

Producción y caracterización de películas inteligentes nanoestructuradas a partir del almidón de yuca, residuos del jambolán y aluminosilicatos por termocompresión

Yessica Alexandra Rodriguez Gaviria

Natalia Stefania Navarro Palencia

Trabajo de grado para optar al título de Ingeniera Química

Director

Germán Ayala Valencia

Dr. en Ciencias de la Ingeniería de Alimentos

Codirectores

Gustavo Emilio Ramírez Caballero

PhD. en Ingeniería Química

Cristiane Capello

MSc. en Ingeniería de Alimentos

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ingenierías Fisicoquímicas

Escuela de Ingeniería Química

Bucaramanga

2020

Agradecimientos

Al profesor y director del presente proyecto el Dr. Germán Ayala Valencia por la orientación, confianza, dedicación y paciencia durante nuestra pasantía de investigación.

Al profesor y Dr. Gustavo Emilio Ramírez Caballero nuestro codirector, por el apoyo y el voto de confianza.

A nuestra codirectora Mag. Cristiane Capello por su apoyo, disponibilidad, entrega y su gran contribución para la realización del presente trabajo.

A nuestro codirector de corazón Dr. Lenilton Santos Soares por su amabilidad, colaboración, disponibilidad, compañía y orientación.

A Jussara Garcez estudiante de iniciación científica por ser tan atenta, estar siempre dispuesta y colaborarnos tanto.

Al Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos de la Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) en Brasil y en especial a la coordinadora del programa de pregrado en Ingeniería Química, Débora de Oliveira por brindarnos la oportunidad de realizar nuestro proyecto de grado en este país.

A todo el personal del Laboratório Integrado de Engenharia Biológica (LiEB) y del Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI) por acogernos de la mejor manera en su país, ser de gran ayuda, enseñarnos tanto y poner a disposición todas las herramientas necesarias para culminar con éxito nuestra investigación.

A la Central de Análises Químicas del Departamento de Ingeniería Química y de Alimentos - UFSC, al Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (LINDEN) y al Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) por la colaboración y los servicios prestados.

A la Universidad Industrial de Santander y a la Escuela de Ingeniería Química por encaminarnos, formarnos como profesionales y darnos la oportunidad de ampliar nuestros conocimientos en la rama de la investigación en otro país.

Dedicatoria

A Dios por ser mi guía y apoyo incondicional, por fortalecer mi vida en momentos difíciles y ayudarme a superar cada obstáculo presentado en el transcurso de mi formación como profesional; por darme sabiduría, colmarme de grandes bendiciones, por la oportunidad que me dio de realizar mi proyecto de grado en el exterior y por rodearme siempre de personas increíbles.

A mi madre Nila Misbay Gaviria Pabón por ser de ejemplo e inspiración para alcanzar mis metas, por ese amor incondicional, por creer siempre en mí y ser un apoyo constante para que su hija se formara como ingeniera química.

A mi Padre Edwin Antonio Rodríguez Herreño, Hermanas Sara Yineth Rodríguez Gaviria y Daniela Rodríguez Gaviria por estar siempre ahí, por su amor, colaboración y ser de gran apoyo aún en la distancia.

A mis abuelos Jesús Antonio Rodríguez Sánchez, María Aida Herreño y María Dolores Pabón Gómez porque sin su apoyo y oraciones, no hubiera llegado tan lejos.

A cada uno de los familiares, amigos y compañeros que hicieron parte de este proceso, por la compañía, motivación, alegrías, experiencias vividas y su gran ayuda académica y espiritual; En especial a Natalia Navarro Palencia, por ser más que mi compañera de proyecto de grado, por convertirse en una gran amiga, por el apoyo y cada uno de los momentos vividos durante nuestra formación, por ser alegría y arriesgarse a vivir junto a mí la experiencia de un intercambio académico y pasantía en el país de Brasil.

Yessica Alexandra Rodríguez Gaviria.

Dedicatoria

Dedico este logro a mi familia, por su amor incondicional, y por su confianza, que me motiva a mejorar cada día no solo como profesional, sino como persona. A mi madre Tatiana, por ser mi ejemplo de lucha incansable, por ser mi compañera de vida y mi principal motivación. A mi padre Ernesto, por haber decidido serlo, y desde entonces, dedicarse a esta familia con amor y fraternidad. A mi hermano Nicolás, por haber llegado a iluminar mi vida, y por regalarme tantas sonrisas y recuerdos de infancia. A mi hermano Pipe por infundirme alegría y orgullo. A mis abuelos Cristina y Víctor, por enseñarme siempre el valor de la familia, por su amabilidad y por hacerme sentir amada en todo momento. A mi padre Rafael, que con sus palabras de aliento consigue impulsarme a ser cada día mejor y a luchar por mis sueños, le agradezco por su apoyo incondicional, por estar presente siempre a pesar de la distancia, y por enseñarme con su ejemplo que con valentía es posible superar cualquier circunstancia por más difícil que parezca.

Dedico también este triunfo a mis amigos, que se han convertido en mi segunda familia y que han llegado a darle a mi vida aún más color y felicidad. A Camila, Wendy y Alejandra, por ser el claro ejemplo de hermandad, por estar presentes desde que era una niña, y seguirme acompañando. A Dayana, Juli, Cindy, Laura, Paula, Clara, Silvia, George, Costa, y Germán, por su incondicionalidad, por sus consejos, por todas las experiencias vividas en esta etapa tan maravillosa llamada carrera universitaria, por hacer de los días de estudio siempre momentos agradables, por sus ocurrencias y por los millones de momentos maravillosos que han compartido junto a mí. A Silvia L, Pau, Ker y Juan, por aparecer en el mejor momento de mi vida y gozarse conmigo la grandiosa experiencia de vivir en otro país. A Alice, Ju y Mauricio por haberme acogido a pesar de no conocerme de tiempo atrás, por haberme enseñado su cultura, y haberme permitido dejar en sus corazones una huella. A mi compañera de proyecto, amiga incondicional y compañera de aventuras imborrables, Alexa, por su indispensable ayuda, y por arriesgarse desde un comienzo a vivir junto a mí la experiencia que nos unió aún más. A todos ellos, por demostrarme que, en tiempos de angustia, un amigo es un hermano.

Me siento verdaderamente afortunada por estar rodeada de personas tan grandiosas, sin su ayuda y apoyo, esto no hubiese sido posible.

Natalia Stefania Navarro Palencia

Tabla de Contenido

	Pág.
Introducción	13
1. Objetivos	18
1.1. Objetivo General	18
1.2. Objetivos Específicos.....	18
2. Descripción Metodológica	18
2.1. Primera Etapa: Pretratamiento y Producción del Polvo de Jambolán (PJ)	19
2.2. Segunda Etapa: Caracterización del PJ (Concentración Total de ACN Presentes)	20
2.2.1. Extracción Acidificada de ACN	20
2.2.2. Cuantificación de ACN Presentes.....	20
2.3. Tercera Etapa: Elaboración de los Filmes Colorimétricos Indicadores de pH	21
2.4. Cuarta Etapa: Evaluación de la Influencia de la Concentración de Polvo de Jambolán y Presencia de Laponita en las Características Físicoquímicas de las Películas.....	22
2.4.1. Análisis Colorimétrico	23
2.4.2. Humedad (%H) y Solubilidad (%S)	24
2.4.3. Espesor (e) y Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)	24
2.4.4. Ángulo de Contacto (AC)	25
2.4.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)	25

2.4.6. Difracción de Rayos X (DRX).....	26
2.4.7. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	26
2.4.8. Fotodegradación.....	26
2.5. Quinta Etapa: Test de Aplicación de las Películas Indicadoras Colorimétricas	27
2.6. Estadística	27
3. Análisis y Discusión de Resultados	28
3.1. Análisis Colorimétrico	28
3.1.1. Análisis Colorimétrico Inicial.....	28
3.1.2. Análisis Colorimétrico en Función del Cambio de pH.....	29
3.2. Humedad (%H) y Solubilidad (%S)	31
3.3. Espesor (e) y Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA).....	32
3.4. Ángulo de Contacto (AC)	33
3.5. Difracción de Rayos X (DRX).....	34
3.6. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	36
3.7. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	38
3.8. Fotodegradación.....	40
3.9. Características Principales de la Formulación Seleccionada F1.....	41
4. Test de Aplicación de las Películas Indicadoras Colorimétricas	42
5. Conclusiones.....	43
6. Recomendaciones	45

Referencias Bibliográficas	46
Apéndices.....	54

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Concentración de antocianinas monoméricas totales en el polvo de jambolán, para cada una de las extracciones.....	21
Tabla 2. Relación másica en % de cada uno de los componentes presentes en las formulaciones (C1, CF1, CF2, CF3, C2, F1, F2 y F3)	22
Tabla 3. Parámetros colorimétricos (L^* , a^* , b^* y ΔE^*) de las películas a diferentes concentraciones de polvo de jambolán, sin y con Laponita.	28
Tabla 4. Parámetros de color (L^* , a^* , b^* y ΔE^*) de películas indicadoras colorimétricas después de la inmersión en soluciones tampón con valores de pH entre 1,0 y 13,0.	30
Tabla 5. Porcentaje de humedad (%) y de solubilidad (%S) de las películas.	31
Tabla 6. Espesor (e) y Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas.	33
Tabla 7. Ángulo de contacto (AC) de las películas.	34

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Diagrama de la metodología desarrollada en la investigación	19
Figura 2. Aspecto visual de la película F1 (5% Lap, 5%PJ), después del contacto con las soluciones tampón a diferentes valores de pH.....	31
Figura 3. Espectros obtenidos por difracción de rayos X de las películas control, control con Laponita, y películas colorimétricas con Laponita y contenido de antocianinas.....	35
Figura 4. Espectros FTIR de las películas control, control con Laponita, y películas colorimétricas con Laponita y antocianinas.....	37
Figura 5. Micrografías de la sección transversal después de la crio fractura de las películas: (a) 0 % Lap, 0 % PJ. (b) 5 % Lap, 0 % PJ. (c) 5 % Lap, 5 % PJ. (d) 5 % Lap, 10 % PJ. (e) 5 % Lap, 15 % PJ.	38
Figura 6. Micrografías de la superficie de las películas: (a) 0 % Lap, 0 % PJ. (b) 5 % Lap, 0 % PJ. (c) 5 % Lap, 5 % PJ. (d) 5 % Lap, 10 % PJ. (e) 5 % Lap, 15 % PJ.....	39
Figura 7. Parámetros de color L*, a* y b* de las películas expuestos a luz a 4°C y 25°C: (a) F1, 5 % PJ y 5 % Lap. (b) F2, 10 % PJ y 5 % Lap. (c) F3, 15 % PJ y 5 % Lap.	40
Figura 8. Aplicación de la formulación F1 sobre carne de res a condiciones de almacenamiento real.....	43

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Determinación de la concentración de ACN presentes en el PJ obtenido, a partir del método de pH diferencial.....	54
Apéndice B. Evidencia Fotográfica de las Formulaciones Elaboradas	56
Apéndice C. Resultados de los Análisis de Varianza (ANOVA).	57

Resumen

Título: Producción y caracterización de películas inteligentes nanoestructuradas a partir del almidón de yuca, residuos del jambolán y aluminosilicatos por termocompresión*

Autores: Yessica Alexandra Rodriguez Gaviria, Natalia Stefania Navarro Palencia**

Palabras claves: Laponita, antocianinas, empaque inteligente, termocompresión, biopolímeros, indicador de frescura.

Descripción: Actualmente se encuentran empaques inteligentes para alimentos, que además de protegerlos tienen la capacidad de transmitir información a los consumidores sobre su estado y calidad. Hoy en día, pigmentos naturales como las antocianinas (ACN) son utilizados para su producción. Existen fuentes de ACN poco estudiadas como es el caso del fruto del árbol jambolán (*Syzygium cumini*), que se encuentra abundantemente en Brasil y que muchas veces es desperdiciado. En el presente trabajo se produjeron y caracterizaron películas inteligentes, que representan una porción del empaque completo, a base de almidón de yuca (*Manihot esculenta*) y ACN del fruto de jambolán, capaces de cambiar de color con alteraciones de pH; reforzadas con Laponita® (Lap), usada para estabilizar las ACN durante el proceso de producción de los filmes y su respectiva aplicación, ya que estos compuestos presentan cierta sensibilidad tanto a la luz como a las altas temperaturas. El polvo de jambolán con contenido de ACN (PJ) se obtuvo a partir de un proceso de liofilización de las cáscaras del fruto, seguido de un proceso de molienda. Las películas fueron elaboradas por la técnica de termocompresión, y sus principales propiedades físico-químicas fueron estudiadas, al realizar los siguientes análisis: colorimetría, humedad (%H), solubilidad (%S), espesor (e), permeabilidad al vapor de agua (PVA), Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR), Difracción de Rayos X (DRX), Microscopia Electrónica de Barrido (SEM), ángulo de contacto (AC), fotodegradación, además se realizó un test de aplicación de la película indicadora colorimétrica seleccionada. El análisis colorimétrico y la aplicación de los filmes como indicador de frescura de la carne de res, mostraron cambios de color visibles con la variación del pH, evidenciando su potencial como empaque indicador. La prueba de fotodegradación mostró que las películas no sufrieron alteraciones de color significativas, indicando su estabilidad al ser expuestas a la luz.

* Proyecto de grado.

** Facultad de Ingenierías Físicoquímicas. Escuela de Ingeniería Química. Director: Dr. Germán Ayala Valencia.

Abstract

Title: Development and characterization of nanostructured ph-indicator films based on cassava starch, jambolan (*syzygium cumini*) fruit residues and aluminosilicates by thermo-compression*

Authors: Yessica Alexandra Rodriguez Gaviria, Natalia Stefania Navarro Palencia**

Keywords: Laponite, anthocyanins, intelligent packaging, thermos-compression, biopolymers, freshness indicator.

