

Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica



“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIOXIDANTE DE UNA BIOPELÍCULA ELABORADA CON ACEITE DE MUÑA (*Minthostachys mollis*) Y QUITOSANO OBTENIDO DE EXOESQUELETO DE CAMARÓN DE RÍO (*Cryphiops caementarius*)”

Tesis presentada por los Bachilleres:

Meza Elguera Naysha Yamelit

Ticona Borja Danitza Daryl

Para optar el Título Profesional de:

Ingeniero Biotecnólogo

Asesor:

Dr. Hugo Jiménez Pacheco

Arequipa-Perú

2021

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°.20190000014408

N° Trámite en Fac. 430-2019
Fecha Recep. Fac. 22-04-2019

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **MEZA ELGUERA, Naysa Yamelli**
TICONA BORJA, Danitza Daryl

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

"ELABORACION DE UNA BIOPELICULA CON PROPIEDADES ANTIMICROBIANAS Y ANTIOXIDANTES USANDO EXTRACTO DE ACEITE DE *Mimthostachys mollis* (Muña) A PARTIR DE QUITOSANO OBTENIDO MEDIANTE CASCARA DE *Cryphiops caementarius* (Camarón de río) POR METODO COMBINADO (BIOLOGICO-QUIMICO)"

DICTAMINADORES: *Ing. Cinthia Córdova Barrios* 2) *Ing. Eugenia Zeballos de Zenteno*

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis presentado por la recurrente, cumplimos con informar que se ha revisado, formulado las observaciones y corregido, sugiriendo cambiar el título a: "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIOXIDANTE DE UNA PELÍCULA ELABORADA CON EXTRACTO DE ACEITE DE *Mimthostachys mollis* (Muña) Y QUITOSANO OBTENIDO MEDIANTE CASCARAS DE *Cryphiops caementarius* (CAMARON DE RIO)" luego de lo cual consideramos que se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

FIRMAS: *Cinthia Córdova Barrios* *Eugenia Zeballos de Zenteno*

FECHA 22/04/19

ASESOR: *Dr. Hugo Jiménez Pacheco*

DICTAMEN ASESORÍA:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuar las observaciones, considero que el título debe cambiar a: "EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO Y ANTIOXIDANTE DE UNA BIOPELICULA ELABORADA CON ACEITE DE MUÑA (*Mimthostachys mollis*) Y QUITOSANO OBTENIDO DE EXOSQUELETO DE CAMARON DE RIO (*Cryphiops caementarius*)" y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

FIRMA *Hugo Jiménez Pacheco*

FECHA 16/03/2021

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) *Mgter. Cinthia Cordova Barrios*
- 2) *Mgter. Ivan Paz Aliaga*
- 3) *Mgter. Jaime Barreda del Carpio*

DICTAMEN FINAL:

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación hemos procedido a revisar el Borrador de Tesis presentado por las recurrentes, luego de lo cual y habiéndose cumplido con las correcciones respectivas, consideramos que el presente Trabajo de Investigación se encuentra APTO para continuar con el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.
Atentamente

FIRMA *Cinthia Córdova Barrios* *Ivan Paz Aliaga* *Jaime Barreda del Carpio*

FECHA 13/07/2021

JURADOS: PRESIDENTE
VOCAL
SECRETARIO

FECHA

HORA

LOCAL

FIRMA DEL DECANO

FECHA

AGRADECIMIENTOS

A Dios por estar siempre guiando mis pasos y dándome la motivación necesaria para seguir adelante.

A mi madre Manuela, por su apoyo y amor incondicional que me acompañó en este camino y sueño de ser Ingeniera y no dejar que me rinda. A mi padre Isaías por siempre apoyarme en cada decisión y mis hermanos Jader, Roy y Meryl, por apoyarme durante toda mi carrera y mi vida.

A mí adorada abuela Fidelia, por su amor a distancia y creer en mí ni en lo grande que podía llegar a ser.

Además, quiero agradecer a todas las personas que nos ayudaron a lograr que este trabajo de investigación llegue a consumar; al equipo de INNOVERGY en especial al Doctor Hugo Jiménez y a todos los demás que nos apoyaron en diversas fases del trabajo.

Naysha

Agradezco a Dios por la oportunidad que me da cada día para cumplir cada uno de mis anhelos en especial este trabajo que representa la perseverancia y amor por la ciencia, la cual me convence cada día que estoy en el camino correcto.

Agradezco especialmente a mi familia quienes siempre están ahí para apoyarme y motivarme en cada uno de mis objetivos; ellos son mis principales pilares de mi vida.

También estoy muy agradecida por las personas “especiales” que Dios puso en mi camino, aquellos que siempre estuvieron para alentarme y darme el consejo indicado en cada una de mis dificultades además de siempre preocuparse por el avance de este proyecto.

Gracias al Instituto INNOVERGY por su apoyo.

Danitza

ÍNDICE

RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	xv
OBJETIVO GENERAL	xvii
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	xvii
HIPÓTESIS	xviii
VARIABLES E INDICADORES	xviii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO	1
1. QUITINA Y QUITOSANO.....	1
1.1. Estructura Química	1
1.2. Propiedades	2
1.3. Fuentes de Quitina y Quitosano.....	3
1.4. Fuentes de Quitina y Quitosano a partir de desechos de crustáceos.....	5
2. CAMARÓN DE RÍO “CRYPHIOPS CAEMENTARIUS”.....	7
3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO.....	8
3.1. Método Químico.....	9
3.1.1. Desproteínización química.....	9
3.1.2. Desmineralización química.....	10
3.1.3. Decoloración.....	10
3.2. Método Biológico.....	10
3.2.1. Desproteínización enzimática.....	10

3.2.2. <i>Fermentación</i>	11
4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA.....	13
5. MUÑA (<i>Minthostachys mollis</i>)	13
5.1. <i>Taxonomía de Muña (Minthostachys mollis)</i>	14
5.2. <i>Composición Química De La Muña (Minthostachys Mollis)</i>	14
6. ACEITE ESENCIAL	15
7. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES.....	15
7.1. <i>Destilación por Arrastre de Vapor</i>	16
8. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA MUÑA (<i>Minthostachys mollis</i>)	17
8.1. <i>Mecanismo de acción del Aceite Esencial de la Muña (Minthostachys mollis) sobre los Microorganismos.</i>	18
9. ANTIOXIDANTES EN LA MUÑA (<i>Minthostachys mollis</i>)	19
10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH.....	20
11. BIOPELÍCULAS DE QUITOSANO.....	21
CAPÍTULO II	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
2.1. MATERIALES	22
2.2. METODOLOGÍA	24
2.2.1. <i>Extracción de quitina a partir de exoesqueletos de camarón por fermentación láctica</i>	24
2.2.2. <i>Obtención de quitosano a partir de quitina extraída de exoesqueletos de camarón</i>	28
2.2.3. <i>Extracción de aceite esencial de Muña (Minthostachys mollis) por destilación de arrastre de vapor</i>	30

2.2.4. <i>Elaboración de biopelículas compuestas de quitosano y aceite esencial de Muña (Minthostachys mollis)</i>	34
2.2.5. <i>Evaluación del efecto antimicrobiano y antioxidante de las biopelículas.</i>	35
CAPÍTULO III	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
3.1. <i>Extracción de quitina a partir de exoesqueletos de camarón por fermentación láctica</i>	42
3.2. <i>Obtención de quitosano a partir de quitina extraída de exoesqueletos de camarón</i>	43
3.3. <i>Extracción de aceite esencial de Muña (Minthostachys mollis) por destilación de arrastre de vapor</i>	49
3.4. <i>Elaboración de biopelículas compuestas de quitosano y aceite esencial de Muña (Minthostachys mollis)</i>	52
3.5. <i>Evaluación del efecto antimicrobiano por halos de inhibición y el efecto antioxidante por el método de DPPH de las biopelículas.</i>	53
CONCLUSIONES	66
RECOMENDACIONES	67
BIBLIOGRAFIA	68
ANEXOS	81

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura química de Quitina (a) y quitosano (b) y sus relaciones estructurales¹¹.....	2
Figura 2. Fuentes de Quitina¹².....	4
Figura 3. Estructura de las fibrillas de Quitina en las conchas de cangrejo¹².....	5
Figura 4. Representación de las nanofibrillas de quitina-proteína⁷.....	7
Figura 5. Diagrama general del proceso de extracción de quitina para quitosano, tanto biológico como químico¹².....	8
Figura 6. Extracción de aceite esencial por método de destilación por arrastre de vapor²⁸.....	17
Figura 7. Método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)⁴⁶.....	20
Figura 8. Exoesqueletos lavados antes de ser llevados a la estufa.	25
Figura 9. Licuadora para la trituración de los exoesqueletos (a y b), tamizaje de exoesqueletos de camarón (c).	25
Figura 10. Vaso de acero inoxidable (a), Tapa de vaso (b), canastilla (c).	26
Figura 11. Obtención de Suero de Leche.	26
Figura 12. Sistema de Fermentación.	27
Figura 13. Acidez titulable de la muestra de licor.....	28
Figura 14. Muestra fermentada antes de la desacetilación.	29
Figura 15. Muña (<i>Minthostachys mollis</i>) seca.....	31
Figura 16. Destilador por arrastre de vapor de agua escala laboratorio.....	31
Figura 17. Contenedor hermético (muestra vegetal) del equipo de destilación por arrastre de vapor de agua escala laboratorio.....	32
Figura 18. Obtención del aceite esencial de Muña (<i>Minthostachys mollis</i>) por destilación de arrastre de vapor de agua escala laboratorio.....	33
Figura 19. Elaboración de biopelícula de quitosano con aceite de Muña; solución de quitosano en ácido acético (a), mezcla de solución con aceite esencial de Muña (b).....	34
Figura 20. Biopelícula de quitosano con aceite esencial de Muña (<i>Minthostachys mollis</i>)	35
Figura 21. Proceso de preparación de Inóculo bacteriano (Elaboración propia).	36

Figura 22. Comparación del inóculo bacteriano <i>Escherichia coli</i> (izquierda) con la solución 0.5 Mc. Farland (derecha).	36
Figura 23. Inoculación en placa por la técnica de difusión en agar.	37
Figura 24. Preparación de discos de biopelículas para prueba de sensibilidad. 38	
Figura 25. Procedimiento de la prueba de sensibilidad con biopelículas de quitosano con aceite de Muña (a) y resultado de la colocación del disco (b).....	38
Figura 26. Muestra de biopelícula sometido al vortex para su disolución.....	39
Figura 27. Adición de las muestras diluidas en las cubetas para el espectro.	40
Figura 28. Muestras después de ser llevadas al espectrofotómetro.....	41
Figura 29. Cubetas trabajadas después del espectro.	41
Figura 30. Espectros vistos en el FTIR (a) quitosano comercial y (b) quitosano sintetizado.	47
Figura 31. Solución de biopelícula fresca a las 0 horas (a), solución de biopelícula pasada las 12 horas a temperatura ambiente (b), solución de biopelícula pasada las 24 horas a temperatura ambiente (c).....	52
Figura 32. Biopelículas de quitosano con concentraciones de aceite esencial de muña (1%, 2% y 3%) frente a la cepa bacteria de <i>Escherichia coli</i>	55

