/g	506 UFC/g
M ₀ : Fresa sin recubrimiento	Indefinido	Indefinido	Indefinido
M ₁ : Fresa con recubrimiento (Q ₀ mas C)	830 UFC/g	Negativo	100 UFC/g
M ₂ : Fresa con recubrimiento (Q ₀ mas C)	780 UFC/g	Negativo	85 UFC/g
M ₃ : Fresa con recubrimiento (Q ₀ mas C)	620 UFC/g	Negativo	70 UFC/g
M ₄ : Fresa con recubrimiento (Q ₀ mas C)	500 UFC/g	Negativo	80 UFC/g
M ₅ : Fresa con recubrimiento (Q ₀ mas C)	460 UFC/g	Negativo	75 UFC/g
M ₆ : Fresa con recubrimiento (Q ₀ mas C)	390 UFC/g	Negativo	60 UFC/g
M ₇ : Fresa con recubrimiento (Q ₀ mas C)	450 UFC/g	Negativo	70 UFC/g
M ₈ : Fresa con recubrimiento (Q ₀ mas C)	360 UFC/g	Negativo	62 UFC/g
M ₉ : Fresa con recubrimiento (Q ₀ mas C)	326 UFC/g	Negativo	50 UFC/g

MÉTODO. Recuento Total de bacterias aerobias mesófilas en Agar recuento en placa, recuento de mohos en PDA y recuento de levaduras en PDA.

Observaciones: Las muestras fueron recepcionadas en el laboratorio

Puno, 22 de junio del 2018



Dr. Mg. MVZ Alberto Ccama Sullca
 Jefe del laboratorio de Microbiología FMVZ

NTS N° 071 - MINSA/DIGESA-V.01
NORMA SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO

Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10 ²	10 ³
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	----
XIV.2 Frutas y hortalizas frescas semiprocesadas (lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y/o precocidas) refrigeradas y/o congeladas.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Aerobios mesófilos	1	3	5	3	10 ⁴	10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10 ²
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	----
<i>Listeria monocytogenes</i> (*)	10	2	5	0	Ausencia /25 g	----
(*) Solo para frutas y hortalizas de tierra (a excepción de las precocidas)						
XIV.3 Frutas y hortalizas desecadas, deshidratadas o liofilizadas.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Mohos	2	3	5	2	10 ²	10 ³
Levaduras	2	3	5	2	10 ²	10 ³
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	5 x 10 ²
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	---
XIV.4 Frutas y hortalizas en vinagre, aceite o salmuera o fermentadas.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Levaduras	3	3	5	1	10 ⁵	10 ⁴
XIV.5 Frutos secos (dátiles, tamarindo, otros) y semillas (castañas, maní, pecanas, nuez, almendras, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Mohos	3	3	5	1	10 ²	10 ³
Levaduras	3	3	5	1	10 ²	10 ³
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10 ²
XIV.6 Mermelada, jaleas y similares.						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Mohos	3	3	5	1	10 ²	10 ³
Levaduras	3	3	5	1	10 ²	10 ³
XV. ALIMENTOS ELABORADOS						
XV.1. Alimentos preparados sin tratamiento térmico (ensaladas crudas, mayonesas, salsa de papa huancaína, ocopa, aderezos, postres, jugos, yogurt de fabricación casera, otros). Alimentos preparados que llevan ingredientes con y sin tratamiento térmico (ensaladas mixtas, palta rellena, sándwich, cebiche, postres, refrescos, otros).						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Limite por g ó mL	
					m	M
Aerobios mesófilos (*)	2	3	5	2	10 ⁵	10 ⁶
Coliformes	5	3	5	2	10 ²	10 ³
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10	10 ²
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10 ²
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	-----
(*) No procede para el caso de yogurt de fabricación casera.						