Description: Nowadays there are intelligent packaging for food, which in addition to protecting them have the ability to transmit information to consumers about their condition and quality. Currently, natural pigments such as anthocyanins (ACN) are used for their production. There are little studied sources of ACN such as the fruit of the jambolan tree (*Syzygium cumini*), which is found abundantly in Brazil and is often wasted. In the present work, intelligent films were produced and characterized, representing a portion of the complete package, based on cassava starch (*Manihot esculenta*) and ACN from the jambolan fruit, capable of changing color with pH alterations; reinforced with Laponite® (Lap), used to stabilize ACN during the film production process and its respective application, because these compounds have a certain sensitivity to both light and high temperatures. Jambolan powder with ACN content (PJ) was obtained from a freeze-drying process of the fruit shells, followed by a grinding process. The films were elaborated by the thermo-compression technique, and in order to know their main physical-chemical properties, the following analyses were carried out: colorimetry, humidity (%H), solubility (%S), thickness (e), water vapor permeability (PVA), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (DRX), Scanning Electronic Microscopy (SEM), water contact angle (AC), photodegradation and, finally, an application test of the selected colorimetric indicator film was carried out. Colorimetric analysis and application of the films as an indicator of beef freshness showed visible color changes with pH variation, concluding that the films have potential as indicator packaging. The photodegradation test showed that the films did not suffer significant color alterations, indicating their stability when exposed to light.

* Degree Project.

** Physics-Chemistry Engineering Faculty. Chemical Engineering School. Advisor. Dr. Germán Ayala Valencia.

Introducción

Los polímeros a base del petróleo han sido hasta el momento los materiales más utilizados para la fabricación de películas en la industria de empaque de alimentos, gracias a sus buenas propiedades mecánicas, ópticas y de barrera (Huber y Embuscado, 2009), sin embargo, al ser estos materiales no biodegradables, generan grandes problemas medioambientales y ecológicos (Dilkes-Hoffman *et al.*, 2018). Es por esto que, en los últimos años se ha desarrollado una rama de investigación que busca reemplazar polímeros petroquímicos por materiales ambientalmente amigables, específicamente, polímeros a partir de fuentes naturales, siendo considerados los más prometedores para este propósito. En este contexto, el emergente concepto de desarrollo sustentable, ha mostrado que las películas biodegradables son una alternativa a los productos derivados del petróleo y adicionalmente, aumentan los ingresos del sector agrícola (Souza *et al.*, 2012).

De manera análoga, la industria de empaque de alimentos se enfrenta a otro desafío, debido a que los consumidores además de promover el uso de materiales amigables con el medio ambiente, buscan una mejora en la preservación de la calidad de sus productos. Si bien, el embalaje tradicional que separa los alimentos del entorno externo, cumple cuatro funciones básicas: protección, comunicación, conveniencia y contención, no le asegura al consumidor recibir el producto con las mismas propiedades con las cuales fue entregado justo después de su procesamiento. Las pruebas microbiológicas y químicas se realizan regularmente a nivel de empresa durante la producción y antes su entrega, sin embargo, dependiendo del producto, durante la cadena de suministro (distribución y almacenamiento) se producen distintos procesos biológicos, químicos o físicos, que finalmente pueden conducir a su deterioro (Ghaani *et al.*, 2016).

Por lo tanto, ante la creciente tendencia social que involucra la concientización por la salud y el medio ambiente, ha ocurrido un aumento en los requisitos para los empaques usados en la industria alimentaria. Nuevas tecnologías se están desarrollando como respuesta a las demandas de los consumidores, y a las tendencias dirigidas hacia la prolongación de la vida útil y calidad controlada del alimento; de lo anterior surge el concepto de empaque inteligente, que se define como un sistema capaz de monitorear en tiempo real las condiciones del producto, compartiendo información con el cliente acerca de la calidad del mismo, debido a la interacción entre el alimento y el material inteligente (Merz *et al.*, 2020). Este tipo de material es elaborado a partir de compuestos proyectados para detectar cambios en el pH, alteraciones de temperatura en el medio externo, e inclusive modificaciones en la concentración de gases en el espacio libre entre el envase y el alimento (Ghaani *et al.*, 2016). Este tipo de factores son difícilmente perceptibles, por lo que se hace necesaria la utilización de algún indicador. Este es el caso de la carne de res, alimento altamente perecedero debido a sus reacciones enzimáticas y a la contaminación microbiana que se produce dentro del mismo, a causa de fallas en la cadena de refrigeración. Por tal motivo, entidades como el Laboratorio Nacional de Referencia Animal – LANARA, implementa normas que controlan el consumo de dicho alimento según el rango de pH en el que se encuentra, considerándola adecuada para su consumo cuando presenta valores de pH entre 5,8 y 6,2, por el contrario, valores por encima de 6,4 representan la etapa inicial de descomposición (Métodos Analíticos Oficiais Para Controle de Produtos de Origem Animal e Seus Ingredientes, 2018).

Uno de los tipos de biopolímeros provenientes del sector agrícola más estudiados para la producción de dichos empaques son los polisacáridos, entre ellos se encuentra el almidón, que ha sido considerado uno de los candidatos más prometedores debido a su gran disponibilidad, precio relativamente bajo y comportamiento termoplástico (Chivrac *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2012). Un ejemplo es el almidón extraído a partir de la raíz de yuca, el cual se muestra como una

alternativa atractiva al ser altamente tolerante a las condiciones climáticas adversas; debido a su plantación y flexibilidad de cosecha, está disponible durante todo el año, representando seguridad alimentaria y asegurando su uso en varias aplicaciones (Bergo *et al.*, 2012), además de esto, las películas desarrolladas a partir de almidón de yuca se describen como isotrópicas, inodoras, insípidas, incoloras, no tóxicas y biológicamente degradables (Flores *et al.*, 2007). El segundo componente principal de una película a base de almidón es el plastificante, que se utiliza para superar la fragilidad de la película causada por las altas fuerzas intermoleculares. Los agentes plastificantes comúnmente utilizados para la producción de almidón termoplástico incluyen agua y glicerol (Flores *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2007), que a su vez presentan grupos hidroxilo responsables de las interacciones inter e intramoleculares en las cadenas poliméricas, permitiendo una estructura más flexible y ajustándolas al proceso de producción del empaque (Souza *et al.*, 2012).

Según Piñeros *et al.* (2017), cuando se genera un proceso de deterioro en el alimento un cambio en el pH puede ser detectado, debido a esto, indicadores colorimétricos como las Antocianinas (ACN), obtenidas a partir de fuentes naturales, pueden ser incorporados al material de empaque, o película polimérica, para detectar y monitorear cambios en las condiciones de calidad de los productos envasados mediante la variación visual de color (Maciel *et al.*, 2012). Las ACN son compuestos solubles en agua, pertenecientes a la familia de los flavonoides, con estructura de ion flavílico (2-fenilbenzopirilio), con sustituyentes hidroxilo y metoxila variables, que consisten en dos anillos aromáticos y un anillo heterocíclico (Sui *et al.*, 2018), responsables de la coloración azul, violeta y rojo de las frutas, verduras, flores y raíces de algunas plantas (Cortez *et al.*, 2017). Uno de los factores que influencia su baja estabilidad es el cambio de pH, debido a que su estructura es de naturaleza iónica (Khoo *et al.*, 2017).

Actualmente, más de 100 ACN son conocidas, sin embargo, una de las encontradas con mayor abundancia y que presenta beneficios en la tecnología de alimentos es la Ciadina, normalmente presente en la cereza, uva y jambolán. Este último es un fruto producido en gran parte del territorio brasileño, que por su sabor es poco consumido y muchas veces desperdiciado (Barcia, 2009). con el fin de aprovechar este residuo, diferentes investigaciones han sido realizadas; Do Carmo Brito *et al.* (2017) validaron el cambio de color de los extractos de ACN obtenidos a partir del fruto, frente a la mudanza de pH, concluyendo que bajo distintos valores de pH la estabilidad de las ACN se altera, permitiendo una percepción evidente de los cambios en la coloración del extracto.

Una de las técnicas más utilizadas para la elaboración de filmes biodegradables es el Casting, donde se vierte la solución filmogénica en una placa de superficie lisa hasta que el material se solidifica para formar la película (Bukzem *et al.*, 2012), no obstante, presenta desventajas como problemas al momento de retirar el material seco de la placa, y la más importante, dificultad de implementación a escala industrial, puesto que la etapa de secado de la solución es de aproximadamente 48 h (Mali *et al.*, 2010). Por este motivo otros métodos han sido estudiados, como por ejemplo la termocompresión; Andretta *et al.* (2018) desarrollaron películas indicadoras de pH a base de almidón de yuca, con y sin residuo de arándano como indicador de cambio de pH, a partir de dicha técnica; se obtuvieron resultados positivos en cuanto a las características superficiales y de barrera, y se evidenció que es posible obtener cada filme en un tiempo aproximado de 2 min, donde la mezcla es sometida a la aplicación de presión y calor para gelatinizar el material, fundirlo y secarlo. Este método es frecuentemente utilizado en la industria de polímeros, debido a que es un proceso simple, amigable y de bajo costo (Valencia y do Amaral, 2018).

Sin embargo, estudios han demostrado que las ACN son degradadas cuando se someten a altas temperaturas durante el proceso de termocompresión (Rodríguez-Amaya, 2016; Valencia y do Amaral, 2018). Como solución a este problema, se han desarrollado alternativas que involucran la interacción entre ACN y nanoarcillas, en pro de aumentar la estabilidad de las mismas (Ribeiro *et al.*, 2018). La Laponita (Lap) o silicato de sodio, litio y magnesio hidratado ($\text{Na}^{+0.7} [(\text{Si}_8 \text{Mg}_{5.5} \text{Li}_{0.3}) \text{O}_{20} (\text{OH})_4]^{-0.7}$), es un tipo de nanoarcilla sintética utilizado comúnmente en la fabricación de películas poliméricas, con partículas en forma de disco con un espesor de 1 nm y un diámetro de aproximadamente 25 nm (Nicolai y Cocard, 2000; Ribeiro *et al.*, 2018). Dicha nanoarcilla ha sido utilizada en varias investigaciones, con el fin de mejorar las propiedades físico-químicas de empaques de alimentos producidos a partir de biopolímeros (López-Angulo *et al.*, 2020; Olivera *et al.*, 2019; Perotti *et al.*, 2014; Valencia *et al.*, 2016, 2018, 2019).

Atendiendo a lo anteriormente expuesto, y en vista de que hasta el momento no se ha estudiado el uso de la Laponita para estabilizar las antocianinas durante el proceso de termocompresión, fue de vital importancia preguntarse, ¿cuáles son las características físico-químicas, ópticas y de barrera de las películas desarrolladas como posibles materiales indicadores de cambio de pH? y ¿cuál es el efecto de la Laponita en la estabilización de las antocianinas presentes en las películas colorimétricas?; por esto, el presente proyecto buscó desarrollar y caracterizar películas inteligentes, a partir de almidón de yuca, reforzadas con nanopartículas de Laponita, usando como fuente de antocianinas el jambolán, sustancia indicadora de cambio de pH del alimento envasado, mediante la técnica de termo-compresión, contribuyendo a una futura implantación de esta nueva tecnología a nivel industrial.

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Desarrollar y caracterizar películas biodegradables, indicadoras de cambio de pH, por termocompresión a base de almidón de yuca, reforzadas con nanopartículas de Laponita, incorporando antocianinas obtenidas del jambolán.

1.2. Objetivos Específicos

Optimizar la relación másica entre polímero/arcilla y antocianinas, además de las variables del proceso de termocompresión de las películas.

Evaluar las principales propiedades físicas y químicas de las películas.

Analizar el efecto de la Laponita sobre la estabilidad de las antocianinas en las películas indicadoras de pH.

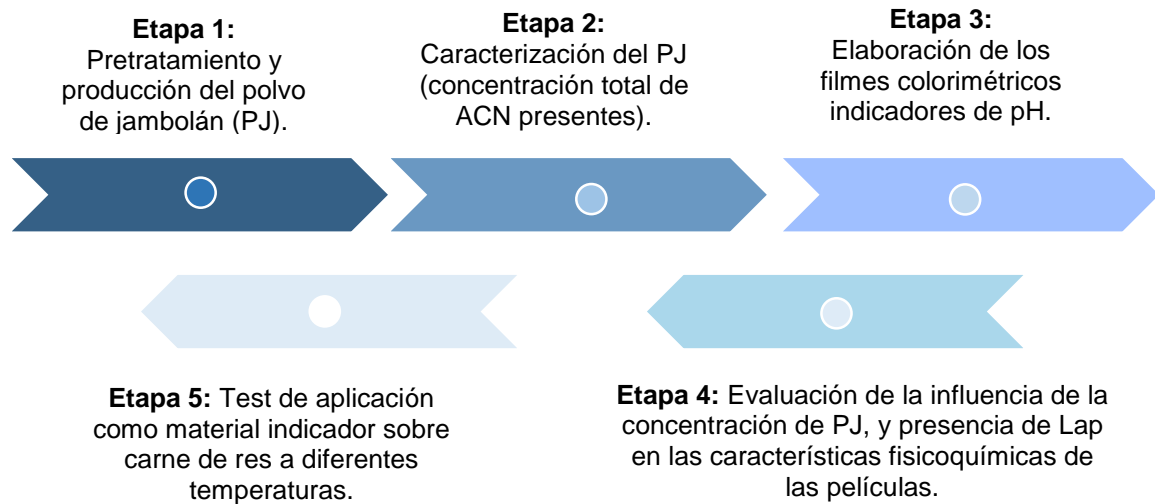
Estudiar el desempeño de las películas inteligentes como indicadores de frescura de alimentos, mediante un test de aplicación en carne de res a distintas temperaturas.

2. Descripción Metodológica

Este proyecto se desarrolló en el Laboratorio de Ingeniería Biológica (LiEB), Universidad Federal de Santa Catarina- Florianópolis, Brasil; mediante la modalidad de pasantía de investigación, en un periodo de tiempo comprendido entre agosto y diciembre del año 2019, a partir de la ejecución de las 5 etapas metodológicas presentadas en la Figura 1.

Figura 1.