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química en porcentaje v/v en base seca del exoesqueleto de crustáceos¹⁴.	6
Tabla 2. Composición proximal de la muña en 100 g de materia seca²⁴.	15
Tabla 3. Componentes mayoritarios destacados en el Aceite Esencial (AE) de Muña (<i>Minthostachys mollis</i>)²³.	18
Tabla 4. Curva estándar de Trolox para DPPH⁶².	40
Tabla 5. Resultados por horas del aumento en la producción de Ac. Láctico y disminución de pH.	42
Tabla 6. Porcentaje de desmineralización.	43
Tabla 7. Porcentaje de desproteínización.	44
Tabla 8. Porcentaje de rendimiento.	46
Tabla 9. Tabla comparativa de otros trabajos con sus respectivos parámetros.	46
Tabla 10. Porcentaje de N-acetilación.	48
Tabla 11. Grado de Desacetilación.	48
Tabla 12. Condiciones del proceso y resultados obtenidos de la extracción del Aceite de Muña (<i>Minthostachys mollis</i>)	50
Tabla 13. Rendimiento de aceite esencial de Muña (<i>Minthostachys mollis</i>)	50
Tabla 14. Comparación entre el rendimiento del aceite esencial de Muña (<i>Minthostachys mollis</i>)	51
Tabla 15. Prueba t- Student de los grupos con concentraciones de aceite de Muña al 1% y 2%.	59
Tabla 16. Prueba t- Student de los grupos con concentraciones de aceite de Muña al 2 % y 3%.	59
Tabla 17. Prueba t- Student de los grupos con concentraciones de aceite de Muña al 1 % y 3 %.	60
Tabla 18. Datos obtenidos en el espectrómetro para la construcción de la curva de calibración y controles.	61
Tabla 19. Tabla de resultados del promedio del porcentaje de inhibición de las biopelículas	62
Tabla 20. Resumen Estadístico para Actividad antioxidante.	63
Tabla 21. Resumen Estadístico para Actividad antioxidante.	64

Tabla 22. ANOVA para Actividad antioxidante por Concentración de muña. .64



RESUMEN

La protección y preservación de productos alimenticios representa una de las características fundamentales para la extensión de su vida útil, lo que conlleva a la producción de recubrimientos o envasados; con la finalidad de mantener y proteger sus propiedades fisicoquímicas, se hace uso de polímeros comerciales para el envasado de dichos alimentos y esto a su vez genera un aumento en la cantidad ya existente de plásticos. Por lo que se opta, en el desarrollo de recubrimientos biológicos, usando biopolímeros como la quitina junto con quitosano, su principal derivado y ambos polímeros de gran interés para la industria debido a su valorización; distinguiéndose por sus diversas propiedades y su particular obtención a partir de desechos de crustáceos y la adición de aceites esenciales para la formación de biopelículas, dándole un valor agregado en su efecto antimicrobiano y antioxidante.

Por ello en este trabajo se elaboró una biopelícula a partir de quitosano y aceite de muña, usando los exoesqueletos de *Cryphiops caementarius* (camarón de río) obtenidas de las zona de Corire de la región Arequipa; las cuales fueron sometidas a un proceso de fermentación láctica mediante el uso de suero de leche y su suplementación con glucosa al 10 % por 4 días a una temperatura constante de 37 °C, para su parcial desproteínización en un 33 % y principalmente su desmineralización en un 94 %; posterior a ello se realizó el proceso desacetilación de quitina a quitosano con NaOH al 60 % p/v en una relación 1:15 durante 1 hora a 90 °C.

Al final del procedimiento se hizo un análisis FTIR del quitosano procesado en comparación con la muestra de quitosano comercial, cuyos espectros resultaron similares además de obtener un grado de desacetilación del 80.84 %, lo cual indica que mediante un método combinado es posible obtener quitosano con grado de pureza aceptable.

Para la extracción del aceite esencial de muña se usó un proceso de destilación por arrastre de valor, obteniendo un rendimiento del 0.48 % de aceite y así poder llevar a cabo la producción de biopelículas y su posterior evaluación antimicrobiana con diferentes concentraciones de aceite en la biopelícula (1 %, 2 % y 3 %) frente a la cepa bacteria de *Escherichia coli* mostrando un mejor halo de inhibición a una concentración del 3 %.

Así mismo se evaluó su efecto antioxidante en las biopelículas con diferentes concentraciones de aceite ya antes mencionada, por medio de DPPH y Trolox como solución patrón. De este análisis se obtuvo un valor no mayor a 3 en el % de inhibición, lo cual no muestra un efecto antioxidante, esto puede ser por diversos factores como tiempo, luz y variabilidad que afecta a la biopelícula y su efecto antioxidante. De estos resultados se hizo un análisis estadístico para ambos efectos, dando una diferencia significativa en el efecto antimicrobiano, por lo que con un análisis de T-student reportó una diferencia significativa menor ($p < 0.05$). En relación al efecto antioxidante no se reportó diferencia significativa.

Por lo tanto, se logró una óptima extracción de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón para el desarrollo de biopelículas en combinación con aceite de muña; mostrando así su efecto antimicrobiano.

Palabras clave: *Biopelícula, desproteínización, desmineralización, desacetilación, FTIR, aceite esencial de muña.*

ABSTRACT

The protection and preservation of food products represents one of the fundamental characteristics for the extension of their useful life, which leads to the production of coatings or packaging; In order to maintain and protect their physicochemical properties, commercial polymers are used for the packaging of said foods and this in turn generates an increase in the existing amount of plastics. So it is chosen, in the development of biological coatings, using biopolymers such as chitin together with chitosan, its main derivative and both polymers of great interest to the industry due to their valorization; distinguishing itself by its various properties and its particular obtaining from crustacean waste and the addition of essential oils for the formation of biofilms, giving it an added value in effect its antimicrobial and antioxidant.

For this reason, in this work we elaborated a biofilm from chitosan and muña oil, using the shells of *Cryphiops caementarius* (river shrimp) obtained from the Corire area of the Arequipa region; which were subjected to a lactic fermentation process through the use of whey and its supplementation with 10 % glucose for 4 days at a constant temperature of 37 °C, for its partial deproteinization in 33 % and mainly its demineralization in 94 %; After this, the deacetylation process of chitin to chitosan was carried out with NaOH at 60 % w/v in a 1:15 ratio for 1 hour at 90 °C.

At the end of the procedure, an FTIR analysis of the processed chitosan was made in comparison with the commercial chitosan sample, whose spectra were similar in addition to obtaining a degree of deacetylation of 80.84 %, which indicates that using a combined method it is possible to obtain chitosan with an acceptable degree of purity.

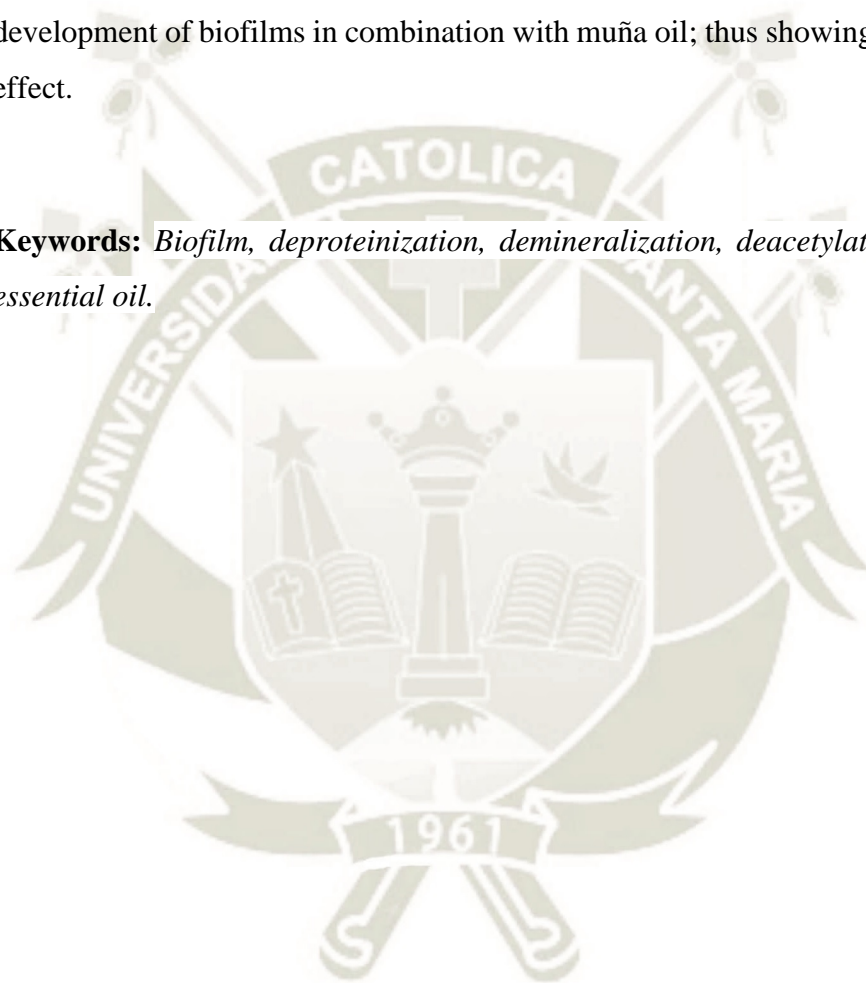
For the extraction of the essential oil of muña, a distillation process was used by dragging value, obtaining a yield of 0.48 % of oil and thus being able to carry out the production of biofilms and their subsequent antimicrobial evaluation with different concentrations of oil in the biofilm (1 %, 2 % and 3 %) against the *Escherichia coli* bacterial strain showing a better inhibition halo at a concentration of 3 %.

Likewise, we evaluated its antioxidant effect in biofilms with different concentrations of oil already mentioned, using DPPH and Trolox as a standard solution. From this analysis we obtained a value no greater than 3 in the % inhibition, which does not show an antioxidant effect, this may be due to various factors such as time, light and

variability that affect the biofilm and its antioxidant effect. A statistical analysis was made of these results for both effects, giving a significant difference in the antimicrobial effect, for which a T-student analysis was made, reporting a lower significant difference ($p < 0.05$). Regarding the antioxidant effect, no significant difference was reported.

Therefore, an optimal extraction of chitosan from shrimp shells was achieved for the development of biofilms in combination with muña oil; thus showing its antimicrobial effect.

Keywords: *Biofilm, deproteinization, demineralization, deacetylation, FTIR, muña essential oil.*



INTRODUCCIÓN

Actualmente, la investigación sobre sistemas de envasado de alimentos se ha centrado en el denominado envase activo e inteligente, tales embalajes son diseñados para que interactúe con el producto alimenticio y prolongar su vida útil. El desarrollo de estos envases alimentarios está experimentando una gran demanda de los consumidores y las tendencias del mercado, por lo que son cada vez más exigentes con respecto a la calidad de los productos que adquieren como alimentos, es así que, en la actualidad prefieren productos menos procesados (frescos), producidos bajo esquemas orgánicos y, en la medida de lo posible sin el uso de conservantes sintéticos^{1,2}.

De acuerdo con lo anterior, existe un gran interés en producir películas a partir de recursos naturales debido a la excelente biodegradabilidad, biocompatibilidad, comestibilidad y sus posibles aplicaciones. Estas películas tienen la capacidad de operar como portadores de muchos ingredientes funcionales que pueden incluir agentes de conservación como agentes antimicrobianos y antioxidantes provenientes de los aceites esenciales, aromas, especias y colorantes que mejoran la funcionalidad de los materiales de envasado agregando funciones nuevas o adicionales².

Por lo que, en los últimos diez años, el desarrollo de revestimientos basados en biopolímeros y aceites esenciales como agentes conservantes (agentes antimicrobianos y antioxidantes) para controlar el crecimiento de bacterias y hongos en frutas, verduras y hortalizas se ha convertido en un tratamiento alternativo prometedor para diversos alimentos^{3,4}.

El quitosano es un polisacárido aminado proveniente de la quitina que se encuentran en los caparazones de los crustáceos⁵, el cual es considerado como un biopolímero ideal para la producción de películas activas debido a su no toxicidad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y capacidad de formación de películas³. Siendo un biopolímero prometedor para el envasado de alimentos activos, la adición de un aceite esencial en una película de quitosano mejoraría la seguridad alimentaria y la vida útil de los alimentos.

Los aceites esenciales de algunas especies vegetales tales como Muña (*Minthostachys mollis*), se han reportado como poseedoras de características antimicrobianas y antioxidantes, las cuales la hacen una especie promisoría para su potencial uso en

control de plagas en el sector agrícola, actividades farmacéuticas y la preservación de los alimentos para evitar la proliferación de microorganismos causantes de enfermedades⁶.

Es debido a esto que el presente estudio plantea el uso de una biopelícula elaborada a partir de quitosano extraído de exoesqueletos de camarón y aceite esencial de Muña con el propósito de evaluar el efecto antimicrobiano y antioxidante frente a la cepa bacteriana *Escherichia coli*, causante de enfermedades gastrointestinales transmitidas por ingesta de alimentos.



OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antimicrobiano y antioxidante de una biopelícula elaborada con aceite esencial de Muña (*Minthostachis mollis*) y quitosano obtenido mediante exoesqueletos de Camarón de río (*Cryphiops caementarius*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extraer quitina a partir de los exoesqueletos de camarón por fermentación láctica
2. Obtener quitosano a partir de quitina extraída de exoesqueletos de camarón
3. Extraer aceite esencial de Muña (*Minthostachis mollis*) por destilación de arrastre de vapor
4. Elaborar biopelículas compuestas de quitosano y aceite esencial de Muña
5. Evaluar el efecto antimicrobiano por halos de inhibición y el efecto antioxidante por el método de DPPH de las biopelículas.

HIPÓTESIS

Dado que el quitosano tiene polímeros con potencial para la producción de biopelículas y el aceite esencial de muña posee propiedades antioxidantes y antimicrobianas, es probable que al combinarlas se elabore una biopelícula biodegradable con propiedades antimicrobianas y antioxidantes.

VARIABLES E INDICADORES

Variable Independiente	Indicador
Biopelícula (compuesta de quitosano y aceite esencial de muña)	Proporción de quitosano 2 % con aceite esencial de muña al 1 %, 2 % y 3 %
Variable Dependiente	Indicador
Efecto antioxidante	Unidades de Trolox (TE)
Efecto antimicrobiano	Halo de inhibición (mm)

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. QUITINA Y QUITOSANO.

La quitina se aisló por primera vez en el año 1811 por Henri Braconnot, de unas setas (hongos) mediante un tratamiento alcalino, quedando un residuo al cual denominó “fungina”, años más tarde se aísla de los caparazones de crustáceos y recibe el nombre de quitina derivado del griego “chitón” que significa túnica o cobertura⁷.

El quitosano es el único biopolímero que se produce por la desacetilación de Quitina, la cual es un biopolímero natural derivado de crustáceos, hongos e insectos. Dichos biopolímeros suelen llamarse biológicamente sustancias activas del siglo XXI, debido a su amplia aplicabilidad además de que la quitina es el segundo biopolímero natural más abundante en muchos organismos. La quitina comercial se deriva principalmente de pocos organismos como cangrejos, camarones y Kri^{8, 9, 10}.

1.1. Estructura Química

La quitina y el quitosano son polisacáridos lineales con un número variable de unidades 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa (glucosamina) y su derivado N-acetilado en forma de piranosa, conectado por enlaces glucosídicos 1-4. La quitina derivada de fuentes naturales contiene entre 5-10 % de 2-amino-2-deoxy- β -D-glucosa. Su estructura es muy similar a la celulosa, por la cantidad de mil unidades de β -(1-4)D-glucosa unidas que presenta. El hidroxilo en la posición C-2 de la celulosa ha sido reemplazado por un grupo acetamida. El quitosano, β -(1-4) unido a 2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa, es un derivado N-desacetilado de quitina obtenida al transformar los grupos acetamida en grupos amino primarios, como se ve en la Figura 1. Otro aspecto que se observa en su estructura es la desacetilación de la quitina, la cual nunca se completa y el quitosano o quitina desacetilada aún contiene grupos acetamida, lo que la diferencia de la celulosa, ya que tanto quitina como quitosano contienen entre 5-8 % de nitrógeno, en la quitina es en forma de grupos de amina acetilada y en quitosano está en forma de grupos de amina alifática primaria, en consecuencia, hace que sean adecuados para las reacciones típicas de las aminas. Sin embargo, el

quitosano es químicamente más activo que la quitina debido a la presencia de grupos hidroxilo primarios y secundarios en cada unidad repetida, y el grupo amina en cada unidad desacetilada. Estos grupos reactivos pueden fácilmente sufrir modificaciones químicas para alterar las propiedades mecánicas y físicas del quitosano. La presencia de grupos amino de quitina y quitosano representa una ventaja ya que pueden permitir funciones biológicas distintas, así como la aplicación de reacciones de modificación¹¹.

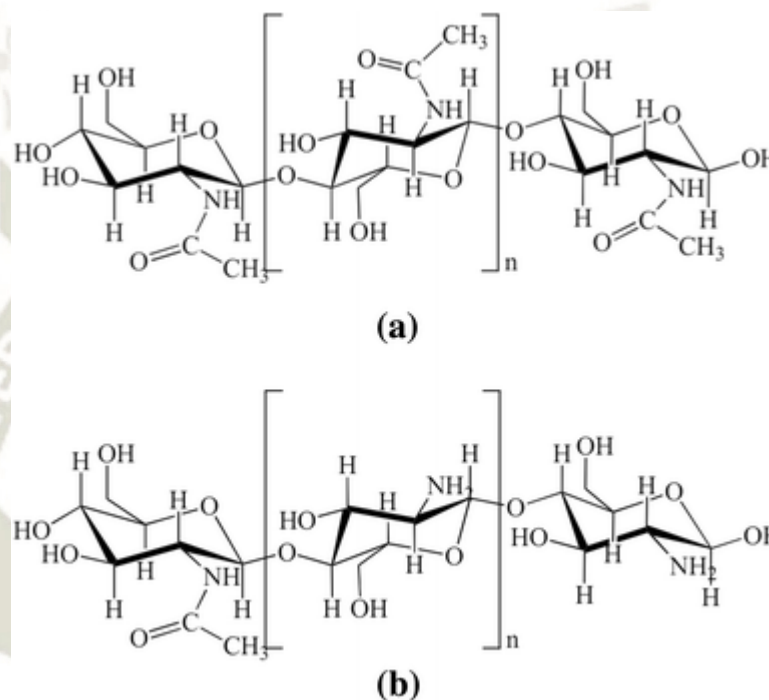


Figura 1. Estructura química de Quitina (a) y quitosano (b) y sus relaciones estructurales¹¹.

Cabe resaltar que en la desacetilación de quitina el acetato de iones y un $-NH_2$ grupo se producen a través de la hidrólisis del grupo acetamida como ya se mencionó anteriormente. La proporción de glucosamina y N-acetilglucosamina generalmente define el grado de desacetilación en el quitosano. El mayor porcentaje de N-acetilglucosamina que la glucosamina se encuentra en la quitina, mientras que el porcentaje de glucosamina es mayor que la N-acetilglucosamina en el quitosano¹².

1.2. Propiedades

Las excelentes propiedades tanto de quitina como quitosano en su biocompatibilidad, biodegradabilidad, bioactividad, bioreabsorción, no toxicidad y sus propiedades de

absorción los hacen materiales muy adecuados y esenciales para la industria como alternativa en polímeros sintéticos. Representan una gran variedad de propiedades debido a su alta densidad de carga, los grupos hidroxilo y amino reactivos, así como la capacidad de enlace hidrógeno y la estructura química única como polimerización lineal. La combinación de características fisicoquímicas y biológicas versátiles permite su aplicabilidad e interés industrial¹¹.

La quitina al ser un compuesto nitrogenado, en su estado puro tiene un aspecto blanco, inodoro e insípido, presenta propiedades biocompatibles y biodegradables además de ser hidrófoba, a ello se le debe su insolubilidad en agua y otros solventes orgánicos, esto se debe a las fuerzas intermoleculares producidas por enlaces puentes hidrógeno, ocasionando que el material sea más rígido; a diferencia del quitosano que, si es soluble en agua debido a la formación de cargas positivas en las funciones amino, está solubilidad depende de la cantidad de grupos amino que se encuentren libres y sean susceptibles a la protonación que está relacionado al grado de desacetilación del quitosano. El grado de desacetilación influye en propiedades químicas como: resistencia a la tracción, solubilidad, área superficial, viscosidad, conductividad, porosidad y flexibilidad. Al igual en propiedades biológicas como: potenciador de absorción, biodegradabilidad, antioxidante, biodisponibilidad y biocompatibilidad. Según sean las condiciones del proceso. Estas propiedades facilitan el trabajo, por ello se utiliza mucho en diferentes campos de la industria. Cabe resaltar que el quitosano tiende a ser insoluble en soluciones acuosas de pH neutro y alcalino, también es soluble en soluciones de ácido acético, fórmico, málico, entre otros^{7,12}.

1.3. Fuentes de Quitina y Quitosano

De forma natural la quitina está presente como una red cristalina de microfibrillas, con 3 diferentes formas: α -quitina, β -quitina e γ -quitina, que varían de acuerdo a su grado de desacetilación. De ellas la α -quitina es la más estable, presente en las conchas de crustáceos como: camarones, langostas, tendones, caparazones de cangrejos langostas y krill además de levaduras, paredes celulares de hongos y cutículas de insectos, en α quitina, las cadenas de polisacáridos están dispuestas en orientación antiparalela lo que permite enlaces máximos (Figura 2 y Figura 3). Por lo tanto, la α quitina es la forma más estable de quitina en la naturaleza, lo que da como resultado fibrillas de quitina

con un alto índice de cristalinidad (80 %) y la responsable de la estructura resistente que presentan los diferentes organismos. La β quitina es menos estable, se encuentra generalmente en corrales de calamar y en los tubos sintetizados por el gusano vestimentífero y el pogonóforo. También ocurre en afrodita chaetae y en lorica producida por algunos protozoos o algas marinas. En la columna monocristalina, se ha descubierto que *Thalassiosira fluviatilis* excreta una forma más pura de β quitina, una diatomea. En la β -quitina, las cadenas de polímero están dispuestas en orientación paralela y el índice de cristalinidad de las fibrillas de quitina es de alrededor del 70 %. La mayor distancia entre las cadenas de polímero adyacentes hace que esta forma sea más reactiva y fácilmente soluble en solventes. γ -quitina es la combinación de orientación de tipo α y β quitina en la que dos cadenas poliméricas paralelas están dispuestas alternativamente con una cadena antiparalela. Teniendo una forma menos común, se encuentra en los capullos de algunas especies de escarabajos^{7,12}.

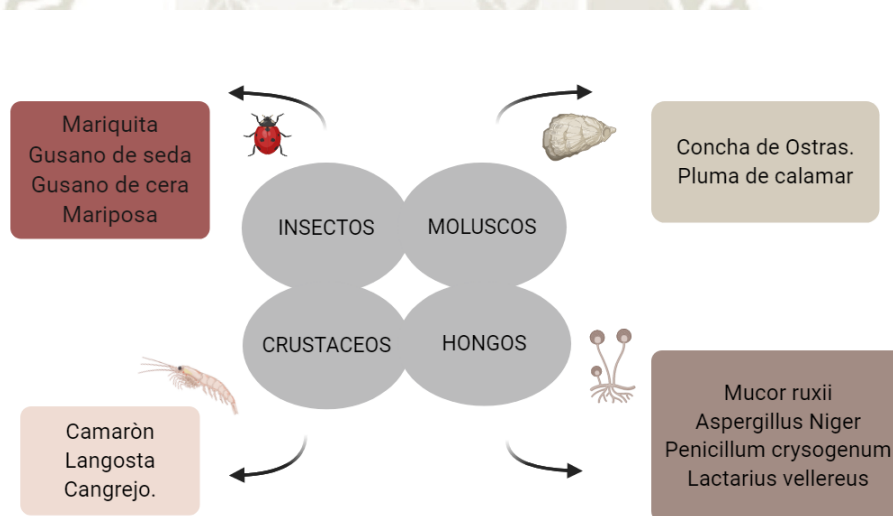


Figura 2. Fuentes de Quitina¹².