Diagrama de la metodología desarrollada en la investigación



2.1.Primer Etapa: Pretratamiento y Producción del Polvo de Jambolán (PJ)

El jambolán, fruto usado como fuente de ACN, fue recolectado del campus de la Universidad Federal de Santa Catarina- Florianópolis, Brasil. Posterior a la colecta, el fruto fue lavado con agua destilada y secado en una estufa con circulación forzada de aire (EL- 1.1, Odontobrás, Brasil) a 20 °C durante 4 h. Después, fueron retiradas manualmente las semillas del resto del fruto, la cascara y la pulpa se congelaron en un ultrafreezer (CL 200-86V, Brasil) a -18 °C. Posteriormente, se secaron en el Liofilizador (Liotop, L101, Brasil) durante 48 h, con condiciones de -55 °C en el condensador, a una presión igual a 53 µHg, y temperatura final de 25 °C. Por último, pasaron por un proceso de molienda, en un molino de cuchillas de acero inoxidable (Tecnal TE- 631/2, Brasil). El polvo obtenido, con $17,40 \pm 0,85$ % de humedad inicial (en base húmeda), fue almacenado en un frasco de plástico oscuro, para asegurar un ambiente en ausencia de luz, en un refrigerador doméstico a 4 °C hasta su respectivo uso y análisis (Merz *et al.*, 2020).

2.2.Segunda Etapa: Caracterización del PJ (Concentración Total de ACN Presentes)

2.2.1.Extracción Acidificada de ACN

La extracción de ACN se llevó a cabo según la metodología propuesta por Capello *et al.* (2019). Ácido clorhídrico al 37 % (base húmeda) se usó como solvente en una proporción agua-ácido 100:2,7 (v/v). Se añadieron 0,25 g de PJ en 100 ml de agua acidificada en un Erlenmeyer y la mezcla se mantuvo bajo agitación continua (100 rpm) en un Shaker (TE-424, Tecnal, Brasil), en ausencia de luz, a 35 °C por 80 minutos. El extracto obtenido se filtró para eliminar los sólidos suspendidos (PJ), los cuales se sometieron por segunda vez al proceso de extracción bajo las condiciones explicadas anteriormente.

2.2.2.Cuantificación de ACN Presentes

La concentración total de ACN en el extracto (mg/L), fue determinada por el método de pH diferencial, propuesto por Giusti y Wrosltad (2001). Donde se realizó un ensayo de absorbancia (a 522 nm y 699 nm), en un espectrofotómetro UV-vis (U-2900, Hitachi). El procedimiento utilizado se especifica a detalle en el Apéndice A.

A partir de los resultados presentados en la Tabla 1, es posible confirmar la validez de los mismos, al comparar los valores con los obtenidos por Merz (2019), quien al utilizar 0,34 g de PJ durante 80 minutos de extracción, obtuvo una concentración de ACN totales igual a $1262,44 \pm 240,88$ mg/100g de PJ. Anteriormente, Capello *et al.* (2019) usaron como materia prima cascara de berenjena y obtuvieron concentraciones de ACN de $64,28 \pm 17,49$ mg/100 g de cascara seca, lo que valida el beneficio del uso del jambolán como fuente rica de ACN.

Tabla 1.

Concentración de antocianinas monoméricas totales en el polvo de jambolán, para cada una de las extracciones.

PJ liofilizado (g)	Extracción	Concentración de ACN monoméricas totales (mg/L)	Concentración de ACN monoméricas totales (mg/100 g de PJ)
0,25	Primera	21,95 ± 0,83	878,17 ± 33,43
	Segunda	3,09 ± 0,09	123,43 ± 3,50

2.3. Tercera Etapa: Elaboración de los Filmes Colorimétricos Indicadores de pH

Todas las formulaciones fueron elaboradas a base de almidón de yuca, adquirido de Juréia Food Industry (Santa Catarina- Brasil), glicerol P.A (Neón, Brasil) usado como plastificante, y agua destilada; con modificaciones en la concentración de Lap (S-482, BYC, Alemania) y PJ obtenido como se describió en la segunda etapa (sección 2.2).

La matriz base con la cual se elaboraron todas las formulaciones descritas en la Tabla 2, fue la siguiente: 2,625 g de almidón de yuca, y 0,788 g tanto de glicerol como de agua destilada (30% en base a la masa de almidón) (Andretta *et al.*, 2019). En dichas formulaciones se varió el contenido de Lap y de PJ, con el objetivo de estudiar el efecto tanto de la presencia de la nanopartícula como de la concentración del PJ rico en ACN, en las propiedades fisicoquímicas de los filmes resultantes. A continuación, se presenta detalladamente la composición de cada una de las formulaciones planteadas en este trabajo, en función de la masa de almidón utilizada, de las cuales CF1, CF2 y CF3 fueron usadas únicamente en el análisis colorimétrico inicial (Sección 3.1.1).

Tabla 2.

Relación másica en % de cada uno de los componentes presentes en las formulaciones (C1, CF1, CF2, CF3, C2, F1, F2 y F3)

<i>Componentes de la matriz</i>	Relación másica (g componente/g almidón) en (%)							
	<i>Masa Almidón= 2,625 g</i>							
	C1	CF1	CF2	CF3	C2	F1	F2	F3
<i>Agua destilada</i>	30	30	30	30	30	30	30	30
<i>Glicerol</i>	30	0	30	30	30	30	30	30
<i>Lap</i>	0	0	0	0	5	5	5	5
<i>PJ</i>	0	5	10	15	0	5	10	15

Cada una de ellas fue preparada por separado en placas de Petri, y acondicionadas en un desecador con una solución saturada de NaBr (HR= 58 %) a 25 °C durante 48 h, con el fin de hidratar el almidón y alcanzar una humedad homogénea en cada punto de la mezcla. Pasado el periodo de acondicionamiento controlado, cada mezcla fue tamizada y colocada entre dos láminas de Mylar (15 cm x 20 cm). Por último, dichas láminas se colocaron entre las dos placas calientes de la termoprensa hidráulica (PHS 15t, Ico Comercial, Brasil), manipuladas por controladores PID, para mantener la temperatura a 130 °C, durante los 2 minutos en que se aplicaba una presión al material de 3,5 MPa (Andretta *et al.*, 2019).

2.4.Cuarta Etapa: Evaluación de la Influencia de la Concentración de Polvo de Jambolán y Presencia de Laponita en las Características Físicoquímicas de las Películas

Las diferentes caracterizaciones fueron realizadas después de 7 días de acondicionamiento de las películas en desecadores con humedad relativa controlada de aproximadamente 58 %, usando una solución saturada de NaBr, a 25 °C.

2.4.1. Análisis Colorimétrico

El análisis de color se llevó a cabo siguiendo la metodología adaptada de Cárdenas *et al.* (2017). En primer lugar, las películas fueron colocadas en una cámara con fondo blanco e iluminación homogénea, y las imágenes fueron obtenidas a partir de una cámara de alta resolución (Nikon AF-S DX Nikkor 18-55 mm 1: 3.5–5.6G VR II, 0.28 m / 0.92 ft. Ø 52), configurada en modo manual. Se analizaron los registros con ayuda del software ImageJ v.39, con el complemento Color Space Converter, que transforma los pixeles de la imagen RGB en coordenadas de la escala CIELab, donde cada color es descrito por tres componentes: L*- Índice de Luminosidad (0 representa el negro y 100 la máxima intensidad de luz soportada por el ojo humano), a*- tonalidades entre rojo (+) y verde (-) y b*- tonalidades entre amarillo (+) y azul (-). La diferencia de color (ΔE^*) se calculó mediante la Ecuación 1 (Merz *et al.*, 2020).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L_f^* - \Delta L_0^*)^2 + (\Delta a_f^* - \Delta a_0^*)^2 + (\Delta b_f^* - \Delta b_0^*)^2} \quad (1)$$

Donde cada delta (Δ) se obtiene a partir de la diferencia entre el parámetro (L^*, a^*, b^*) del filme menos el mismo parámetro del fondo de la imagen. De esta forma, fue realizado el análisis colorimétrico Inicial, donde se comparó: los filmes que contenían Lap (parámetros finales Δ_f), con las películas control, es decir, sin presencia de nanopartícula en su matriz (Δ_0). Así mismo, el cambio en la coloración de las películas sometidas a diferentes soluciones tampón, en el análisis colorimétrico en función de los cambios de pH, se determinó según el método y la configuración discutidos anteriormente, con la diferencia de que la variable ΔE^* se calculó en función de los parámetros de la película en contacto con la solución buffer (Δ_f), y de los parámetros del filme colorido original (Δ_0).

2.4.2. *Humedad (%H) y Solubilidad (%S)*

La humedad (%H) de las películas fue determinada con el método descrito por la “Association of Official Analytical Chemists”, (AOAC) 2000, utilizando para ello una estufa (EL-1.1, Odontobrás, Brasil) a una temperatura de 105 °C. Se registró la masa de cada una de las muestras en el tiempo 0 h, (m_i), y en el tiempo 24 h (m_f). Siendo así, %H se calculó según lo indica la Ecuación 2 (Valencia *et al.*, 2019).

$$\text{Humedad (\%)} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (2)$$

Para la determinación de la solubilidad (%S), las muestras fueron sumergidas por separado en 50 ml de agua destilada, y sometidas a agitación continua (100 rpm) en un Shaker (TE-424, Tecnal, Brasil), a 20 °C por 24 h. Posterior a esto, los discos fueron removidos del agua destilada y colocados en una estufa a 105 °C durante 24 h, para su respectivo secado, obteniendo así la masa seca final ($m_{f,s}$). La masa seca inicial ($m_{i,s}$) se calculó en función del %H. El porcentaje de materia soluble (%S) fue calculado usando la Ecuación 3 (Valencia *et al.*, 2016).

$$\text{Solubilidad (\%)} = \left(\frac{m_{i,s} - m_{f,s}}{m_{i,s}} \right) \times 100 \quad (3)$$

2.4.3. *Espesor (e) y Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)*

El espesor (mm) de cada formulación, se determinó usando un micrómetro digital (0,01 mm; Mitutoyo, Brasil), y se calculó como el promedio de 10 medidas tomadas en puntos aleatorios de diferentes posiciones para cada película (Valencia *et al.*, 2019).

Por otra parte, La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas fue calculada de acuerdo con el protocolo ASTM E96. Dos muestras circulares de cada formulación de aproximadamente 6,5 cm de diámetro se fijaron sobre células de aluminio que contenían 30 g sílice

gel (0% Hr) y se colocaron en un desecador con agua destilada (100% Hr, Presión de vapor = 3,1691 KPa). La ganancia de peso en las celdas de permeabilidad fue registrada en intervalos de 24 horas hasta el día 4 y se volvió a registrar el día 7. PVA se calculó según la Ecuación 4 (Valencia *et al.*, 2016).

$$PVA = \frac{dm}{dt} \left(\frac{e}{A \times \Delta P} \right) \quad (4)$$

En donde dm/dt es la tasa de cambio de masa de agua con el tiempo (g/h), A es el área de permeación ($3,12 \times 10^{-03} \text{ m}^2$), e el espesor de la película (mm) y ΔP es la diferencia de presión de vapor entre las superficies del filme (3,1691 KPa), (Valencia *et al.*, 2016).

2.4.4. Ángulo de Contacto (AC)

El grado de hidrofobicidad de las películas se evaluó por medio de la medición del ángulo de contacto ($^\circ$), empleando el tensiómetro óptico (Ramé-Hart 250), según la norma ASTM D7490 (Valencia *et al.*, 2018). Las muestras se fijaron en el equipo y con ayuda de una jeringa de precisión automática se liberó una gota de agua destilada (4 μL) sobre la superficie de cada filme. Usando el software DROPimage Advanced incorporado en el equipo, se analizó el ángulo formado entre la superficie del material y la tangente a la gota; las mediciones fueron obtenidas una vez la gota tocó la superficie del material, cada segundo durante los 10 primeros segundos. Los valores adoptados para comparar los resultados entre las formulaciones se tomaron en el tiempo $t=6$ segundos.

2.4.5. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Con el fin de identificar la presencia de grupos funcionales y sus interacciones químicas en el material, se realizó un análisis FTIR, usando un espectrómetro de infrarrojo (FTIR, Cary 600, Agilent, US). Los espectros fueron recolectados usando pellets de KBr, en el rango espectral de

4000 a $649,8853\text{ cm}^{-1}$, a una resolución de 4 cm^{-1} , a 25 °C . Las muestras sometidas al análisis tenían geometría cuadrada de $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ (Capello *et al.*, 2019).

2.4.6. Difracción de Rayos X (DRX)

El análisis DRX se realizó con el objetivo de conocer el estado de cristalinidad de cada formulación, al determinar el espectro de rayos X de cada material. Para ello, se utilizó un difractómetro de rayos X (Rigaku MiniFlex 600, Japón), que operaba a una tensión de 40 kV, y corriente de 15 mA, usando una radiación Cu-K α ($\lambda = 1,5405\text{ \AA}$). Muestras de $3\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ fueron colocadas en marcos de aluminio, y el espectro fue obtenido a 20 °C . El ángulo incidente fue 2θ para un rango de ángulos entre 2° y 90° , con una velocidad de barrido de $20^\circ/\text{min}$ (Valencia *et al.*, 2016). El espacio interplanar se determinó a partir de la ley de Bragg.

2.4.7. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de la superficie y del interior de las películas fue analizada usando el microscopio electrónico de barrido (SEM, JSM-6390LV, JEOL, Japón) a un voltaje de aceleración de 5 kV. Antes del análisis, las muestras fueron fijadas en aluminio con trozos de cinta de carbón y luego recubiertos con una fina capa de oro. Se tomaron en puntos de muestra aleatorios tres micrografías para la superficie de cada película de 50 x, 100 x y 500 x y tres para la sección transversal de 100 x, 200 x y 500 x (Valencia *et al.*, 2018).

2.4.8. Fotodegradación

Para analizar la fotodegradación que sufren las ACN durante el almacenamiento, se acondicionaron dos muestras de cada formulación a dos temperaturas diferentes: 4 °C y 25 °C ,

colocadas a una distancia de 30 cm de una lámpara LED (25 W halogen lamp, white color, Kian CFL Reta, China). Cada 24 h se tomaron fotografías usando una cámara profesional (Nikon D5500) durante 7 días. El análisis de los parámetros colorimétricos se realizó utilizando el método y la configuración descritos en la sección 2.4.1 (Kohno *et al.*, 2009; Merz *et al.*, 2020).

2.5. Quinta Etapa: Test de Aplicación de las Películas Indicadoras Colorimétricas

Con el objetivo de simular la aplicación de las películas como indicador de frescura en alimentos, en condiciones de almacenamiento real, fue escogida la formulación que contiene 5% de PJ y 5% de Lap (F1). Trozos de carne de res se colocaron dentro de placas de Petri selladas con sus tapas, que en su superficie interior contenían una porción de película indicadora fija. Las muestras fueron acondicionadas a tres temperaturas diferentes, -20°C, 4°C y 30°C (Liu *et al.*, 2019; Merz *et al.*, 2020). Durante los días 1, 2, 3, 4 y 7, se monitoreo el cambio de color visual, y se realizó una lectura del pH de cada pieza de carne en tres posiciones diferentes, usando un pH-metro digital para semisólidos (Testo-205, Brasil).

2.6. Estadística.

Todos los análisis fueron realizados por lo menos en duplicado para cada formulación y los resultados fueron expresados como el valor promedio \pm desviación estándar. Análisis de varianza (ANOVA), detallados en el Apéndice C, y prueba de Tukey con comparaciones múltiples, (resultados presentados a modo de superíndices en los valores de las tablas), fueron realizadas con un nivel de significancia de 5 %, utilizando para ello el software SAS University Edition, versión 6.0.16, SAS®.

3. Análisis y Discusión de Resultados

3.1. Análisis Colorimétrico

3.1.1. Análisis Colorimétrico Inicial

Con el fin de validar la influencia de la arcilla Laponita en la pigmentación de las películas coloridas, se realizó el análisis de color mencionado en la sección 2.4.1, para los filmes sin y con adición de nanopartícula, a diferentes concentraciones de PJ.

Tabla 3.

Parámetros colorimétricos (L^ , a^* , b^* y ΔE^*) de las películas a diferentes concentraciones de polvo de jambolán, sin y con Laponita.*

Concentración de Lap	0,0%			5,0%			
Concentración de PJ	ΔL_0	Δa_0	Δb_0	ΔL_f	Δa_f	Δb_f	ΔE^*
0,0%	0,38 $\pm 0,17$	0,01 $\pm 0,03$	1,99 $\pm 0,25$	-1,46 $\pm 0,04$	0,14 $\pm 0,01$	4,19 $\pm 0,19$	2,87 $\pm 0,17^A$
5,0%	-18,76 $\pm 0,81$	9,35 $\pm 0,39$	5,75 $\pm 0,83$	-26,69 $\pm 2,87$	11,28 $\pm 0,61$	4,78 $\pm 0,44$	8,24 $\pm 2,87^B$
10,0%	-26,10 $\pm 2,26$	15,27 $\pm 1,27$	5,70 $\pm 0,82$	-40,86 $\pm 0,50$	20,87 $\pm 0,46$	5,10 $\pm 0,43$	15,81 $\pm 0,46^C$
15,0%	-36,33 $\pm 1,90$	20,51 $\pm 0,54$	6,98 $\pm 0,37$	-50,01 $\pm 1,25$	19,67 $\pm 1,08$	8,09 $\pm 0,56$	13,78 $\pm 1,66^C$

Según los datos obtenidos en la Tabla 3, se verificó que los parámetros colorimétricos se vieron afectados tanto por el aumento la concentración de PJ, como por la adición de Lap. Las películas control (C1 y C2), mostraron un color grisáceo con baja transparencia (b^* positivo y a^* cercano al 0). Con la adición de PJ, Δa^* aumentó y ΔL^* disminuyó, indicando el enrojecimiento de las películas gracias a la adición de ACN, dejándolas a su vez más oscuras. Por otra parte, las

películas que contienen Lap muestran tonalidades más rojas, Δa^* mayores. Además, es posible notar que la adición de la nanopartícula genera valores de ΔE^* mayores a 3,5 en los filmes con contenido de PJ, lo que sugiere que las diferencias colorimétricas entre las formulaciones con Lap y sin ella, pueden ser detectadas por el ojo humano (Mokrzycki & Tatol, 2011). Esto quiere decir que, en general, al comparar las películas con y sin contenido de Lap, se concluye que el uso de Lap ayudó a preservar el color de las películas con contenido de ACN con mayor intensidad durante el proceso de termocompresión. La evidencia fotográfica de las ocho formulaciones se encuentra en el Apéndice B, Figura B1.

3.1.2. Análisis Colorimétrico en Función del Cambio de pH

Para determinar la dependencia del cambio de color de la película en función del pH, se gotearon diferentes soluciones tampón (pH entre 1 y 13) en la superficie del material. La respuesta de los parámetros colorimétricos de las películas a diferentes concentraciones de PJ (Tabla 4), evidencia que la Luminosidad (L^*) no se vio afectada por el cambio de pH en el medio, no obstante, la disminución de los valores de a^* , muestra una tendencia de cambio de color de rojo a verde. De manera análoga, los valores de b^* presentaron un cambio muy ligero hasta el pH 11, y un aumento significativo para pH 12 y 13, evidenciando la presencia de tonalidades amarillas en el filme.

Según Mokrzycki y Tatol (2011), el ojo humano puede detectar diferencias de color cuando $\Delta E^* > 3.5$, en este caso, todas las muestras presentaron valores superiores, al ser comparadas con las películas colorimétricas iniciales, es decir, diferencias de color visualmente perceptibles en el rango de pH de 1 a 13. De acuerdo con lo anterior, al ser sensibles en un amplio rango de pH, podrían ser usadas como filmes indicadores de cambio de pH en la industria de empaque de alimentos. Sin embargo, para el alcance de la presente investigación, fue escogida la formulación F1 (5 % - PJ), para monitorear la frescura de la carne en el test de aplicación, ya que presenta un

número mayor de diferencias significativas entre sus muestras sometidas a distinto pH, que el resto de las formulaciones, lo que sugiere que esta formulación es más sensible a los cambios de pH.

Del mismo modo, en la Figura 2, se observa cualitativamente el cambio de color del material bajo el contacto con las soluciones buffer, permitiendo asociar dicho cambio a una alteración en la estructura molecular de la antocianina. El rojo típico de esta se presenta a condiciones de pH de 1 a 3, gracias a la presencia del catión flavylium, en el estudio F1, F2 y F3 mostraron tonalidades rojas (a^* positivos). Cuando los valores de pH aumentan de 3 a 6, los filmes cambian de color y se tornan más purpura, debido a la desprotonación del catión flavylium. Para valores de pH entre 7 y 12, se percibió un cambio de color gradual de purpura a verde, y finalmente, a pH 13 se presentó una tonalidad amarilla, que indica la degradación de la antocianina y la formación del compuesto básico Chalcona (Capello *et al.*, 2019; Khoo *et al.*, 2017). La evidencia fotográfica de las tres formulaciones en contacto con soluciones buffer se encuentra en el Apéndice B, Figura B2.

Tabla 4.

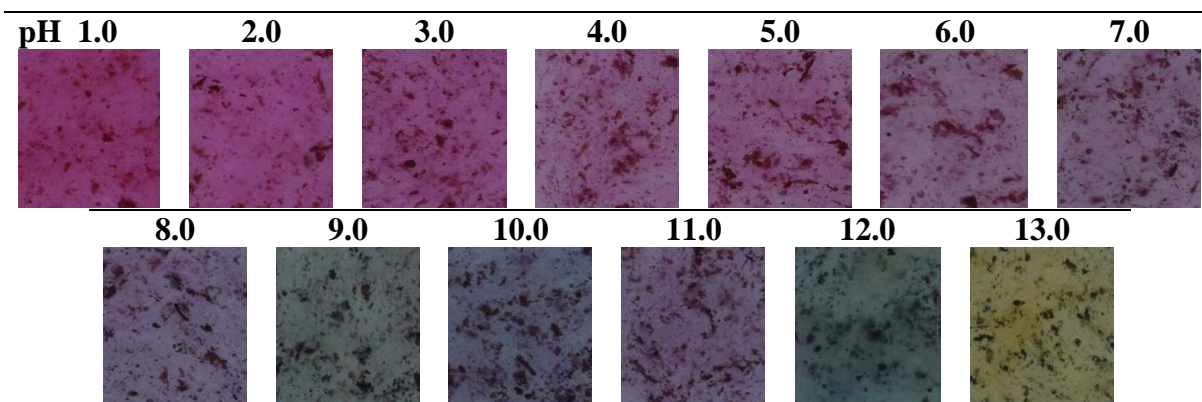
Parámetros de color (L^ , a^* , b^* y ΔE^*) de películas indicadoras colorimétricas después de la inmersión en soluciones tampón con valores de pH entre 1,0 y 13,0.*

H	F1 (5% PJ- 5%Lap)				F2 (10% PJ- 5%Lap)				F3 (15% PJ- 5%Lap)			
	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*	ΔL^*	Δa^*	Δb^*	ΔE^*
1,0	-28,8	38,2	0,0	27,5 ^A	-37,0	34,4	11,1	15,3 ^{A,F}	-40,8	31,6	16,0	17,0 ^A
2,0	-27,5	33,3	-3,1	23,4 ^B	-33,7	32,2	3,7	13,6 ^A	-38,6	31,8	6,7	16,7 ^{A,C}
3,0	-27,9	30,9	-2,4	20,9 ^C	-34,8	29,9	3,4	11,1 ^B	-37,5	30,0	4,4	16,7 ^{A,C}
4,0	-24,3	22,6	-0,4	12,8 ^D	-40,4	23,7	5,7	2,9 ^C	-40,7	26,3	6,4	11,6 ^{B,F,G}
5,0	-25,7	22,9	-0,2	12,7 ^D	-34,4	26,2	2,9	8,7 ^D	-40,7	23,5	5,5	10,4 ^{B,F}
6,0	-24,6	16,9	1,2	7,0 ^E	-35,3	24,6	2,2	7,3 ^D	-37,5	21,4	3,5	13,5 ^{C,F,G}
7,0	-26,0	13,9	2,0	3,9 ^F	-34,9	19,8	0,5	7,6 ^D	-43,2	15,8	1,6	10,2 ^B
8,0	-25,5	9,2	0,2	5,2 ^F	-36,7	13,6	2,2	8,9 ^{B,D}	-44,3	8,8	0,4	14,5 ^{A,C,G}
9,0	-26,5	-3,0	9,4	15,1 ^G	-41,1	2,3	7,5	18,8 ^E	-44,3	-1,9	12,5	22,8 ^D
10,0	-29,5	3,9	0,9	9,0 ^H	-39,0	8,6	-0,3	13,8 ^A	-46,7	-0,9	3,6	21,3 ^D
11,0	-28,6	10,7	0,5	4,8 ^F	-40,0	14,4	1,3	7,6 ^D	-47,9	5,2	-1,4	17,4 ^A

12,0	-32,9	5,4	8,5	18,2 ^I	-44,1	4,4	6,6	16,9 ^{E,F}	-45,2	-0,9	9,4	21,3 ^D
13,0	-21,7	-4,5	32,3	32,2 ^J	-41,7	-4,1	24,8	31,8 ^G	-40,8	1,4	33,4	32,6 ^E

Figura 2.

Aspecto visual de la película F1 (5% Lap, 5%PJ), después del contacto con las soluciones tampón a diferentes valores de pH



3.2. Humedad (%H) y Solubilidad (%S)

En la tabla 5 son presentados los porcentajes de humedad (%H) y de solubilidad (%S) promedio \pm desviación estándar, obtenidos para las formulaciones principales.

Tabla 5.

Porcentaje de humedad (%) y de solubilidad (%S) de las películas.

Formulación	Humedad (%)	Solubilidad (%)
C1	13,09 \pm 0,13	17,78 \pm 0,86 ^A
C2	14,71 \pm 2,31	27,95 \pm 2,86 ^B
F1	13,78 \pm 0,74	23,76 \pm 1,34 ^B
F2	14,41 \pm 0,07	23,38 \pm 1,60 ^B
F3	13,50 \pm 0,14	25,17 \pm 0,37 ^B

Los valores obtenidos para el %H de los filmes revelan que la presencia de Lap y ACN no altera la higroscopicidad de las películas a base de almidón de yuca, ya que no se observó un cambio significativo en dichos resultados, lo que podría atribuirse a la cantidad de glicerol usada en la matriz, la cual fue la misma en todas las formulaciones, puesto que, es la cantidad de

plastificante la que puede influenciar en el %H de la película, ya que favorece la adsorción de agua en la matriz debido a su hidrofilia, formando enlaces de hidrogeno (Mokrzycki y Tatol, 2011; Nguyen Vu y Lumdubwong, 2016). Resultados similares en el rango de 12,5% a 13,3% de humedad fueron obtenidos por Andretta *et al.* (2019), quienes produjeron películas indicadoras de pH a base almidón de yuca y residuos de arándanos por termocompresión y también observaron que la adición de ACN en las películas elaboradas no alteró el porcentaje de humedad de las mismas.

Por otra parte, al observar los resultados del %S se puede notar un aumento significativo en la solubilidad de las películas con contenido tanto de Lap como de PJ en comparación con la película control C1, lo que indica que debido a la adición de dichos compuestos hubo una alteración de las propiedades de superficie de los filmes. Dicho aumento se atribuyó a la presencia de Lap, ya que es un material higroscópico con alta solubilidad en agua (Andretta *et al.*, 2019). En el presente estudio, los resultados de solubilidad tienen coherencia con los valores de espesor y las micrografías SEM (sección 3.3 y 3.7), puesto que al ser C1 más delgado y presentar una estructura más homogénea, dificulta más la disolución de la matriz polimérica en agua, en comparación con las otras formulaciones.

3.3. Espesor (e) y Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)

En la Tabla 6 es posible observar que el espesor de las películas aumentó con la presencia de Lap, lo que indica que esta nanopartícula aumentó el contenido de sólidos en ellas; del mismo modo los filmes con contenido de PJ mostraron un aumento significativo en el espesor, posiblemente debido a la repulsión de la cadena polimérica de la película con las ACN. Nogueira *et al.* (2019), analizaron el efecto de la incorporación de partículas de mora en películas comestibles

del almidón de arrurruz, y presentaron un aumento en el grosor de las películas al incorporar el polvo de mora en comparación con la película control (0% polvo de mora).