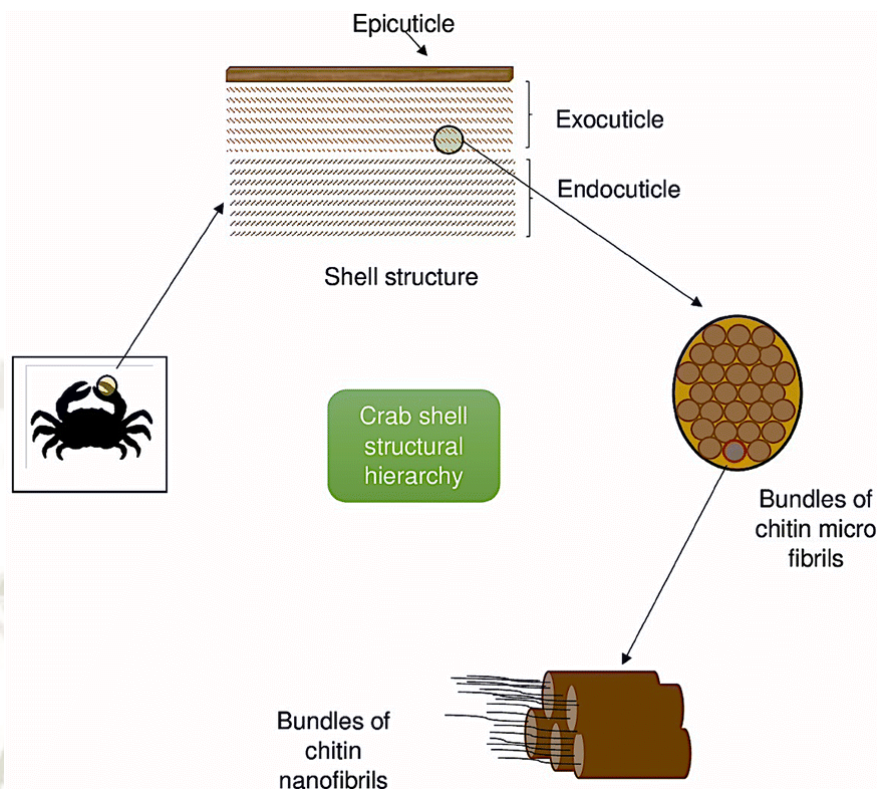


Figura 3. Estructura de las fibrillas de Quitina en las conchas de cangrejo¹².

1.4. Fuentes de Quitina y Quitosano a partir de desechos de crustáceos.

Los crustáceos son artrópodos mandibulados, que cuentan con dos pares de antenas, cinco pares de patas, un par de mandíbulas, respiración branquial y el cuerpo generalmente dividido en dos partes denominadas cefalotórax y abdomen. Dependiendo de la especie, el porcentaje de quitina varía entre el 2 % y 12 % del peso total. En muchos de estos organismos la quitina está impregnada de sales (carbonato de calcio) para ser más resistente correspondiente al cefalotórax, que es desechado, ya que parte del 50 % es comestible, por lo que la cantidad de residuos pueden llegar a grandes volúmenes. Para la obtención de quitina solo se utiliza su exoesqueleto, conteniendo entre el 14 % y 35 % de α -quitina, el resto de componentes varían entre proteínas formando parte del tejido conectivo, además entre 13 - 58 % carbonatos y fosfatos de calcio entre un 20 - 72 %, también podemos encontrar en una menor cantidad lípidos (0.8 - 12 %), pigmentos y otras sales metálicas. El contenido de sales minerales va a depender del ciclo reproductivo y edad del crustáceo, como también las especies más ancianas presentan un exoesqueleto más descalcificado y con menos cantidad de quitina. La presencia de algunos lípidos se debe a pequeños residuos de

músculos y vísceras. Cada crustáceo presenta diferentes cantidades de porcentajes como se puede ver en la (Figura 4 y 5)¹³.

A continuación, en la Tabla 1 se muestra la composición química en porcentaje v/v en base seca de los exoesqueletos de los crustáceos.

Tabla 1. Composición química en porcentaje v/v en base seca del exoesqueleto de crustáceos¹⁴.

FUENTE DE QUITINA	PROTEÍNAS	QUITINA	CENIZA	LÍPIDOS	
Cangrejo	<i>Collinectes sapidus</i>	25.1	13.5	58.3	2.1
	<i>Chionoecetes opilio</i>	29.2	26.6	40.6	1.3
	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	22	31	46	1
Camarón.	<i>Pandalus borealis</i>	41.9	17	34.2	5.2
	<i>Cragon cragon</i>	40.6	17.8	27.5	9.9
	<i>Penaeus monodon</i>	47.4	40.4	23	1.3
Langosta	<i>Procamponus clarkii</i>	29.8	13.2	46.6	5.6
Krill	<i>Euphausia superba</i>	41	24	23	11.6
Gamba	-	61.6	33	29.4	1.4

La estructura de los crustáceos, presenta algunas capas, una capa no celular, que es secretada por la epidermis, formando una estructura de varios niveles. En el nivel molecular, está la quitina, presenta una alineación antiparalela de estructuras altamente cristalinas. En el siguiente nivel se encuentran moléculas de quitina ligadas en la periferia a proteínas globulares, formando estrechas unidades llamadas nanofibrillas.

Estas nanofibrillas de quitina-proteína, se encuentran agrupadas en racimos, que a su vez forman capas planas horizontales y paralelas de fibrillas que cambian de dirección de un plano a otro en continua rotación. Este complejo termina formando una red que agrupa a la quitina y la proteína con minerales de carbonato cálcico y lípidos. También contiene diferentes compuestos como luteína, β -carotenos, etc. La Figura 4 muestra una representación de las nanofibrillas de quitina-proteína⁷.

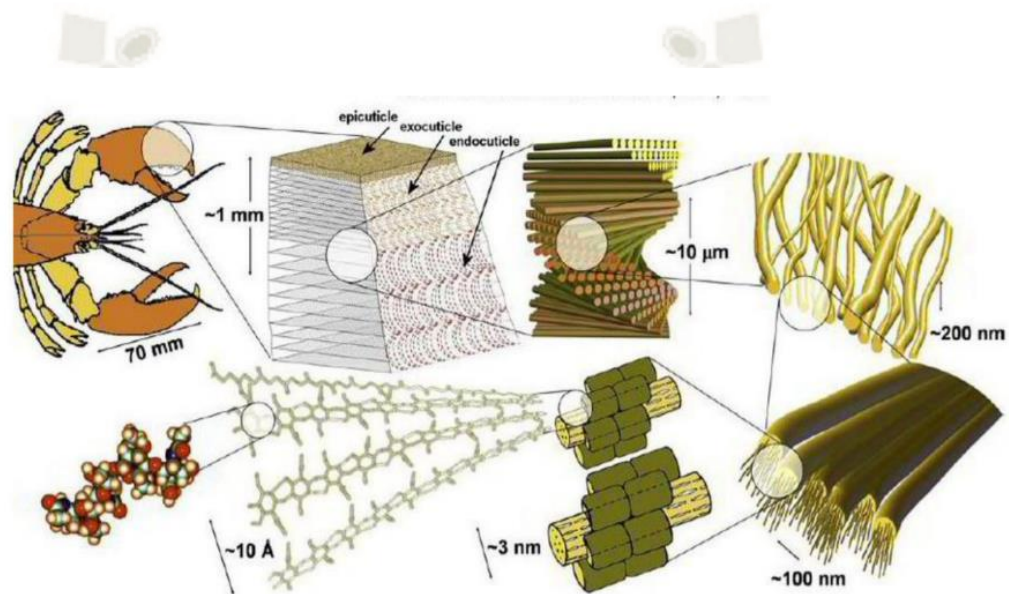


Figura 4. Representación de las nanofibrillas de quitina-proteína⁷.

2. CAMARÓN DE RÍO “*CRYPHIOPS CAEMENTARIUS*”

El camarón de río, es el principal recurso hidrobiológico de los cuerpos de agua de la vertiente occidental de los Andes del Perú, involucra a los géneros *Cryphiops*, *Macrobrachium*, *Palaemon* y *Atya*; siendo *Cryphiops caementarius* la especie mayoritaria (o más abundante), base de una importante pesquería artesanal en los ríos de la costa sur del Perú y norte de Chile¹⁵.

La composición corporal que incluye la humedad, grasa, proteínas y cenizas, son indicadores del buen estado fisiológico de un organismo. Cuanto mayor sea el contenido de lípidos y proteínas, mayor será su densidad energética. De un estudio se concluyó que la especie *Cryphiops caementarius* posee un buen estado fisiológico entre sus ejemplares silvestres señalándole como una especie notable de proteínas¹⁶.

3. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE QUITINA Y QUITOSANO.

Los parámetros y condiciones de extracción regulan numerosas características de la quitina purificada como el peso molecular, el grado de desacetilación, la pureza y el índice de polidispersidad. Todas estas características influyen principalmente en la aplicación de quitina en innumerables reinos. Aunque la extracción química es un proceso ecológico y antieconómico que afecta negativamente las propiedades físicas y químicas de la quitina y elimina minerales y proteínas, es el método más comúnmente aplicado a escala comercial. Por eso el proceso de extracción de quitina a partir de recursos naturales y su conversión en quitosano, es uno de los más estudiados (Figura 5)¹².

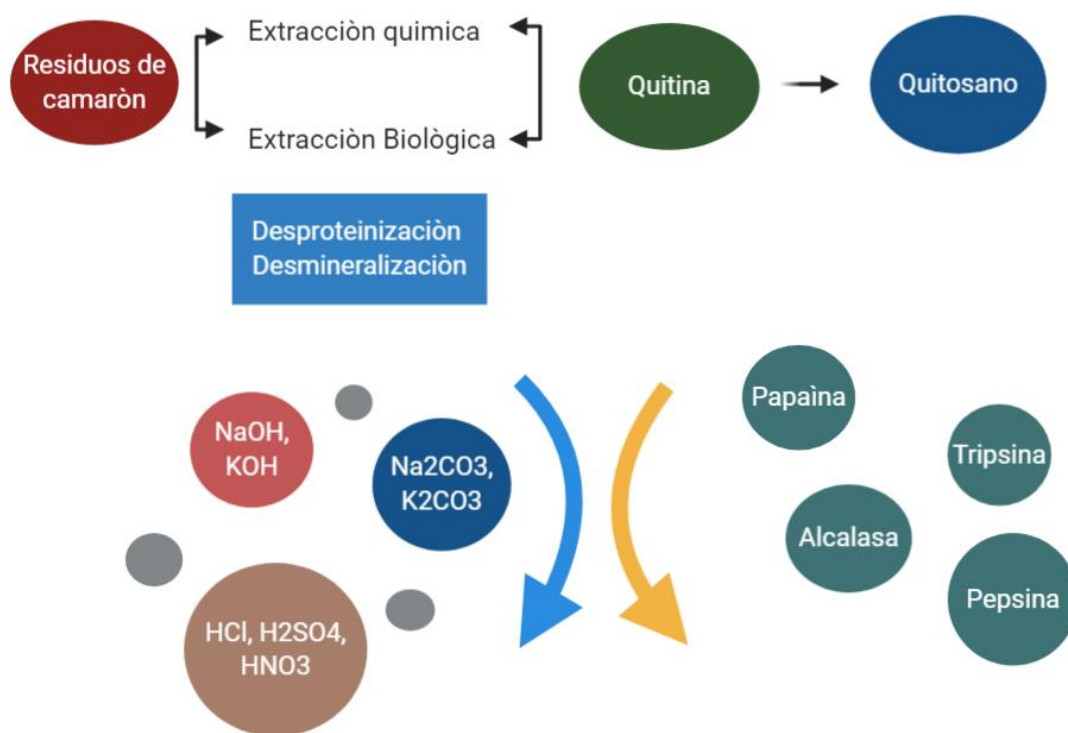


Figura 5. Diagrama general del proceso de extracción de quitina para quitosano, tanto biológico como químico¹².

La extracción de quitina de los mariscos comprende la desproteínización para eliminar las proteínas y la desmineralización para eliminar el carbonato de calcio inorgánico de los exoesqueletos. Los camarones tienen una pared de caparazón más delgada que las langostas y los cangrejos, por lo que la eficiencia de extracción es más alta utilizando desechos de camarones en comparación con otros desechos de crustáceos.