Tabla 6.

Espesor (e) y Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas.

Formulación	Espesor (mm)	Pva ($\text{g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{h}\cdot\text{kpa}$)
C1	$0,34 \pm 0,02^a$	$1,11 \pm 0,11$
C2	$0,39 \pm 0,02^b$	$1,21 \pm 0,06$
F1	$0,40 \pm 0,02^{b, c}$	$1,20 \pm 0,05$
F2	$0,43 \pm 0,03^c$	$1,36 \pm 0,10$
F3	$0,41 \pm 0,04^{b, c}$	$1,26 \pm 0,00$

La permeabilidad al vapor de agua de todas las películas osciló entre 1,1 y 1,3 ($\text{g}\cdot\text{mm}/\text{m}^2 \cdot \text{h}\cdot\text{kPa}$) como se observa en la Tabla 6, sin presentarse efectos significativos ante la presencia de Lap y PJ, debido que se usó la misma cantidad de glicerol en todos los filmes y son precisamente los plastificantes los que incrementan el volumen libre, y como consecuencia, existe más espacio para que las moléculas de agua migren, además los plastificantes hidrofílicos como el glicerol son compatibles con el material polimérico que forma la película, aumentando la capacidad de sorción del agua (Bertuzzi *et al.*, 2007). En el presente trabajo la adición de Lap y ACN generó películas más heterogéneas, sin embargo, las micrografías de las películas (sección 3.7) no mostraron la formación de un camino tortuoso, espacio libre o generación de grandes agregados, lo cual podría modificar la difusión de agua a través de la matriz polimérica y, consecuentemente, los valores de PVA.

3.4. Ángulo de Contacto (AC)

En la Tabla 7 se observa que todos los filmes tuvieron AC menores a 90° , que son valores típicos de superficies hidrofílicas. Estos resultados podrían atribuirse tanto a la característica hidrofílica de la Lap debido a la presencia de grupos Si-OH en su estructura química, como a la

baja cantidad de Lap adicionada, la cual no fue suficiente para interferir en la propiedad superficial del material elaborado. Este resultado concuerda con Li *et al.* (2019), los cuales observaron que el valor ángulo de contacto cambió sólo cuando se inmovilizaron 50 mg/L de Lap en su película a base de poliamida.

Por otra parte, es posible notar que los valores de AC se ven afectados significativamente por la incorporación de PJ, es decir, ocurre una disminución del ángulo de contacto a medida que se aumenta %PJ, lo que quiere decir que las películas se van tornando un poco más hidrofílicas, atribuyéndose este comportamiento a los grupos hidroxilos presentes en el PJ.

Tabla 7.

Ángulo de contacto (AC) de las películas.

Formulación	Ángulo de contacto (°)
C1	75,36 ± 3,94 ^{a, b}
C2	85,87 ± 0,59 ^a
F1	80,42 ± 6,84 ^{a, b}
F2	70,60 ± 12,01 ^b
F3	66,75 ± 5,05 ^b

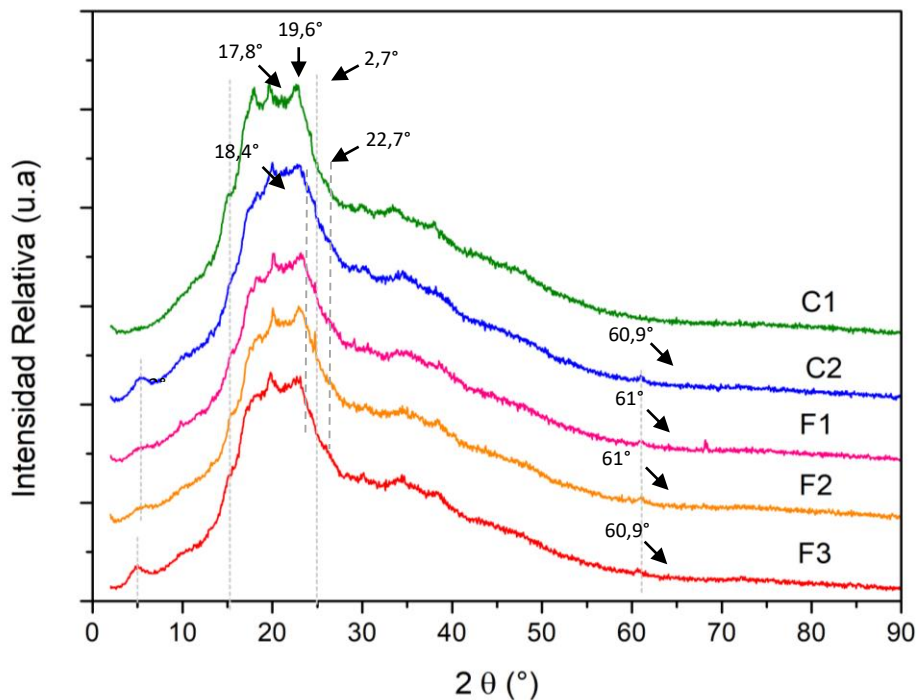
3.5. Difracción de Rayos X (DRX)

La Figura 3 representa el espectro de rayos X obtenido de películas de almidón de yuca con un patrón de difracción tipo B, Lap y películas con diferentes concentraciones de ACN. Los patrones de DRX de los nanocompuestos muestran varios picos en la región de 15° a 25° (2θ), los cuales se asociaron a la retrogradación de los granos de almidón de yuca que se reorganizaron formando de zonas cristalinas. En el caso de C1, se observa un difractograma propio de materiales a base de almidón, con estructura cristalina asociada a los picos 2θ= 17,8° (4,98 Å), 19,6° (4,52 Å) y 22,7° (3,91 Å), este último también asociado con las interacciones del enlace de hidrógeno de amilosa y glicerol (Medina Jaramillo *et al.*, 2016) . La adición de arcilla Lap en bajas cantidades no promueve cambios significativos en la estructura de las películas, ya que es posible observar la

similitud entre los perfiles, sin embargo los difractogramas de los filmes que contienen la nanopartícula (C2, F1, F2 y F3) muestran desplazamientos en los picos desde $2\theta=17,8^\circ$, $19,6^\circ$ y $22,7^\circ$ hasta $2\theta=18,4^\circ$ ($4,82 \text{ \AA}$), $19,9^\circ$ ($4,46 \text{ \AA}$) y 23° ($3,86 \text{ \AA}$), respectivamente (Perotti *et al.*, 2014). Análogamente, la intensidad máxima de los picos de difracción anteriormente observados en C1 en $2\theta=17,8^\circ$ y $22,7^\circ$ disminuyó con la adición de Lap. Estas alteraciones pueden estar asociadas con el incremento en el espaciamiento molecular de las cadenas amilosa/amilopectina (Gutiérrez *et al.*, 2018).

Figura 3.

Espectros obtenidos por difracción de rayos X de las películas control, control con Laponita, y películas colorimétricas con Laponita y contenido de antocianinas.



Paralelamente, se observó que las películas con contenido de Lap (5%) mostraron un pico en $2\theta=5,3^\circ$, ángulo con el cual mediante la ley de Bragg se logró determinar una distancia interplanar de al menos 17 \AA , asociada a la separación de las plaquetas de Lap intercaladas,

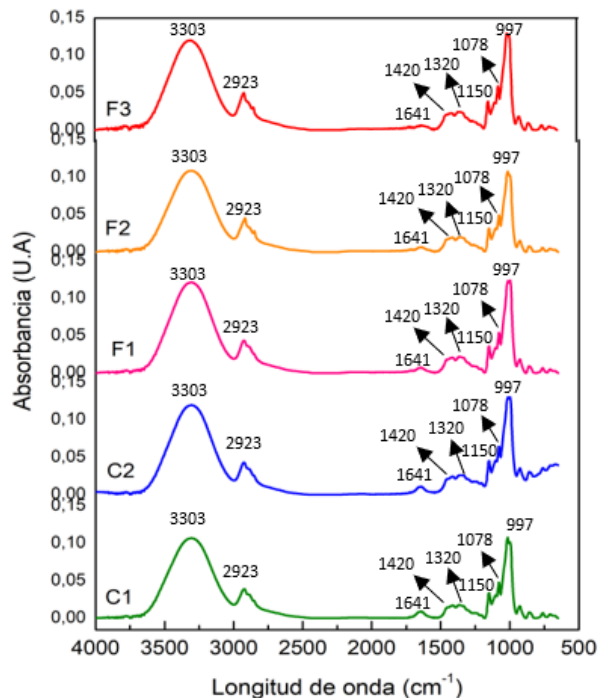
presentes en las películas (Valencia, 2017); para F3 dicho pico se dislocó ligeramente a la izquierda presentando un valor de $2\theta = 5^\circ$, correspondiente a una distancia interplanar de 18 Å. El aumento del espacio “d” sugiere que las ACN han sido adsorbidas entre las capas de la Lap (Ribeiro *et al.*, 2018). Perotti *et al.* (2014), produjeron películas por el método de “casting” a base de fécula de yuca con Lap y observaron que las plaquetas de Lap fueron exfoliadas o intercaladas para una concentración de nanopartícula menor a 10% y para una concentración mayor a 10% fue observada la formación de agregados de dicha nanoarcilla. Por otra parte, en las películas C2, F1, F2 y F3 se presentan picos en $2\theta = 60,9^\circ$ o en $2\theta = 61^\circ$ los cuales son atribuidos a la presencia de Lap. Los mismos resultados fueron reportados por Capello *et al.* (2019), que al caracterizar la laponita, la gráfica de rayos X exhibió un pico en $2\theta = 60,9^\circ$ que indicó la presencia de una estructura trioctaédrica típica de dicha nanoarcilla. Del mismo modo sucedió con Perotti *et al.* (2014), los cuales en sus patrones de DRX mostraron un pico tanto en el espectro de la laponita como en el de las películas de almidón de yuca con laponita en $2\theta = 61^\circ$, cuando la carga de la arcilla es superior a 5%.

3.6. Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

La Figura 4 ilustra los espectros FTIR obtenidos para las películas control, con y sin Lap, y las películas con diferentes concentraciones de ACN.

Figura 4.

Espectros FTIR de las películas control, control con Laponita, y películas colorimétricas con Laponita y antocianinas.



Dichos espectros evidencian varias bandas características de la estructura del almidón. La banda de absorción localizada entre 3000 y 3700 cm^{-1} , en aproximadamente 3303 cm^{-1} , presente en todas las formulaciones, representa el estiramiento de los grupo -OH (Halász y Csóka, 2018), correspondiente a las vibraciones de los grupos -OH del almidón, glicerol y agua en la película (Qin *et al.*, 2019); la banda en 2923 cm^{-1} representa el estiramiento de los grupos C-H (Medina Jaramillo *et al.*, 2016); en 1641 cm^{-1} se atribuye la banda a la vibración de los grupos -OH absorbidos por el material (Valencia, 2017); en 1150 cm^{-1} una banda de absorción característica asignada al enlace glucosídico de C-O-C (Medina Jaramillo *et al.*, 2016); en 1078 cm^{-1} típica vibración de los grupos C-O-C característicos del almidón (Valencia, 2017) por otro lado, la banda en 997 cm^{-1} presentó un aumento de la intensidad y dicha modificación se asoció al estiramiento de los grupos Si-O de la Lap. Finalmente, La absorbancia a 1420 y 1320 cm^{-1} presente en todos los

filmes representa las vibraciones –OH y –CH en los anillos del almidón, respectivamente (Valencia *et al.*, 2016).

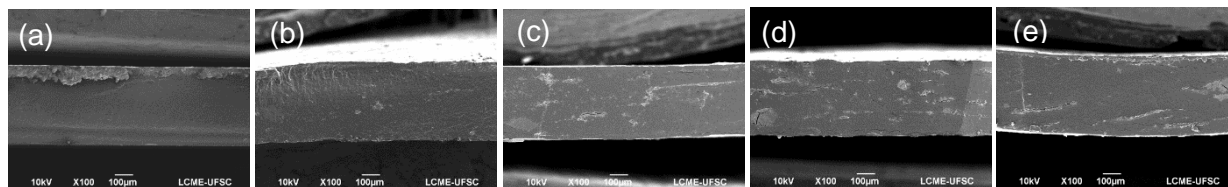
La no aparición nuevas bandas en los espectros FTIR cuando se incorporó Lap y PJ en las películas, indica que probablemente no se produjeron reacciones químicas entre la matriz polimérica y los compuestos, es decir, que ambos compuestos mantuvieron su estructura (Merz *et al.*, 2020). No obstante, la intensidad de las bandas en 3303, 1150 y 997 cm^{-1} aumentó con las concentraciones de PJ, permitiendo atribuir dicho aumento a las interacciones físicas a través de enlaces intermoleculares de hidrógeno entre las cadenas poliméricas, la Lap y el PJ.

3.7. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

En la Figura 5 se muestran las micrografías de la sección transversal de las películas a base de almidón de yuca, las cuales sufrieron modificaciones con la adición de Lap y PJ.

Figura 5.

Micrografías de la sección transversal después de la crio fractura de las películas: (a) 0 % Lap, 0 % PJ. (b) 5 % Lap, 0 % PJ. (c) 5 % Lap, 5 % PJ. (d) 5 % Lap, 10 % PJ. (e) 5 % Lap, 15 % PJ.