Tratamientos químicos y enzimáticos se utilizan para obtener quitina, sin embargo, la desproteínización química con hidróxido de sodio (NaOH) da como resultado la desacetilación parcial de la quitina y la hidrólisis del biopolímero, lo que reduce su peso molecular también se ha informado que la desmineralización química con ácido clorhídrico diluido (HCl) da como resultado quitina con un alto contenido de cenizas residuales y degradación del polímero además las altas temperaturas y concentraciones de ácido altas en tratamientos químicos han dado lugar con frecuencia en la desacetilación de la quitina y despolimerización por lo tanto se prefieren los tratamientos biológicos para preservar la estructura de quitina con un alto grado de desacetilación y el peso molecular, mientras que esté libre de proteínas y minerales. Se requiere una menor entrada de solvente en la extracción biológica de quitina, lo que resulta en una manipulación más simple, menor consumo de energía y mayor reproducibilidad en un tiempo de respuesta más corto. Esto, a su vez, también conduce a que se descarguen subproductos químicos menores en el efluente de aguas residuales. Además de que al usar ácido láctico de la fermentación de láctica y enzimas proteolíticas; elimina con éxito el carbonato de calcio y las proteínas y extrae la quitina de manera eficaz durante la fermentación de desechos de exoesqueletos¹⁷.

3.1. Método Químico.

Los métodos de extracción química incluyen tres pasos: desproteínización, desmineralización y decoloración.

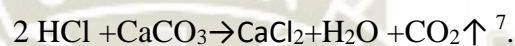
3.1.1. Desproteínización química

La etapa de desprotección incluye la ruptura de los enlaces químicos entre las proteínas y la quitina, lo que implica el uso de productos químicos para despolimerizar el biopolímero. Para uso biomédico, la eliminación de proteínas es principalmente importante, ya que el contenido de proteínas es el principal culpable de provocar alergia a la población humana. El primer enfoque utilizado en la desprotección fue el método químico. Se utilizó una amplia variedad de productos químicos y se probó su eficacia como reactivos de desprotección. Sin embargo, en cada estudio, las condiciones de reacción difieren ampliamente. A concentraciones que varían de 0.125 a 5.0 M, se empleó NaOH (un reactivo preferencial) a diferentes temperaturas y duración del tratamiento. El NaOH no solo conduce a la desproteínización, sino que

también da como resultado la hidrólisis del biopolímero, la caída de su peso molecular y la desacetilación parcial de la quitina¹².

3.1.2. Desmineralización química

La eliminación de minerales, principalmente carbonato de calcio, se denomina desmineralización. Por lo general, se logra mediante tratamiento con ácido utilizando ácido sulfúrico, ácido clorhídrico, ácido nítrico, ácido acético y ácido fórmico. El ácido clorhídrico es el reactivo superior entre todos estos ácidos. La desmineralización implica la descomposición del carbonato de calcio en cloruro de calcio junto con la descarga de dióxido de carbono como se muestra⁷.



3.1.3. Decoloración.

Un paso de decoloración es un paso adicional que se requiere solo si se desea un producto incoloro. Se emplean una mezcla de solventes orgánicos o acetona para eliminar pigmentos como los carotenoides. Existen otras técnicas en las que utilizan diferentes reactivos como ácido acético, acetato de sodio, pero su efectividad en la desproteínización ha sido menor^{7,12}.

3.2. Método Biológico.

El uso de procesos biológicos para la extracción de quitina está ganando una inmensa atención ya que es más limpio, ecológico y económico junto con la producción de quitina y quitosano con las propiedades deseadas. La extracción biológica de quitina ofrece una manipulación más simple, menor aporte de energía y mayor reproducibilidad en comparativamente menos tiempo y consumo de solventes. Entre los dos métodos biológicos más comúnmente utilizados para la extracción de quitina incluyen: desproteínización enzimática y fermentación usando microorganismos¹².

3.2.1. Desproteínización enzimática.

Se requieren enzimas proteolíticas como las proteasas para la eliminación de proteínas durante la extracción de quitina de los desechos de mariscos. Las plantas, los animales y los microbios son las principales fuentes de enzimas proteolíticas. Se pueden emplear varias proteasas como papaína, tripsina, pepsina, devolvasa, alcalasa y pancreatina para eliminar proteínas de los exoesqueletos y minimizar la despolimerización y

desacetilación durante el aislamiento de la quitina. La accesibilidad de las enzimas se puede modificar realizando la desprotección antes o después del paso de desmineralización. En la etapa de desprotección, se pueden usar enzimas extraídas tanto crudas como purificadas. Sin embargo, las enzimas purificadas son caras en comparación con las enzimas crudas. Las enzimas crudas se obtienen principalmente de vísceras y bacterias de pescado. Entre estas, las proteasas bacterianas son más comunes. Sin embargo, la eficiencia es menor en comparación con los procesos químicos, ya que alrededor del 5 % al 10 % de proteína restante aún permanece asociada con la quitina aislada. Podría usarse un tratamiento adicional con NaOH para tratar la quitina aislada final para aumentar su pureza. Además, el orden de desprotección y desmineralización no tiene una influencia significativa sobre el rendimiento y la cantidad del producto de quitina final en el proceso químico^{7,12}.

3.2.2. Fermentación

Al realizar la desprotección mediante el método de fermentación, se puede reducir el precio del uso de enzimas añadiendo cepas microbianas seleccionadas y microorganismos endógenos. Las cepas microbianas se pueden seleccionar mediante fermentación, que puede ser de una sola etapa, de dos etapas, fermentación sucesiva o co-fermentación¹².

3.2.2.1. Fermentación láctica.

La fermentación láctica es un proceso metabólico anaeróbico donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico. Este proceso lo realizan muchas bacterias (llamadas bacterias lácticas), hongos, algunos protozoos y en los tejidos animales. Un ejemplo de este tipo de fermentación es la acidificación de la leche. Ciertas bacterias (*Lactobacillus*, *Streptococcus*) al desarrollarse en la leche utilizan la lactosa como fuente de energía. La lactosa, al fermentar, produce energía que es aprovechada por las bacterias, y el ácido láctico es eliminado¹⁸.

Al surgir la rama de la biotecnología y estudiar la acción de los microorganismos, se sugirió definir a la fermentación como cualquier reacción bioquímica, que da como resultado un producto de interés industrial. Por ello se quiso reemplazar el término de fermentación por el de biorreacción o biotransformación, pero al hablar de fermentación láctica se relaciona directamente con formación de productos por la

intervención de las bacterias lácticas donde se va a requerir de piruvato o ácido pirúvico, obtenido por la degradación de glucosa u otros azúcares, que en la mayoría se da por glucólisis en condiciones anaeróbicas o aeróbicas en el citoplasma de las células eucariotas o procariotas. Al obtener piruvato, este puede ser metabolizado en ausencia o presencia de oxígeno, si no requiere de oxígeno entonces el piruvato entra al proceso de fermentación láctica dando ácido láctico¹⁹.

3.2.2.2. Bacterias lácticas.

Las bacterias ácido lácticas son microorganismos que generan ácido láctico como único producto de fermentación. Se caracterizan por ser Gram positivas, aerotolerantes, anaerobias facultativas, microaerófilas, no esporuladas, ácido-tolerante, de metabolismo quimioorganotrofo. En el microscopio tienen forma de cocos o bacilos, no toleran temperaturas mayores a 72 °C. Tienen diversas aplicaciones, siendo una de las principales la fermentación de alimentos como la leche, carne y vegetales, para obtener productos como yogurt, queso, encurtidos, embutidos, ensilados, entre otros. Las bacterias ácido lácticas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, para su adecuado crecimiento requieren de azúcares como glucosa y lactosa, además de aminoácidos, vitaminas y otros factores de crecimiento, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de las mismas. Las bacterias lácticas están conformadas por un amplio grupo de bacterias que metabolizan un amplio rango de azúcares. Los mayores productores de ácido láctico pertenecen a las familias *Streptococcaceae* (géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerobacter* y *Gemella*) y *Lactobacillaceae* (género *Lactobacillus*)^{18, 19}.

3.2.2.3. Suero de leche

Es la fracción de la leche no precipitada por la acción del cuajo o acide, es una fracción no caseínica y desgrasada de la leche, que se desprende espontáneamente por la presión, entre sus características se puede ver que es un líquido opalescente, amarillo verdoso debido a su elevado contenido en vitamina B2, que presenta en disolución proteínas, vitaminas, sales minerales entre otros; de la leche representa el 90 % conteniendo la mayor parte de compuestos hidrosolubles¹³.

El suero de leche es el subproducto más abundante de la industria láctea, es el residual obtenido de la manufactura del queso. Este subproducto es de difícil aceptación en el mercado. La fermentación láctica se ha propuesto como alternativa para el tratamiento de estos desechos, ya que ofrece atractivas ventajas, tales como; bajos costos de inversión, lo cual es muy importante en lugares donde no se cuenta con infraestructura, dar un uso integral a los desechos, ya que se puede separar productos de alto valor comercial como quitina, pigmentos y proteínas¹⁸.

4. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

Su fundamento se basa en la absorción de la radiación IR por las moléculas en vibración. Una molécula absorberá la energía de un haz de luz infrarroja cuando dicha energía incidente sea igual a la necesaria para que se dé una transición vibracional de la molécula. Es decir, la molécula comienza a vibrar de una determinada manera gracias a la energía que se le suministra mediante luz infrarroja. La espectroscopia tiene su aplicación más inmediata en el análisis cualitativo, debido a la correlación que existe entre los espectros y la estructura molecular¹³.

5. MUÑA (*Minthostachys mollis*)

La muña es una planta nativa del Perú su nombre científico es *Minthostachys mollis*, su cultivo es bastante difundido en las regiones andinas, principalmente en Apurímac, Ayacucho, Cusco, Huancavelica y Puno siendo muy empleada en las comunidades nativas²⁰.

La muña habita entre los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía, existe en gran abundancia, es un recurso natural que tiene un plano altitudinal de crecimiento entre los 2500 – 3500 msnm, es una planta hemicriptófila que durante la época más fría y seca del invierno desaparecen sus órganos aéreos y brotan nuevamente con las primeras lluvias de la primavera, alcanza una altura de 1.50 m, desarrollándose en forma difusa y muy ramificada, crece en lugares cercanos a acequias y manantiales, se desarrolla en suelos arenosos, ricos en materia orgánica, con buena retención de humedad, tienen un pH entre 5 - 8 y un clima con bastante luminosidad, se multiplica por semilla y por codo²¹.

A través de diversas investigaciones realizadas de esta planta se encontraron gran variedad de propiedades terapéuticas como antifúngica, antibacteriana, antihelmíntica y antidiarreica²². En particular, el aceite esencial de la especie vegetal viene siendo utilizada en medicina popular para tratar los cólicos estomacales y ciertos trastornos gripales²³.

5.1. Taxonomía de Muña (*Minthostachys mollis*)

Clasificación taxonómica de Muña (*Minthostachys mollis*)²⁰.

Dominio: Eukarya

Reino: Vegetal

Sub reino: Embryophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Sub clase: Methachlamydeae

Orden: Tubiflorae

Familia: Lamiaceae (Labiatae)

Género: *Minthostachys*

Especie: *mollis*

Nombre vulgar: “Muña”

5.2. Composición Química De La Muña (*Minthostachys Mollis*)

La Muña (*Minthostachys mollis*) está compuesta por agua, proteína, grasa, carbohidratos, fibra, ceniza, hierro, retinol, tiamina riboflavina y niacina, con un alto contenido de calcio y fósforo (Tabla 2)²⁴.

Tabla 2. Composición proximal de la muña en 100 g de materia seca²⁴.

Componentes	Cantidad
Agua (g)	16.0
Proteína (g)	3.2
Grasa (g)	2.8
Carbohidratos (g)	66.3
Fibra (g)	9.4
Ceniza (g)	11.7
Calcio (mg)	2237
Fósforo (mg)	269
Hierro (mg)	22.4
Retinol (mg)	306
Tiamina (mg)	0.35
Riboflavina (mg)	1.81
Niacina (mg)	6.85
Energía (Kcal)	268

6. ACEITE ESENCIAL

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos que se obtienen de diferentes métodos de extracción a partir del material vegetal como: flores, tallos, raíces, hojas, frutos y semillas, algunos de ellos precisan la actividad antimicrobiana y antifúngica, evaluadas con una fuente potencial de nuevos compuestos antimicrobianos y una alternativa para la preservación de alimentos²⁵.

7. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

La extracción de los aceites esenciales se puede realizar por métodos convencionales como la destilación con arrastre de vapor, hidrodestilación y espacio de cabeza “*Head-space*”; actualmente la extracción con fluidos supercríticos utilizando dióxido de carbono (CO₂) como solvente, y extracción por hidrodestilación asistida por radiación microondas tienen mayor importancia, pero llegan a ser un tanto costosos²⁶.

7.1. Destilación por Arrastre de Vapor

En la destilación por arrastre de vapor de agua se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros “no volátiles”. Lo anterior se logra por medio de la inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla, denominándose este “vapor de arrastre”, pero en realidad su función no es la de “arrastrar” el componente volátil, sino condensarse formando otra fase inmiscible que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación. En este caso se tendrá la presencia de dos fases inmiscibles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no estuviera presente. Es decir, cada uno de ellos ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la del líquido puro a una temperatura de referencia. La condición más importante para que este tipo de destilación pueda ser aplicado es que tanto el componente volátil como una impureza sean solubles en agua, ya que el producto destilado (volátil) formará dos fases al condensarse, lo cual permitirá la separación del producto y del agua fácilmente. La presión total del sistema será la suma de las presiones de vapor de los componentes de la mezcla orgánica y del agua. Sin embargo, si la mezcla a destilar es un hidrocarburo con algún aceite, la presión de vapor de aceite al ser muy pequeña se considera despreciable²⁷.

La destilación por arrastre de vapor es uno de los métodos más utilizados, debido a su sencillez de manejo y el bajo costo en comparación con otros métodos de extracción de aceites esenciales (Figura 6)²⁸.

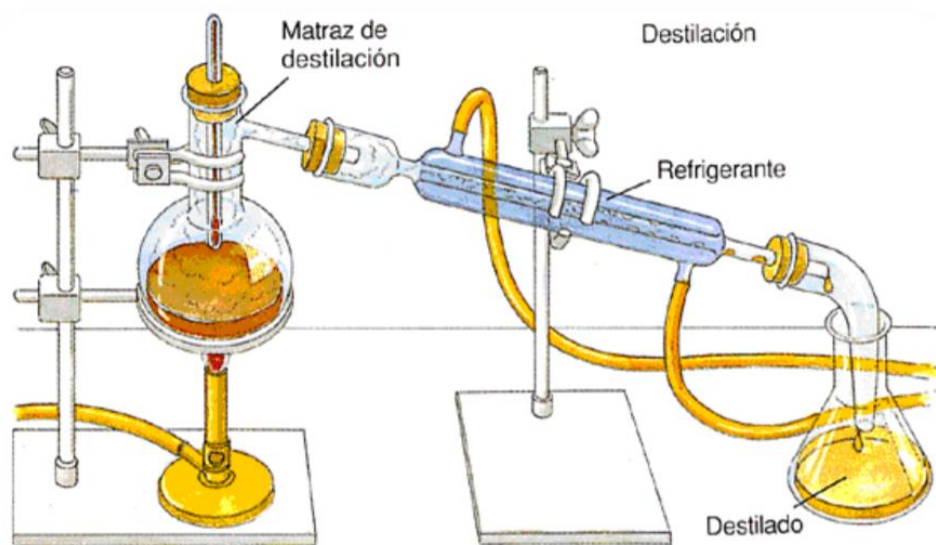


Figura 6. Extracción de aceite esencial por método de destilación por arrastre de vapor²⁸.

8. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA MUÑA (*Minthostachys mollis*)

El aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*), al igual que otros aceites esenciales, presenta una estructura cetónica, aldehídica, alcohólica (mentol y mentona), ésteres, éteres y terpenos en mayor porcentaje, de acuerdo a la investigación de Huari (2014)²⁹ el aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*) tiene una parte desterpénada (compuestos oxigenados) que es el 10.20 % y 89.80 % es para la fracción terpénica²⁹.

De acuerdo a estudios realizados por los autores Torrenegra-Alarcón, et al (2016)²³ se identificaron los componentes, los tiempos de retención (tr) y porcentajes de abundancia del aceite esencial (AE) De Muña (*Minthostachys mollis*) por cromatografía de gases/ espectrómetro de masa mostrando como compuesto mayoritario el carvacrol con un porcentaje de abundancia relativa de 21.24 % (Tabla 3)²³.

Tabla 3. Componentes mayoritarios destacados en el Aceite Esencial (AE) de Muña (*Minthostachys mollis*)²³.

Componentes mayoritarios destacados en el Aceite Esencial de Muña (<i>Minthostachys mollis</i>)	
COMPUESTO	% Abundancia relativa, (tr, min)
<i>M. mollis</i>	
α -pineno	1.73 (7.34)
Limoneno	0.56 (10)
Carvacrol	21.24 (10.07)
Eucaliptol	10.04 (10.07)
Timol	13.11 (13)
Pulegona	9.84 (41)
Germacreno-D	11.85 (44.36)
Biciclogermacreno	1.83 (44.803)
Acetato de cariofileno	1.83 (45.7)
Longifolol	1.77 (46.11)
Acetato de α -Eudesmol	11.32 (47.588)
Acetato de (-)-Isolongifolol	10.94 (48.75)
Acetato de exo-Norbornano	3.94 (49.87)

8.1. Mecanismo de acción del Aceite Esencial de la Muña (*Minthostachys mollis*) sobre los Microorganismos.

Los aceites esenciales dependen de sus propiedades lipofílicas e hidrofílicas. Los terpenoides presentes pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, los cuales afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de la membrana, por ejemplo, ciertos componentes del aceite esencial pueden actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente interrumpir la fosforilación del ADP^{30,31}.

Con respecto al aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*), se ha demostrado que presenta una mayor concentración relativa del compuesto carvacrol, el cual puede penetrar la membrana del citoplasma, causando una desestabilización de esta; igualmente podría actuar como intercambiador de protones, reduciendo el gradiente de pH a lo largo de la membrana³² también dentro de su composición presenta la pulegona que es el componente más nocivo y tóxico del aceite esencial muña que actúa con alta toxicidad frente a microorganismo fúngicos y bacterianos³³.

Este mecanismo de acción hacia los microorganismos es complejo y aún no ha sido del todo entendido y explicado, el modo de acción de los aceites esenciales también dependerá del tipo de microorganismos y está principalmente relacionado con la estructura de la pared celular y la membrana externa de los mismos. Las investigaciones plantean que los aceites esenciales interferirían en la fase del metabolismo intermedio de los microorganismos inactivando enzimas de reacción²⁹.

9. ANTIOXIDANTES EN LA MUÑA (*Minthostachys mollis*)

Los antioxidantes se definen según el Código Alimentario como las sustancias que por separado o mezcladas entre sí, pueden utilizarse para impedir, retrasar o inhibir en los alimentos y bebidas, las oxidaciones catalíticas y los procesos que inducen el enranciamiento natural originado por la presencia de luz, aire y metales. Como ejemplos de antioxidantes naturales tenemos el ácido ascórbico o vitamina C, que actúa en el citoplasma; el β -caroteno o vitamina A y el α -tocoferol o vitamina E, que actúan en la membrana celular. Estos antioxidantes se encuentran en las frutas, verduras, plantas y otras sustancias alimenticias^{34,35}.

Los compuestos fenólicos constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, consideradas metabolitos secundarios de las plantas^{36,37}. Entre los compuestos fenólicos naturales, la familia de los flavonoides, es la más importante³⁸ ellos representan más de la mitad de los ocho mil compuestos fenólicos identificados en la naturaleza^{39,40}. Los compuestos fenólicos o polifenoles se encuentran distribuidos ampliamente en el reino vegetal, en plantas medicinales, especias, vegetales, frutas, granos y semillas, donde su presencia contribuye a las cualidades sensoriales como color, aroma, pardeamiento, amargor y la astringencia. En la actualidad son los fitoquímicos más conocidos^{40,41,42}.

Los polifenoles son de especial importancia por sus características antioxidantes debido a que pueden participar en la protección contra la acción dañina de especies reactivas (principalmente los radicales libres de oxígeno) por su alto potencial redox^{43,41}. Considerables investigaciones epidemiológicas sostienen la concepción de que alimentos y bebidas ricos en compuestos fenólicos están asociados con una baja incidencia de enfermedades en humanos debido a su capacidad antioxidante⁴⁰. Entre los efectos positivos a la salud relacionados a los compuestos fenólicos reportados en la literatura figuran el actuar como: antibacteriano y antimicótico^{29,31}.

10. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DPPH

El fundamento del método desarrollado por Brand-Williams et al (1995)⁴⁴, DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), consiste en que este radical tiene un electrón desapareado y es de color azul-violeta, decolorándose hacia amarillo pálido por reacción con una sustancia antioxidante; al donar un radical de hidrogeno, se desestabiliza produciendo una disminución en la absorbancia la cual es medida espectrofotométricamente a 517 nm en su forma radical, pero, al reducirse por un antioxidante o una especie radical, su absorción disminuye. La disminución de la absorbancia de la solución DPPH indica un aumento de la actividad de eliminación de radicales DPPH^{44,45}(Figura 7)⁴⁶.

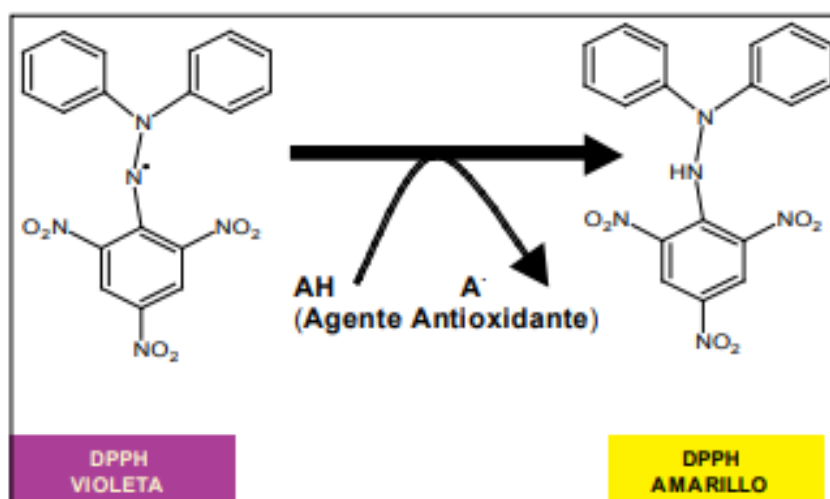


Figura 7. Método de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)⁴⁶.

El porcentaje de captación de radicales libres (DPPH) se determina con la siguiente fórmula (1)⁴⁶:

$$\% \text{ Capacidad Antioxidante / Captación de Radical Libre} = \frac{1-(A2-A3)}{A1} \times 100 \quad (1)$$

DONDE:

A1 = Absorbancia del patrón de referencia

A2 = Absorbancia de la muestra

A3 = Absorbancia del blanco de muestra⁴⁶.

11. BIOPELÍCULAS DE QUITOSANO

Las películas poliméricas se definen como una película compuesta por diferentes capas (polímero y plastificante), cuyas principales funciones son las de recubrir para retardar la pérdida de humedad, disminuir el crecimiento microbiano en la superficie y evitar su oxidación⁴⁷.

La capacidad filmogénica y actividad antimicrobiana es una de las propiedades principales del quitosano, además de ser biocompatible y biodegradable; el quitosano al ser un polisacárido es conocido por su estructura lineal, donde le proporciona a algunas películas dureza, flexibilidad y transparencia; siendo resistentes a las grasas y aceites⁴⁷.

La adición de plastificantes en muchos casos mejora las propiedades mecánicas de la película, existen varios plastificantes; como por ejemplo el glicerol es comúnmente utilizado para la plastificación de películas biodegradables y puede mejorar las propiedades de las películas a base de quitosano por otro lado, la adicción de un plastificante natural como los aceites esenciales, presentaría mejores propiedades con respecto a su actividad antibacteriana⁴⁷.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

Lugar de Ejecución

Universidad Católica de Santa María, Pabellón F, laboratorios F-408, F-402, F-401

Material Biológico.