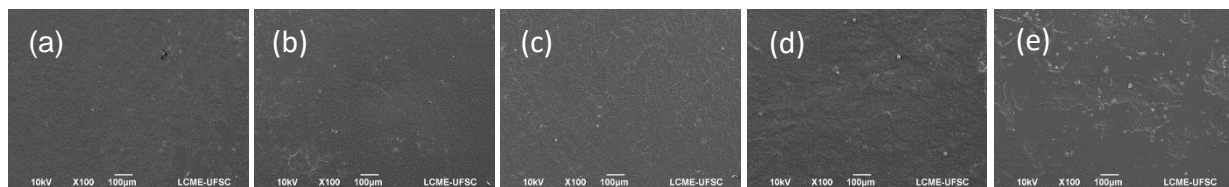


Se puede observar que C1 (Figura 5a), exhibió una estructura más homogénea y compacta comparada con las demás formulaciones, ya que está compuesta solo por biopolímero, agua y glicerol. La incorporación de Lap modificó la microestructura del filme C2 (Figura 5b), el cual presentó una estructura más rugosa y heterogénea. Aun así, se observaron pocos agregados, es

decir, hubo una buena dispersión de la nanopartícula en la matriz polimérica. Resultados similares fueron obtenidos por Valencia *et al.* (2018) quienes fabricaron películas con contenido de Lap por el método de Casting. Por otra parte, los filmes con PJ y Lap, F1, F2 y F3, (Figura 5c, Figura 5d y Figura 5e) mostraron superficies heterogéneas, sin embargo, no hubo ninguna separación de fases ni formación de poros, lo que demuestra que se logró una buena miscibilidad del PJ en las formulaciones. No obstante, los resultados con la adición de ACN mostraron que a medida que el contenido de las mismas aumentaba, la estructura era un poco más heterogénea y las fisuras menos compactas, lo que indica que la estructura de las películas vuelve más áspera la red de biopolímeros (Zhang *et al.*, 2019).

Figura 6.

Micrografías de la superficie de las películas: (a) 0 % Lap, 0 % PJ. (b) 5 % Lap, 0 % PJ. (c) 5 % Lap, 5 % PJ. (d) 5 % Lap, 10 % PJ. (e) 5 % Lap, 15 % PJ.



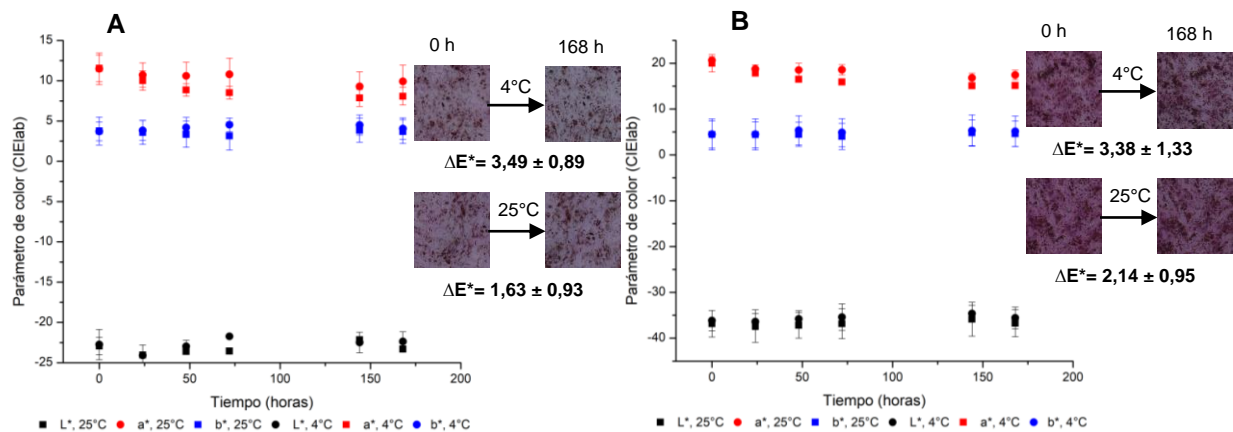
En la Figura 6a y Figura 6b, correspondientes a los filmes C1 y C2, es posible observar una morfología homogénea, lo que indica una fuerte interacción entre la arcilla y el biopolímero (Perotti *et al.*, 2014). Las películas analizadas también están libres de agregados que posiblemente podrían surgir de la condensación de una gran cantidad de plaquetas de arcilla. La adición de PJ no provocó cambios en las superficies de las películas F1, F2 y F3 (Figura 6c, Figura 6d y Figura 6e).

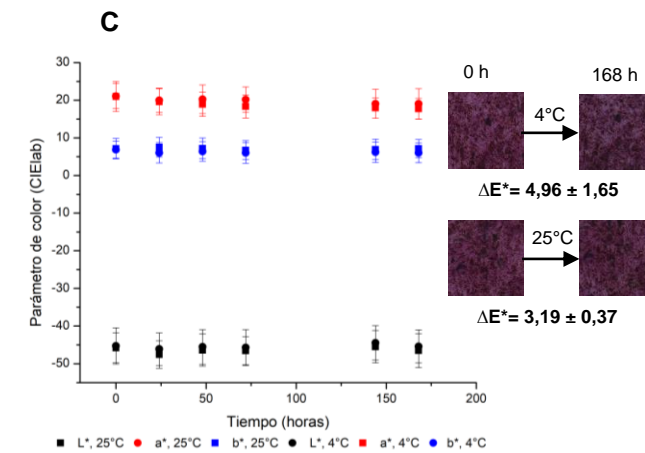
3.8. Fotodegradación

Los parámetros de color obtenidos para cada una de las películas con contenido de PJ se presentan a manera de gráficas en la Figura 7 y es posible notar que en general en todas las películas con contenido de ACN que fueron expuestas a la luz, se mantuvieron constantes durante los 8 días de exposición, tanto a una temperatura de 4 °C como a una de 25 °C mostraron una tendencia similar a través del tiempo. Sin embargo, el parámetro colorimétrico a* disminuyó levemente durante la prueba (Figura 7a), lo que indica una disminución en el enrojecimiento de las películas. Dicha disminución osciló entre el 10% y el 30% en función del valor a* inicial de cada filme. Anteriormente Merz *et al.* (2020) estudió la fotodegradación de las ACN del PJ agregadas a películas a base de quitosano y alcohol de polivinilo, sin Lap, y concluyeron que los valores de a* disminuyeron casi un 40%, lo que sugiere que la Lap ayuda a estabilizar las ACN presentes en el PJ contra la irradiación de luz visible. Resultados similares fueron previamente informados por Capello *et al.* (2019), quienes realizaron el estudio con ACN secas proveniente de la cáscara de berenjena estabilizadas con Lap.

Figura 7.

Parámetros de color L, a* y b* de las películas expuestas a luz a 4°C y 25°C: (a) F1, 5 % PJ y 5 % Lap. (b) F2, 10 % PJ y 5 % Lap. (c) F3, 15 % PJ y 5 % Lap.*





Los resultados del parámetro ΔE^* , o cambio de color para cada filme a determinada temperatura entre el tiempo $t=0$ h y $t=168$ h, revelan que, aunque para ninguna de las formulaciones existe una diferencia de color visualmente perceptible ($\Delta E^* < 3,5$) (Mokrzycki & Tatol, 2011), F1 reportó un resultado de ΔE^* similar a F2 y uno menor a F3 a una temperatura de 4 °C, sin embargo, a 25 °C mostro una variación de color menor en comparación con F2 y F3, indicando una menor degradación de las ACN por efecto de la luz.

3.9. Características Principales de la Formulación Seleccionada F1.

Se tuvieron en cuenta las caracterizaciones más relevantes para la selección de F1 como la formulación recomendada, la cual, a su vez, fue utilizada en el test de aplicación, debido a que: (1) Presentó un porcentaje de solubilidad bajo y un ángulo de contacto mayor en comparación con las formulaciones con mayor contenido de PJ, lo que indica que posee un mayor grado de hidrofobicidad con respecto a las demás. (2) Al ser sometida al contacto con soluciones tampón con pH entre 1 y 13, mostró un número mayor de diferencias significativas de cambio de color entre las muestras a diferentes pH en comparación con las dos formulaciones restantes. (3) Al entrar en contacto con la irradiación de luz, sus parámetros colorimétricos presentaron leves variaciones, es decir, su color característico no se degradó debido a dicha exposición; además, en comparación

con las formulaciones F2 y F3, arrojó un valor menor para el parámetro ΔE^* , es decir, las ACN presentes en esta película mostraron un mayor grado de estabilidad a través del tiempo al ser sometidas al contacto con la luz. (4) Su micrografía transversal mostró una estructura menos áspera, más homogénea y compacta en comparación con F2 y F3.

4. Test de Aplicación de las Películas Indicadoras Colorimétricas

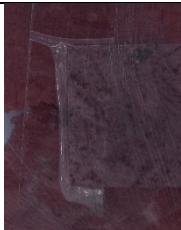



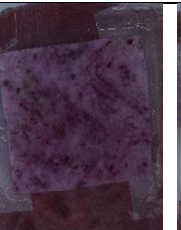







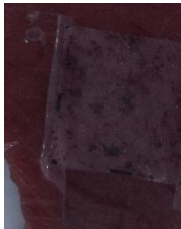



En la Figura 8 se muestra la apariencia visual de la prueba de carne de res en la que las muestras de película fueron puestas en contacto indirecto. Debido a la hidrofilia de la película de almidón, del PJ y a la higroscopicidad de la Lap, la película fijada para la muestra de carne a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ fue ganando un poco de humedad, sin embargo, no se percibe un cambio de color debido a variaciones de pH, ya que la carne se conservó a causa de la óptima temperatura a la que se encontraba y esto se puede verificar al observar que con el paso de los días la carne mantiene su color.

A partir del día 3 para la muestra a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ se observa un morado más intenso en la película y se puede percibir el cambio de color en la carne, es decir a partir de ese día se estaba iniciando la degradación del producto, lo que exitosamente se logró percibir con la película indicadora. Por el contrario, para la muestra que se almacenó a una temperatura de $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, era de suponerse que después de 24 horas a dicha temperatura la carne estuviera degradada y efectivamente ocurrió; como se puede observar la carne había perdido su color rojizo y la muestra de película tomó un color verdoso amarillento, que con el paso de los días se fue convirtiendo a un amarillo debido al aumento del pH. Los resultados obtenidos se pueden corroborar con los observados en la prueba

de soluciones tampón a diferentes pH, donde a medida que va aumentando el pH se va pasando de un morado intenso, por un verde claro a oscuro, hasta llegar al amarillo.

Figura 8.

Aplicación de la formulación F1 sobre carne de res a condiciones de almacenamiento real.

T	Tiempo					
	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 7
-24 °C						
	Ph _{carne} = 5,53	Ph _{carne} = 6,31	Ph _{carne} = 6,21	Ph _{carne} = 6,20	Ph _{carne} = 6,15	Ph _{carne} = 6,15
4 °C						
	Ph _{carne} = 5,53	Ph _{carne} = 5,58	Ph _{carne} = 5,57	Ph _{carne} = 5,54	Ph _{carne} = 5,23	
30 °C						
	Ph _{carne} = 5,53	Ph _{carne} = 5,7	Ph _{carne} = 7,18	Ph _{carne} = 8,21		

5. Conclusiones

Las películas desarrolladas a base de almidón de yuca con contenido de PJ y Lap mediante el proceso de termocompresión, al ser sometidas a diferentes técnicas de caracterización

evidenciaron su potencial como material colorimétrico indicador de pH para su posible uso en la industria de empaques de alimentos.

Se logró establecer la película F1 (5%PJ) como la formulación recomendada, ya que mostró tener un mejor ángulo de contacto en comparación con el resto de las formulaciones, además la que mejor respuesta de color tuvo al aplicarle diferentes soluciones tampón, ya que con esta formulación los cambios de color fueron más intensos y visibles al ojo humano.

La estructura química, cristalinidad, morfología y espesor de las películas sugieren que el espaciado molecular en las cadenas amilosa/amilopectina fue alterado con la presencia de la Lap y el PJ. Sin embargo, propiedades como la humedad y la permeabilidad al vapor de agua no se vieron afectadas por la presencia de estos compuestos, debido al uso de la misma cantidad de plastificante en todas las formulaciones, ya que es su hidrofilia la que favorece la adsorción de agua en la matriz de la película. Por otra parte, el ángulo de contacto disminuyó considerablemente al aumentar la concentración de PJ, lo cual se atribuye a la característica hidrofílica del mismo.

Las películas colorimétricas elaboradas a partir de la matriz en presencia de Lap, mostraron una diferencia de color (ΔE^*) perceptible con respecto a las formulaciones que no contenían la nanoarcilla. Además, los filmes con contenido de Lap, al ser expuestos a la irradiación de luz visible no presentaron cambios significativos en los parámetros colorimétricos evaluados a través del tiempo, lo que sugiere su uso tanto para la preservación de las ACN durante el proceso de termocompresión, como para mantener la estabilidad de las mismas evitando su fotodegradación.

La frescura de la carne de res fue evaluada mediante la aplicación de las películas con 5 % de Lap y 5 % de PJ (F1), las cuales lograron demostrar su capacidad de indicar la degradación del producto, ya que presentaron cambios visibles de color a pH básicos (de morado a amarillo).

6. Recomendaciones

Teniendo en cuenta que el material elaborado es una película polimérica se recomienda examinar las propiedades mecánicas de los filmes

Realizar un análisis termo gravimétrico con el fin de caracterizar las propiedades físicas y químicas de las películas en función de la temperatura en una atmosfera controlada de forma precisa.

Estudiar otras fuentes de antocianinas de productos considerados residuos.