- 20 g de exoesqueletos de camarón.
- 1500 mL de Suero de leche.
- 450 g de hojas de Muña (*Minthostachys mollis*)
- Cepa de *Escherichia coli*

Reactivos Químicos

- Glucosa 10 % MARCA REACTIVOS
- Fenolftaleína (Indicador).
- Hidróxido de Sodio marca MACRON
- Sulfato de sodio anhidro, marca SOLUTEST, suministrado por UCSM
- Cloruro de bario marca DIPROQUIM, suministrado por UCSM
- Ácido sulfúrico suministrado por UCSM
- Agua Destilada.
- Agua Desionizada.
- Agar EMB

Material de Vidrio.

- Pipeta graduada 0.5, 1, 2, 5, 10 mL
- Bureta 10 mL
- Matraz 50 mL, 1 L
- Beaker 50 mL, 1 L
- Peras de decantación
- Probetas graduadas 50, 100 mL
- Placas Petri

- Tubos de ensayo de vidrio pequeños

Instrumentos y equipos.

- Balanza analítica Sartorius, modelo Entris 224-1S
- Sistema de Fermentación creación propia.
- Cooler SBL COOLER YETI15QT
- Termómetro.
- Destilador por arrastre de vapor
- Estufa marca VENTICELL Eco Line
- Mufla marca ThermConcept, modelo KLE 09/11
- Filtración al vacío marca Vacum Pump VE125N
- Espátula
- Hot plate Stirrer JenWay 1000
- Balanza electrónica KAZO KMCB-6
- Asa de Kolle
- Micropipetas 20, 200, 1000 μ L marca CAPP
- Incubadora marca BIOBASE BJPX-C50
- Campana Extractora marca ESCO, EFA-6UDRCW-8
- Autoclave marca BOECO, modelo YX-18LDJ
- Vernier marca Stanley
- Licuadora marca OSTER HGBSSSS6
- FTIR marca Agilent Technologies Cary 630
- Espectrofotómetro UV-Vis marca Thermo Scientific, Evolution 201
- Licuadora Oster HGBSSSS6

Otros

- Cuajo
- Gasa
- Vía de venoclisis con llave
- Agitador magnético.
- Crisoles.
- Cintas de pH.
- Moldes acrílicos

- Frascos ámbar
- Tubos eppendorf
- Puntas azules y amarillas para micropipeta
- Perforador con diámetro de 0.5 cm

2.2. METODOLOGÍA

2.2.1. Extracción de quitina a partir de exoesqueletos de camarón por fermentación láctica

Recolección de la materia prima.

Se recolectó de 2 kg en peso, de exoesqueletos de camarón de río procedentes de los restaurantes de la región de Corire – Aplao, estas fueron colocadas en un Cooler de 1.5 L el cual contenía en su interior gelpacks para su preservación a 4 °C hasta su posterior tratamiento en el laboratorio.

Preparación de la materia prima.

Una vez recolectados los exoesqueletos, se procedió al lavado de estos con agua desionizada mediante 3 lavados sucesivos, para eliminar cualquier residuo orgánico u otro material adherido a la superficie. Posteriormente en una bandeja de aluminio se colocaron los exoesqueletos para ser llevados a la estufa por el periodo de 1 hora a 60 °C; y al final se llevó los exoesqueletos al sol por el periodo de 4 horas, luego de la estufa con la finalidad de obtener un secado total de estas sin humedad. Transcurrido dicho tiempo en una licuadora, se colocó pequeñas cantidades de exoesqueletos para su trituración. Finalmente se pasó la muestra por un tamiz #20 (0.5 mm), para obtener partículas pequeñas (mm) y se mantuvo en un secador hasta la fermentación¹³. (Figura 8 y Figura 9).



Figura 8. Exoesqueletos lavados antes de ser llevados a la estufa.



Figura 9. Licuadora para la tritución de los exoesqueletos (a y b), tamizaje de exoesqueletos de camarón (c).

Sistema de Fermentación.

Se mandó a confeccionar un sistema de fermentación de acero inoxidable, el cual se divide en tres partes: Un vaso ancho con 2 litros de capacidad con un espesor de 3 mm, en su interior un diámetro de 21 cm; una tapa hermética para el vaso, el cual contenía dos prensaestopas en la parte superior, un orificio que contenía un pequeño tubo de 6 mm para la extracción de muestra y una canastilla de malla inoxidable 2 mm de espesor. Se le adecuó una vía de venoclisis con llave para la extracción de la muestra (Figura 10).

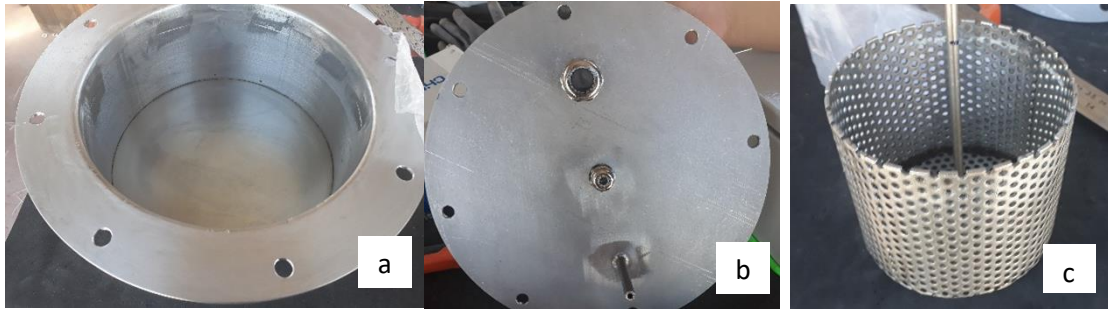


Figura 10. Vaso de acero inoxidable (a), Tapa de vaso (b), canastilla (c).

Preparación del suero lácteo.

Para su obtención se utilizó leche cruda, esta se llevó a 30 °C centígrados durante 15 minutos, para su coagulación enzimática, por la acción del cuajo debido a la acción de la renina, cuajo, enzima de tipo de las proteasas, actúa sobre la caseína de la leche (proteína soluble), transformándola en presencia de sales de calcio en paracaseína insoluble que precipita formando el coágulo. Se dejó reposar la leche a temperatura ambiente, subiendo así la acidez de la leche hasta que esta parezca “leche cortada o cuajada” Una vez coagulada la leche, esta debe ser cortada con Liras o Cuchillas para favorecer la salida del suero retenido en la masa. Dicho corte produce un fraccionamiento de la cuajada. Tras cortar la cuajada y con la ayuda de una gasa procedemos a extraer el suero sobrante¹³. (Figura 11).



Figura 11. Obtención de Suero de Leche.

Proceso Fermentativo.

Se colocaron 20 g iniciales de exoesqueletos seca de camarón, en una canastilla de acero inoxidable recubierta por un tul, (con la finalidad de no perder muestra). Esta canastilla fue sumergida en el vaso de acero inoxidable, el cual contiene 1500 mL de suero lácteo. El medio fue suplementado con glucosa al 10 % como fuente de carbohidrato. Posterior a ello, se procedió a colocar un agitador magnético en el interior del vaso y luego se selló para llevar a cabo la fermentación de manera anaeróbica, manteniendo la temperatura del medio a 37 °C con un calefactor simple. El tiempo de fermentación varía con relación al pH del medio, al inicio se registra un pH 7 el cual varía en relación a la producción de ácido láctico y el metabolismo de los microorganismos que se producen en el medio. Pasado el tiempo de fermentación, se decantó, para obtener la fracción sólida que correspondía al desperdicio de camarón fermentado, el cual fue enjuagado con agua desionizada hasta obtener un pH 7, secando la muestra a 60 °C por 6 horas) y se mantuvo en placas Petri en un desecador, para su caracterización y utilización en la desacetilación para la obtención de quitosano^{48,49}. (Figura 12).



Figura 12. Sistema de Fermentación.

Análisis de la Muestra.

Para el análisis de la muestra se toman alícuotas a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas (días) para medir el pH con las cintas de pH y ATT (acidez titulable), durante 4 días⁴⁸.

Medición de la acidez titulable.

La medición consiste en tomar una alícuota de 1 mL de licor de muestra de proceso fermentativo, el cual posee una concentración desconocida de ácido láctico.

Para ello se midió 1 mL de licor de muestra con una pipeta aforada y lo colocamos en un matraz Erlenmeyer de 25 mL. Agregamos 10 mL de agua destilada y 3 gotas de la solución indicadora de fenolftaleína. Para poder titular con una solución valorada de NaOH (0.1 N), el cual se encontraba contenido en una bureta de 25 mL. Al realizar la titulación se debe mantener a agitación constante hasta el viraje de color y se anotó el gasto final de NaOH y así poder determinar la concentración del ácido en la muestra de licor⁷. (Figura 13).



Figura 13. Acidez titulable de la muestra de licor.

2.2.2. Obtención de quitosano a partir de quitina extraída de exoesqueletos de camarón

Desacetilación de quitina para la obtención de quitosano.

Se tomó los exoesqueletos fermentados y se mezcló con una solución de Hidróxido de sodio al 60 % p/v en una relación 1:15 (kg sólido por L de solución). La mezcla se mantuvo en agitación constante por el periodo de 1 hora a 90 °C, transcurrido dicho

tiempo se filtró al vacío con agua desionizada hasta llegar a un pH neutro, obteniendo como producto final quitosano⁴⁹. (Figura 14).



Figura 14. Muestra fermentada antes de la desacetilación.

Determinación de Minerales.

El proceso de desmineralización se realizó por determinación de cenizas, se tomaron muestras frescas las cuales se sometieron al proceso de incineración, mediante el cual se destruye la materia orgánica constituida por óxidos o sales como carbonatos, fosfatos, sulfatos, etc.

Para su determinación se tomarán dos crisoles en donde uno contenía la muestra sin tratamiento y el otro la muestra tratada. Estos serán llevados a la mufla por un periodo de 6 horas a 600 °C, terminado dicho periodo las muestras serán secadas en un desecador hasta su análisis⁴⁹.

La desmineralización (DM) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$DM(\%) = \frac{(A_O \times O) - (A_R \times R)}{A_O \times O} \times 100 \quad (2)$$

Dónde: A_O y A_R son contenidos de cenizas (g / g) en muestras crudas y fermentadas, y O y R son la masa (g) de la muestra cruda y el residuo fermentado, respectivamente⁴⁹.

Determinación de Proteínas.

Las muestras de quitosano se enviaron al laboratorio de control de calidad de la universidad católica, para la determinación de proteínas por el método de Kjeldahl.

La desproteínización (DP) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$DP(\%) = \frac{(P_O \times O) - (P_R \times R)}{P_O \times O} \times 100 \quad (3)$$

Dónde: P_0 y P_R son contenidos de proteína (g / g) antes y después de la fermentación, mientras que O y R son la masa (g) de la muestra original y el residuo fermentado en peso seco, respectivamente⁴⁹.

Rendimiento.

El rendimiento de quitosano fue calculado en porcentaje en peso, como gramos de quitina obtenidos a partir de los 20 g iniciales.

$$\text{Rendimiento} = \frac{11,7}{20} \times 100\% \quad (4)$$

Caracterización de Quitosano por Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

Se tomó con una espátula una muestra de quitosano, la cual fue colocada para lectura en un espectrofotómetro. Se midió con una precisión de 4 cm^{-1} en un rango comprendido entre $400 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ³¹.

Grado de N-acetilación.

Para el cálculo de la N-acetilación tanto de la quitina se tomaron las absorbancias de las bandas características de la amida I y como referencia la banda de los grupos hidroxilos, para la correlación lineal propuesta en la fórmula³¹:

$$\text{Grado de N - acetilación (\%)} = 31,92 \left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 12,2 \quad (5)$$

Para luego determinar el grado de desacetilación, mediante la siguiente fórmula³¹:

$$DA (\%) = 100 - \text{Grado de N - acetilación (\%)} \quad (6)$$

2.2.3. Extracción de aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*) por destilación de arrastre de vapor.

El proceso de obtención del aceite esencial de las hojas Muña (*Minthostachys mollis*) se inició recolectando aproximadamente 5 kg de hojas de muña frescas las cuales pasaron por un proceso de secado durante 4 días bajo sombra, tiempo en el cual las hojas perdieron humedad, pasado este tiempo en una balanza electrónica se pesó 450 g de hojas de Muña (Figura 15) y luego se sometió directamente al proceso de

separación por arrastre de vapor de agua - escala laboratorio (Figura 16), equipo que se encuentra en el Laboratorio F- 407 de la Universidad Católica de Santa María.