Referencias Bibliográficas

- Alves, V. D., Mali, S., Beléia, A. y Grossmann, M. V. E. (2007). Effect of glycerol and amylose enrichment on cassava starch film properties. *Journal of Food Engineering*, 78(3), 941–946. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.12.007>
- Andretta, R., Luchese, C. L., Tessaro, I. C. y Spada, J. C. (2019). Development and characterization of pH-indicator films based on cassava starch and blueberry residue by thermocompression. *Food Hydrocolloids*, 93, 317–324. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.02.019>
- Barcia, M. (2009). *Composição centesimal e de fitoquímicos em jambolão (Syzygium cumini)* (tesis de maestría). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.
- Bergo, P., Moraes, I. C. F. y Sobral, P. J. D. A. (2012). Effects of moisture content on structural and dielectric properties of cassava starch films. *Starch/Staerke*, 64(10), 835–839. <https://doi.org/10.1002/star.201200023>
- Bertuzzi, M. A., Castro Vidaurre, E. F., Armada, M. y Gottifredi, J. C. (2007). Water vapor permeability of edible starch based films. *Journal of Food Engineering*, 80(3), 972–978. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.07.016>
- Bukzem, A., Dos santos, D. y Ramirez, D. (2012). Filmes Biodegradáveis a base de fécula de mandioca e bagaço de cevada obtidos por extrusão termoplástica. *Agrotecnologia, Anápolis, GO*, 3(2), 89–107.
- Capello, C. (2020). *Desenvolvimento de biohíbrido à base de antocianina de casca de ovos (solanum melongena l.) e laponita®: estudo das cinéticas de adsorção / desorção,*

caracterização química morfológica e física (tesis de maestría). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Capello, C., Leandro, G. C., Maduro Campos, C. E., Hotza, D., Mattar Carciofi, B. A. y Valencia, G. A. (2019). Adsorption and desorption of eggplant peel anthocyanins on a synthetic layered silicate. *Journal of Food Engineering*, 262, 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.06.010>

Cárdenas-Pérez, S., Chanona-Pérez, J., Méndez-Méndez, J. V., Calderón-Domínguez, G., López-Santiago, R., Perea-Flores, M. J. y Arzate-Vázquez, I. (2017). Evaluation of the ripening stages of apple (Golden Delicious) by means of computer vision system. *Biosystems Engineering*, 159, 46–58. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2017.04.009>

Chivrac, F., Angellier-Coussy, H., Guillard, V., Pollet, E. y Avérous, L. (2010). How does water diffuse in starch/montmorillonite nano-biocomposite materials?. *Carbohydrate Polymers*, 82(1), 128–135. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.04.036>

Cortez, R., Luna-Vital, D. A., Margulis, D. y Gonzalez de Mejia, E. (2017). Natural Pigments: Stabilization Methods of Anthocyanins for Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 180–198. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12244>

Dilkes-Hoffman, L. S., Lane, J. L., Grant, T., Pratt, S., Lant, P. A. y Laycock, B. (2018). Environmental impact of biodegradable food packaging when considering food waste. *Journal of Cleaner Production*, 180, 325–334. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.01.169>

do Carmo Brito, B. de N., Pena, R. da S., Lopes, A. S. y Chiste, R. C. (2017). Anthocyanins of

- Jambolao (*Syzygium cumini*): Extraction and pH-Dependent Color Changes. *Journal of Food Science*, 82(10), 2286–2290.
- Famá, L., Goyanes, S. y Gerschenson, L. (2007). Influence of storage time at room temperature on the physicochemical properties of cassava starch films. *Carbohydrate Polymers*, 70(3), 265–273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.04.003>
- Flores, S., Famá, L., Rojas, A. M., Goyanes, S. y Gerschenson, L. (2007). Physical properties of tapioca-starch edible films: Influence of filmmaking and potassium sorbate. *Food Research International*, 40(2), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.02.004>
- Ghaani, M., Cozzolino, C. A., Castelli, G. y Farris, S. (2016). An overview of the intelligent packaging technologies in the food sector. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.02.008>
- Giusti, M. M. y Wrolstad, R. E. (2001). Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 00(1), F1.2.1-F1.2.13. <https://doi.org/doi:10.1002/0471142913.faf0102s00>
- Gutiérrez, T. J., Herniou-Julien, C., Álvarez, K. y Alvarez, V. A. (2018). Structural properties and in vitro digestibility of edible and pH-sensitive films made from guinea arrowroot starch and wastes from wine manufacture. *Carbohydrate Polymers*, 184, 135–143. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.039>
- Halász, K. y Csóka, L. (2018). Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) pomace extract immobilized in chitosan for colorimetric pH indicator film application. *Food Packaging and Shelf Life*, 16, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.03.002>

Huber, K. C. y Embuscado, M. E. (2009). *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Springer Science and Business Media.

Jiménez, A., Fabra, M. J., Talens, P. y Chiralt, A. (2012). Edible and Biodegradable Starch Films: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2058–2076. <https://doi.org/10.1007/s11947-012-0835-4>

Khoo, H. E., Azlan, A., Tang, S. T. y Lim, S. M. (2017). Anthocyanidins and anthocyanins: Colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits. *Food and Nutrition Research*, 61. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1361779>

Kohno, Y., Kinoshita, R., Ikoma, S., Yoda, K., Shibata, M., Matsushima, R., Tomita, Y., Maeda, Y. y Kobayashi, K. (2009). Stabilization of natural anthocyanin by intercalation into montmorillonite. *Applied Clay Science*, 42(3), 519–523. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.06.012>

Li, Y., Ying, Y., Zhou, Y., Ge, Y., Yuan, C., Wu, C. y Hu, Y. (2019). A pH-indicating intelligent packaging composed of chitosan-purple potato extractions strength by surface-deacetylated chitin nanofibers. *International Journal of Biological Macromolecules*, 127, 376-384. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.060>

Liu, J., Wang, H., Guo, M., Li, L., Chen, M., Jiang, S., Li, X. y Jiang, S. (2019). Extract from *Lycium ruthenicum* Murr. Incorporating κ -carrageenan colorimetric film with a wide pH-sensing range for food freshness monitoring. *Food Hydrocolloids*, 94, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.008>

López-Angulo, D., Bittante, A. M. Q. B., Luciano, C. G., Ayala-Valencia, G., Flaker, C. H. C., Djabourov, M. y do Amaral Sobral, P. J. (2020). Effect of Laponite® on the structure, thermal

- stability and barrier properties of nanocomposite gelatin films. *Food Bioscience*, 35, 100596.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100596>
- Maciel, V. B. V, Yoshida, C. M. P. y Franco, T. T. (2012). Development of a prototype of a colourimetric temperature indicator for monitoring food quality. *Journal of Food Engineering*, 111(1), 21–27. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.01.037>
- Mali, S., Grossmann, M. y Yamashita, F. (2010). Filmes de amido: Produção, propriedades e potencial de utilização. *Semina: Ciências Agrárias*, 31, 137-156.
<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2010v31n1p137>
- Medina Jaramillo, C., Gutiérrez, T. J., Goyanes, S., Bernal, C. y Famá, L. (2016). Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. *Carbohydrate Polymers*, 151, 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.025>
- Merz, B. (2019). *Desenvolvimento e caracterização de Filmes Indicadores contendo Antocianinas do fruto do jambolão (Syzygium cumini)* (tesis de pregrado). Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.
- Merz, B., Capello, C., Leandro, G. C., Moritz, D. E., Monteiro, A. R. y Valencia, G. A. (2020). A novel colorimetric indicator film based on chitosan, polyvinyl alcohol and anthocyanins from jambolan (*Syzygium cumini*) fruit for monitoring shrimp freshness. *International Journal of Biological Macromolecules*, 153, 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.048>
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2018). Métodos Analíticos Oficiais Para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes.
https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/poa/Manualdemtodosoficiaisparaanlisedealimentosdeorigemanimal1ed.rev_.pdf

- Mokrzycki, W. S. y Tatol, M. (2011). Color difference Delta E - A survey. *Machine Graphics & Vision*, 20(4), 383–411.
- Nguyen Vu, H. P. y Lumdubwong, N. (2016). Starch behaviors and mechanical properties of starch blend films with different plasticizers. *Carbohydrate Polymers*, 154, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.08.034>
- Nicolai, T. y Cocard, S. (2000). Light scattering study of the dispersion of laponite. *Langmuir*, 16(21), 8189–8193. <https://doi.org/10.1021/la9915623>
- Nogueira, G. F., Fakhouri, F. M. y de Oliveira, R. A. (2019). Effect of incorporation of blackberry particles on the physicochemical properties of edible films of arrowroot starch. *Drying Technology*, 37(4), 448–457. <https://doi.org/10.1080/07373937.2018.1441153>
- Olivera, N., Rouf, T. B., Bonilla, J. C., Carriazo, J. G., Dianda, N. y Kokini, J. L. (2019). Effect of LAPONITE® addition on the mechanical, barrier and surface properties of novel biodegradable kafirin nanocomposite films. *Journal of Food Engineering*, 245, 24–32. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.10.002>
- Perotti, G. F., Tronto, J., Bizeto, M. A., Izumi, C. M. S., Temperini, M. L. A., Lugão, A. B., Parra, D. F. y Constantino, V. R. L. (2014). Biopolymer-clay nanocomposites: Cassava starch and synthetic clay cast films. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(2), 320–330. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130300>
- Piñeros-Hernandez, D., Medina-Jaramillo, C., López-Córdoba, A. y Goyanes, S. (2017). Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. *Food Hydrocolloids*, 63, 488–495. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.034>

- Qin, Y., Liu, Y., Yong, H., Liu, J., Zhang, X. y Liu, J. (2019). Preparation and characterization of active and intelligent packaging films based on cassava starch and anthocyanins from *Lycium ruthenicum* Murr. *International Journal of Biological Macromolecules*, 134, 80–90. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.029>
- Ribeiro, H. L., Oliveira, A. V. de, Brito, E. S. d., Ribeiro, P. R. V., Souza Filho, M. de sá M. y Azeredo, H. M. C. (2018). Stabilizing effect of montmorillonite on acerola juice anthocyanins. *Food Chemistry*, 245, 966–973. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.076>
- Rodriguez-Amaya, D. B. (2016). Natural food pigments and colorants. *Current Opinion in Food Science*, 7, 20–26. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.08.004>
- Saberi, B., Chockchaisawasdee, S., Golding, J. B., Scarlett, C. J. y Stathopoulos, C. E. (2017). Physical and mechanical properties of a new edible film made of pea starch and guar gum as affected by glycols, sugars and polyols. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104(A), 345-359. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.051>
- Souza, A. C., Benze, R., Ferrão, E. S., Ditchfield, C., Coelho, A. C. V. y Tadini, C. C. (2012). Cassava starch biodegradable films: Influence of glycerol and clay nanoparticles content on tensile and barrier properties and glass transition temperature. *LWT - Food Science and Technology*, 46(1), 110–117. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.10.018>
- Sui, X., Sun, H., Qi, B., Zhang, M., Li, Y. y Jiang, L. (2018). Functional and conformational changes to soy proteins accompanying anthocyanins: Focus on covalent and non-covalent interactions. *Food Chemistry*, 245, 871–878. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.090>
- Valencia, G. y do Amaral Sobral, P. J. (2018). Recent trends on nano-biocomposite polymers for food packaging. *Polymers for Food Applications*, 101-130. <https://doi.org/10.1007/978-3->

319-94625-2_5

Valencia, G. (2017). *Propriedades físicas de filmes à base de biopolímeros reforçados com laponita* (tesis de doctorado). Universidad Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

Valencia, G., Lourenço, R. V., Bittante, A. M. Q. B. y do Amaral Sobral, P. J. (2016). Physical and morphological properties of nanocomposite films based on gelatin and Laponite. *Applied Clay Science*, 124–125, 260–266. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.02.023>

Valencia, G., Luciano, C. G., Lourenço, R. V., Bittante, A. M. Q. B. y do Amaral Sobral, P. J. (2019). Morphological and physical properties of nano-biocomposite films based on collagen loaded with laponite®. *Food Packaging and Shelf Life*, 19, 24–30. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.013>

Valencia, G., Luciano, C. G., Lourenço, R. V. y do Amaral Sobral, P. J. (2018). Microstructure and physical properties of nano-biocomposite films based on cassava starch and laponite. *International Journal of Biological Macromolecules*, 107, 1576–1583. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.10.031>

Zhang, J., Zou, X., Zhai, X., Huang, X. W., Jiang, C., & Holmes, M. (2019). Preparation of an intelligent pH film based on biodegradable polymers and roselle anthocyanins for monitoring pork freshness. *Food Chemistry*, 272, 306–312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.041>

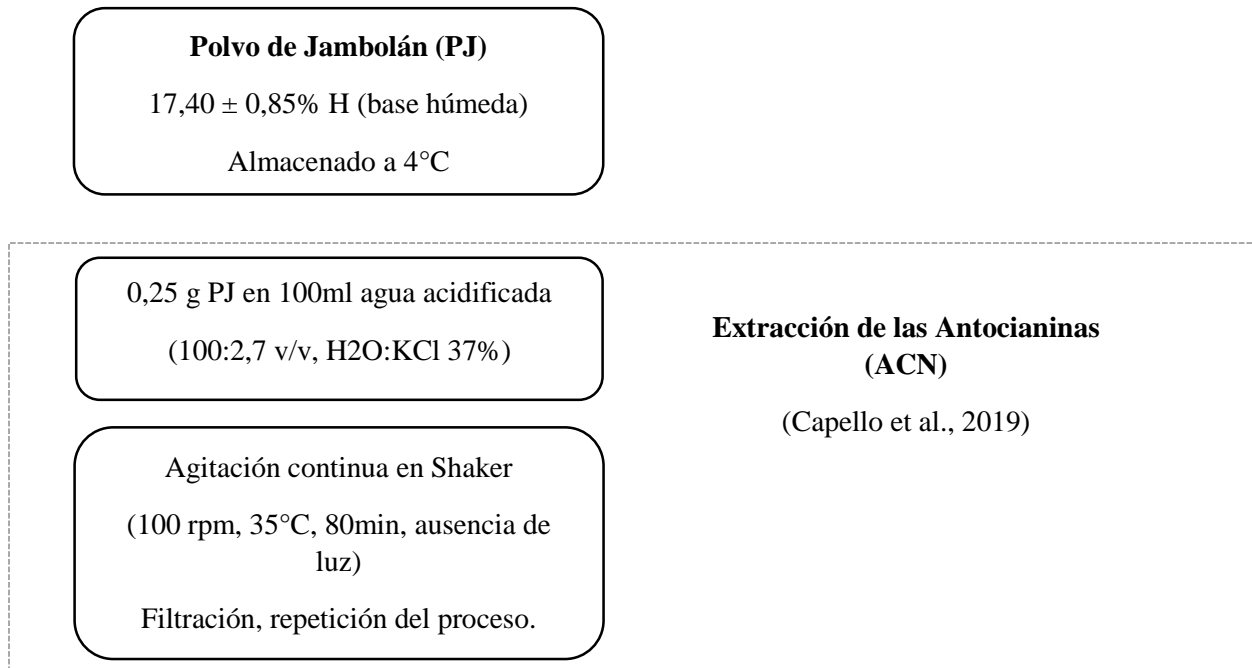
Apéndices

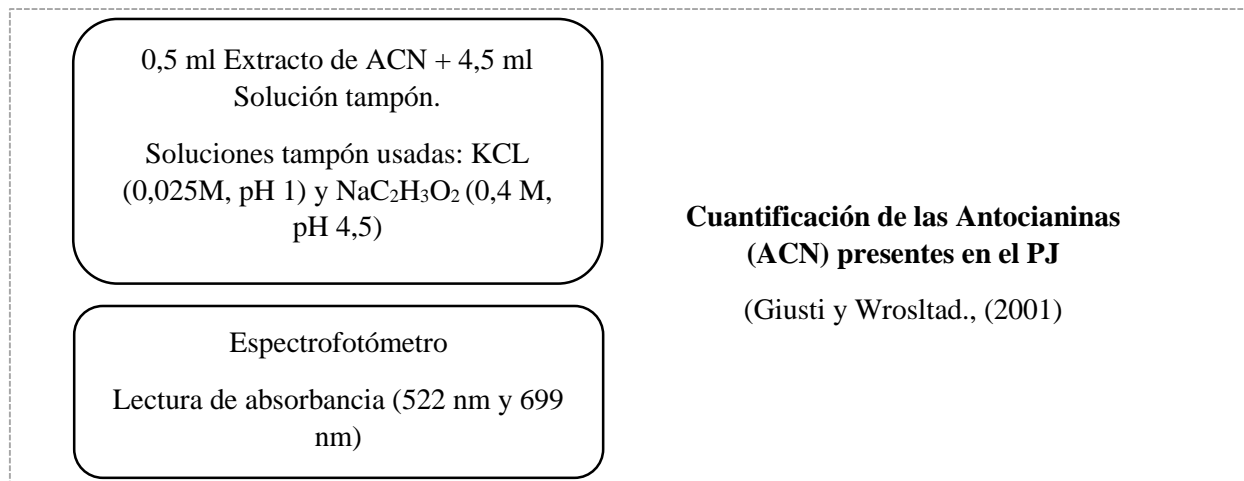
Apéndice A. Determinación de la concentración de ACN presentes en el PJ obtenido, a partir del método de pH diferencial.

En la Figura A se describe la metodología experimental utilizada para calcular la concentración de ACN totales presentes, mediante la extracción acidificada de ACN y posteriormente la aplicación del método de pH diferencial, a través de un espectrofotómetro UV-vis (U-2900, Hitachi).

Figura A.

Flujograma de caracterización del PJ obtenido.





El proceso de obtención del extracto es mencionado explícitamente en la sección 2.2.1. Para la cuantificación de antocianinas presentes se prepararon en tubos de ensayo separados dos tipos de soluciones, usando alícuotas de extracto de ACN (0,5 ml). En la primera, dicha cantidad de extracto fue disuelta en 4,5 ml de una solución buffer de cloruro de potasio KCl al 0,025M (pH= 1,0), y, en la segunda en 4,5 ml de una solución tampón de acetato de sodio NaC₂H₃O₂ al 0,4M (pH=4,5). Para los ensayos de absorbancia, cada muestra fue medida a 522 nm (máxima absorción) y a 699 nm (no ocurre absorción, lectura que sirve para corrección de la posible turbidez causada por la presencia de sedimentos) (Capello, 2020). Siendo entonces, la concentración de ACN totales presentes en el extracto, calculada con la Ecuación A, (Giusti y Wroslstad, 2001).

$$ACN_{Totales} = \frac{[(A_{520} - A_{699})_{pH=1,0} - (A_{520} - A_{699})_{pH=4,5}] \times Mw \times DF \times 1000}{\epsilon \times L} \quad (A)$$

Donde, A_{520} es la absorbancia a 520 nm, A_{699} la absorbancia a 699 nm, Mw el peso molecular de la da cianidina-3-glicosídeo (449,2 g/mol), DF el factor de dilución (10), ϵ es el coeficiente de extinción molar (29600 L/(cm.mol)), y L es la Longitud del comino óptico (1 cm). Agua destilada es usada como blanco.

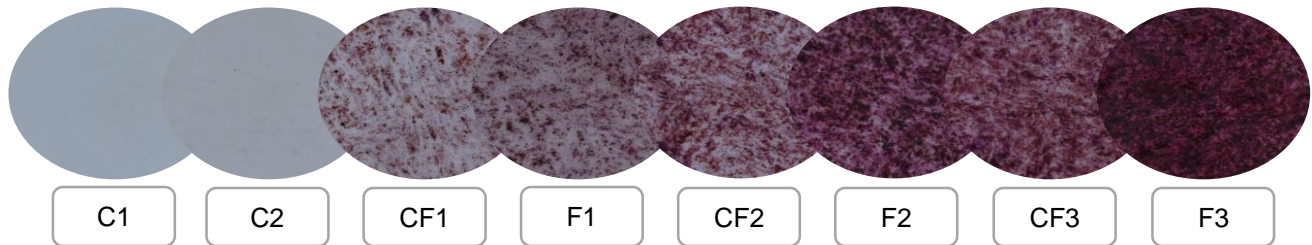
Apéndice B. Evidencia Fotográfica de las Formulaciones Elaboradas

Análisis Colorimétrico Inicial

Películas control indicadoras colorimétricas con 0%, 5%, 10%, y 15% (C1, CF1, CF2, CF3) vs. Películas indicadoras colorimétricas con adición de Laponita y 0%, 5%, 10% y 15% (C2, F1, F2 y F3).

Figura B1.

Películas indicadoras colorimétricas elaboradas, con 0%, 5%, 10% y 15% de PJ, con y sin adición de Lap.

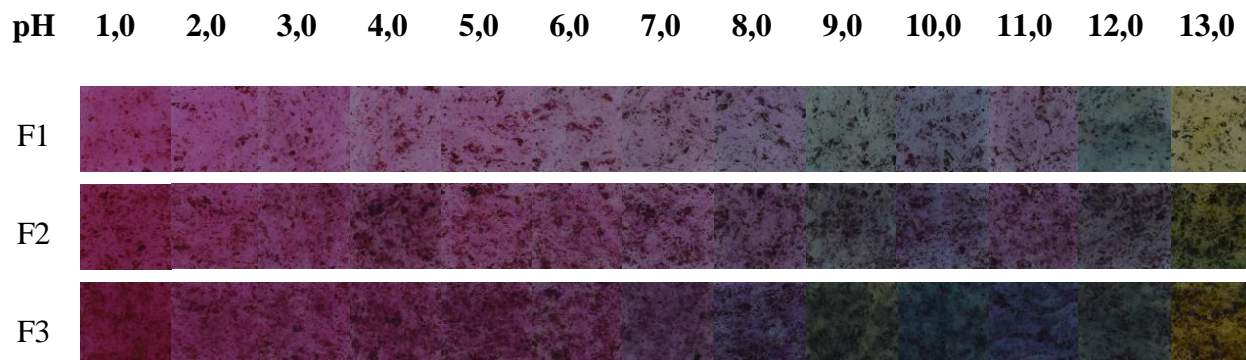


Análisis colorimétrico en función de los cambios de pH

Películas indicadoras colorimétricas con contenido de Lap y PJ (5%, 10% y 15%), después del contacto con soluciones buffer (pH 1,0-13,0).

Figura B2.

Películas indicadoras colorimétricas elaboradas, con 0%, 5%, 10% y 15% de PJ, y 5% de Lap, sometidas al contacto con soluciones tampón con pH entre 1,0 y 13,0.



Apéndice C. Resultados de los Análisis de Varianza (ANOVA).

A continuación, se presentan los resultados de la Prueba ANOVA aplicada para determinar si la variable Concentración PJ (%) tiene efecto significativo sobre distintas propiedades de las películas resultantes. En caso de haber obtenido resultados que anulen la hipótesis nula del test (La concentración PJ (%) no tiene efecto sobre la variable de respuesta), y confirmen la hipótesis alternativa (al menos dos concentraciones presentan diferencias significativas), se efectuó una prueba Tukey en el software SAS University Edition.

En cada una de las tablas se encuentran las columnas: *Grados de libertad, *SC= Suma de cuadrados, *CM= Cuadrados medios, *F₀= Estadístico de prueba y F_{crit}= Estadístico de prueba crítico.

Análisis Colorimétrico Inicial.

Efecto del %PJ sobre el parámetro colorimétrico ΔE*:

Tabla C1.

Resultados del ANOVA del efecto de los %PJ sobre ΔE de los filmes.*

	Grados de libertad	SC	CM	F₀	F_{crit}
Tratamiento	3	407,45	135,82		
Error	12	30,76	2,56	52,98	3,49
Total	15	438,21			

Al comparar el estadístico de prueba, con el valor crítico para un nivel de confianza del 95% (α=0,05), se observa que F₀ > F_{crit}, lo que indica que existen diferencias significativas entre los valores de ΔE* de las películas a diferentes concentraciones de PJ. En consecuencia, al efectuar

el método Tukey, se conoció entre cuales tratamientos existe dicha diferencia. (Resultados en la sección 3.1.1- Tabla 3).

Análisis Colorimétrico en Función del Cambio de pH.

Efecto del pH de la solución tampón sobre el parámetro colorimétrico ΔE^* para cada una de las formulaciones elaboradas.

Tabla C2.

Resultados del ANOVA del efecto de los pH de la solución tampón sobre ΔE^ de la formulación F1.*

	Grados de libertad	SC	CM	F₀	F_{crit}
Tratamiento	12	4001,20	333,43		
Error	39	11,25	0,29	1156,08	2,00
Total	51	4012,45			

Tabla C3.

Resultados del ANOVA del efecto de los pH de la solución tampón sobre ΔE^ de la formulación F2.*

	Grados de libertad	SC	CM	F₀	F_{crit}
Tratamiento	12	2553,20	212,77		
Error	39	31,38	0,80	264,41	2,00
Total	51	2584,58			

Tabla C4.

Resultados del ANOVA del efecto de los pH de la solución tampón sobre ΔE^ de la formulación F3.*

	Grados de libertad	SC	CM	F₀	F_{crit}
Tratamiento	12	1803,89	150,32		
Error	39	67,78	1,74	86,49	2,00
Total	51	1871,68			

En los tres casos, al comparar el estadístico de prueba, con el valor crítico para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), se observa que $F_0 > F_{crit}$, lo que indica que existen diferencias significativas entre los valores de ΔE^* de cada formulación a diferentes pH de las soluciones tampón goteadas sobre el filme. En consecuencia, al efectuar el método Tukey, se conoció entre cuales tratamientos existen dichas diferencias. (Resultados en la sección 3.1.2- Tabla 4).

Humedad (%H)

Efecto del %PJ sobre el porcentaje de humedad %H.

Tabla C5.

Resultados del ANOVA del efecto de los %PJ sobre %H de los filmes.

	Grados de libertad	SC	CM	F₀	F_{crit}
Tratamiento	4	3,48	0,87		
Error	5	5,91	1,18	0,74	5,19
Total	9	9,39			

Al comparar el estadístico de prueba, con el valor crítico para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), se observa que $F_0 < F_{crit}$, lo que indica que no existen diferencias significativas entre

los valores de %H de las películas a diferentes concentraciones de PJ. Es decir, se acepta la hipótesis nula que plantea que el %PJ no tiene efecto sobre la variable de respuesta, en este caso, %H.

Solubilidad (%S)

Efecto del %PJ sobre el porcentaje de solubilidad %S.

Tabla C6.

Resultados del ANOVA del efecto de los %PJ sobre %S de los filmes.

	Grados de libertad	SC	CM	F₀	F_{crit}
Tratamiento	4	110,66	27,66		
Error	5	13,42	2,68	10,31	5,19
Total	9	124,08			

Al comparar el estadístico de prueba, con el valor crítico para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), se observa que $F_0 > F_{crit}$, lo que indica que existen diferencias significativas entre el valor de %S de cada formulación a diferentes concentraciones de PJ. En consecuencia, al efectuar el método Tukey, se conoció entre cuales tratamientos existen dichas diferencias. (Resultados en la sección 3.2- Tabla 5).

Espesor (e)

Efecto del %PJ sobre el Espesor (e).

Tabla C7.

Resultados del ANOVA del efecto de los %PJ sobre ϵ de los filmes.

	Grados de libertad	SC	CM	F₀	F_{crit}
Tratamiento	4	0,05	0,01		
Error	45	0,04	0,0008	13,86	2,84
Total	49	0,09			

Al comparar el estadístico de prueba, con el valor crítico para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), se observa que $F_0 > F_{crit}$, lo que indica que existen diferencias significativas entre el valor de (ϵ) de cada formulación a diferentes concentraciones de PJ. En consecuencia, al efectuar el método Tukey, se conoció entre cuales tratamientos existen dichas diferencias. (Resultados en la sección 3.3- Tabla 6).

Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)

Efecto del %PJ sobre la Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA).

Tabla C8.

Resultados del ANOVA del efecto de los %PJ sobre PVA de los filmes.

	Grados de libertad	SC	CM	F₀	F_{crit}
Tratamiento	4	0,07	0,02		
Error	5	0,03	0,006	3,02	5,19
Total	9	0,10			

Al comparar el estadístico de prueba, con el valor crítico para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), se observa que $F_0 < F_{crit}$, lo que indica que no existen diferencias significativas entre los valores de PVA de las películas a diferentes concentraciones de PJ. Es decir, se acepta la

hipótesis nula que plantea que el %PJ no tiene efecto sobre la variable de respuesta, en este caso, PVA.

Ángulo de Contacto:

Efecto del %PJ sobre el Ángulo de contacto (AC).

Tabla C9.

Resultados del ANOVA del efecto de los %PJ sobre AC de los filmes.

	Grados de libertad	SC	CM	F₀	F_{crit}
Tratamiento	4	927,23	231,81		
Error	15	697,44	46,49	4,99	3,06
Total	19	1624,67			

Al comparar el estadístico de prueba, con el valor crítico para un nivel de confianza del 95% ($\alpha=0,05$), se observa que $F_0 > F_{crit}$, lo que indica que existen diferencias significativas entre el valor de AC de cada formulación a diferentes concentraciones de PJ. En consecuencia, al efectuar el método Tukey, se conoció entre cuales tratamientos existen dichas diferencias. (Resultados en la sección 3.4- Tabla 7).