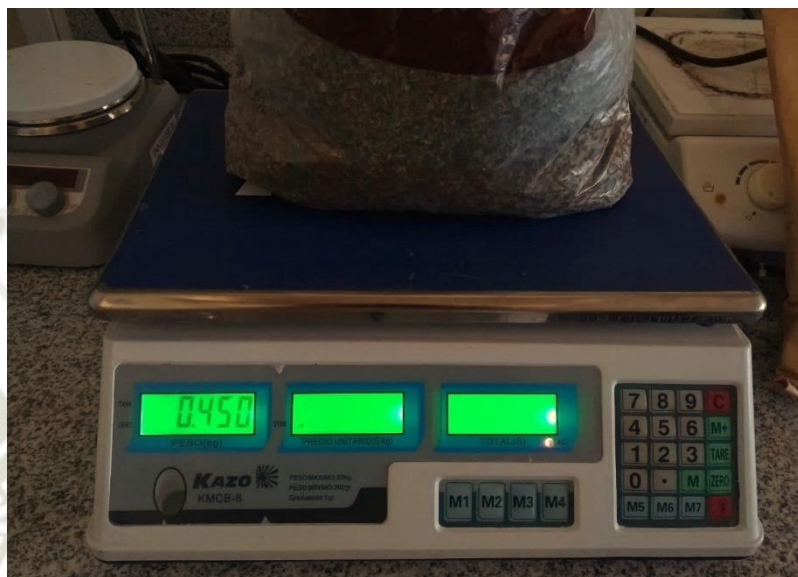


Figura 15. Muña (*Minthostachys mollis*) seca.



Figura 16. Destilador por arrastre de vapor de agua escala laboratorio.

Para la operación de arrastre con vapor de agua, se introdujo la materia vegetal al contenedor (Figura 17) y se cerró herméticamente, en esta operación se controlaron

los parámetros como, tiempo de destilación, aproximadamente 60 minutos a una temperatura de 90 °C⁵⁰.



Figura 17. Contenedor hermético (muestra vegetal) del equipo de destilación por arrastre de vapor de agua escala laboratorio.

El vapor de agua se introdujo al extractor por la parte inferior de éste; y una vez establecido el equilibrio, el vapor vivo formó en el aceite esencial contenido en la planta vegetal un sistema no miscible.

El aceite esencial se calentó por medio del vapor de agua proveniente de la caldera y es desalojado del tejido vegetal mezclándose con el vapor de agua. Después la mezcla de vapor de aceite esencial se hizo pasar por una superficie fría donde se condensó obteniéndose en forma líquida, las fases se separaron en peras de decantación para eliminar el agua⁵⁰.

Posteriormente el aceite esencial obtenido (Figura 18) fue deshidratado adicionando sulfato de sodio anhidro 3 g por cada 10 mL de aceite, el tiempo de contacto con agitación permanente entre el aceite y el sulfato fue de aproximadamente 20 a 30 minutos, luego se filtró con ayuda de una bomba al vacío, para separar las partículas

de sulfato de sodio y se depositó en un frasco oscuro herméticamente cerrado el cual fue almacenado en refrigeración a 4°C hasta su posterior uso^{51,52}.

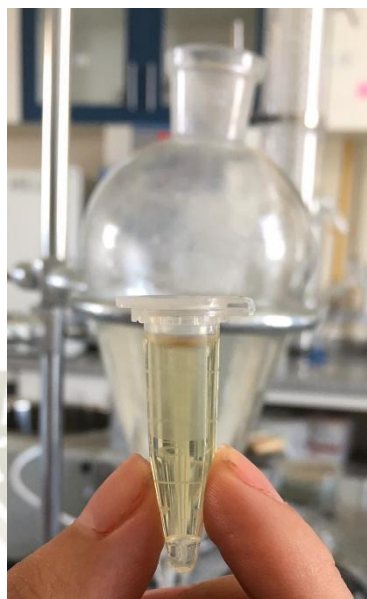


Figura 18. Obtención del aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*) por destilación de arrastre de vapor de agua escala laboratorio.

Rendimiento

El rendimiento del aceite esencial (% p/p) se determinó mediante la fórmula (4)⁵³:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso final}}{\text{peso inicial}} \times 100\%$$

Donde:

Peso final es la masa final del aceite esencial; peso inicial la masa inicial del follaje; y 100 es un factor matemático⁵³.

$$\text{Rendimiento} = \frac{2,2 \text{ ml}}{450 \text{ gr}} \times 100\%$$

$$\text{Rendimiento} = 0.48 \%$$

Este valor de 0,48 % corresponde al rendimiento de la extracción de aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*) el cual se encuentra entre el rango de rendimiento de aceites esenciales que varían de 0.01 % a 2.00 %⁵⁴.

2.2.4. Elaboración de biopelículas compuestas de quitosano y aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*).

La elaboración de las biopelículas se realizó preparando una solución a base de quitosano al 2 % (p/v) en una solución al 1 % (v/v) de ácido acético. La disolución del quitosano se realizó con un agitador magnético en un Hot plate durante 1 hora y 30 minutos a 150 rpm a 40 °C, luego se adicionó el aceite esencial de Muña en concentraciones de 0.1 %, 0.2 % y 0.3 % y se mantuvo en agitación durante 30 minutos^{47,55}. Procedimiento modificado por los autores de la tesis (Figura 19).

Para moldear la biopelícula, se vertió la solución a base de quitosano con aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*) en moldes acrílicos de fondo circular de 2.5 cm de diámetro, se extendió la mezcla con una espátula y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas, observando que el solvente se evaporó en su totalidad⁴⁷. (Figura 20).

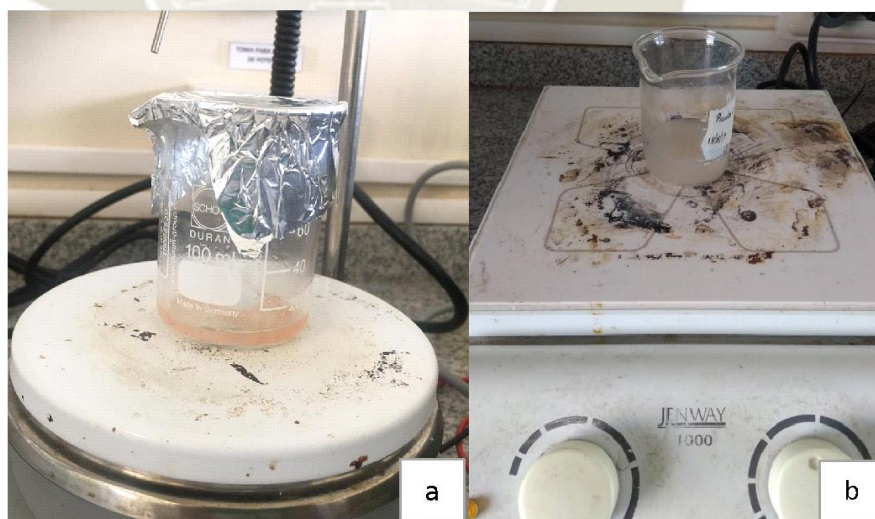


Figura 19. Elaboración de biopelícula de quitosano con aceite de Muña; solución de quitosano en ácido acético (a), mezcla de solución con aceite esencial de Muña (b).



**Figura 20. Biopelícula de quitosano con aceite esencial de Muña
(*Minthostachys mollis*)**

2.2.5. Evaluación del efecto antimicrobiano y antioxidante de las biopelículas.

Efecto antimicrobiano.

Para la evaluación de la actividad antimicrobiana de las biopelículas elaboradas con aceite de Muña en concentraciones de 1 %, 2 % y 3 %, se empleó la técnica de difusión en agar basada en el método de Cutter (1999)⁵⁶.

Preparación del estándar (0,5 Mc. Farland) para el inóculo.

Se utilizó una suspensión de sulfato de bario como estándar (0.5 de la escala de Mc. Farland). Para prepararlo, se agregó 0.5 mL de una solución de BaCl₂ 0.048 M (BaCl₂.2H₂O al 1.175 % P/V) a 99.5 mL de una solución de H₂SO₄ 0.18 M (0.36 N) (1 % V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión⁵⁷.

Preparación del Agar EMB

Se pesaron 9 g de Agar EMB, se mezcló con 250 mL de agua destilada durante 5 a 10 minutos, se calentó en una estufa y agitó hasta su ebullición, luego se autoclavó por 20 minutos y se dejó enfriar. Posteriormente el medio se repartió en placas Petri estériles aproximadamente 30 mL por placa, de manera que el grosor de medio en cada placa sea de 4 mm y se dejó solidificar. Finalmente se llevaron a incubación a 37° C durante 24 horas como prueba de esterilidad²⁰.

Preparación del inóculo bacteriano *Escherichia coli*

Primero se seleccionó las colonias de las cepas bacteriana de *Escherichia coli* luego se procedió a recoger 3 a 5 colonias con el asa de Kolle para transferirlo a un tubo de

ensayo estéril que contenía de 4 mL de solución salina estéril. Posteriormente, se homogenizó la suspensión y se ajustó a la escala 0.5 de Mc. Farland, correspondiente a 1.5×10^8 ufc/mL^{57,20}. (Figura 21).

Finalmente se comparó de manera visual sobre un fondo negro la escala de 0.5 de Mc. Farland con el inóculo bacteriano de igual concentración (Figura 22).

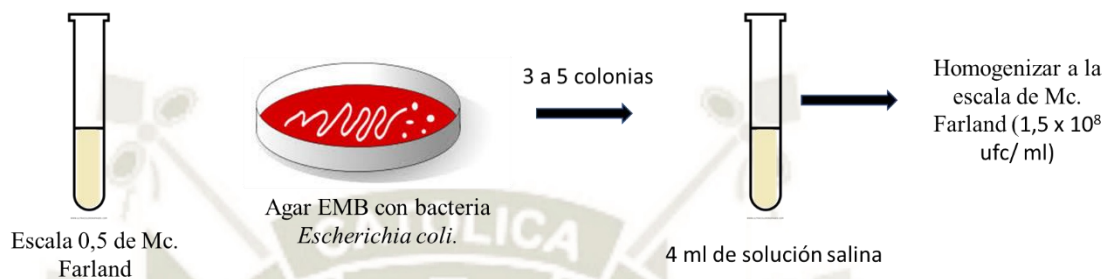


Figura 21. Proceso de preparación de Inóculo bacteriano (Elaboración propia).

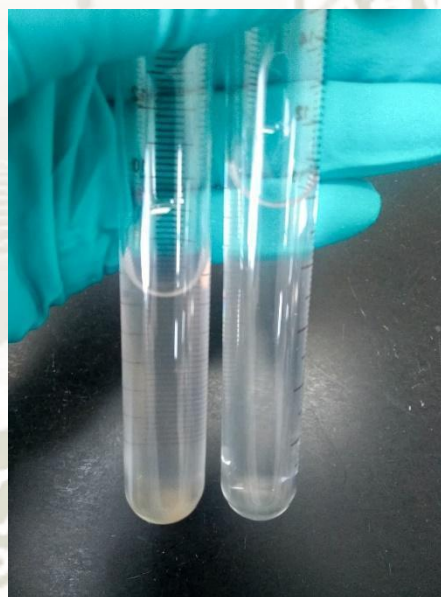


Figura 22. Comparación del inóculo bacteriano *Escherichia coli* (izquierda) con la solución 0.5 Mc. Farland (derecha).

Inoculación de las placas y prueba de sensibilidad con biopelículas

Se tuvo un lapso de tiempo de 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, se introdujo en ella un hisopo estéril en la suspensión, rotando varias veces y presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel de líquido para remover el inóculo. Luego se inoculó con el hisopo la superficie

de una placa de agar EMB por agotamiento en estrías sobre toda la superficie. Se repitió el sembrado dos veces rotando la placa aproximadamente 60 °C para asegurar una distribución constante del inóculo, se dejó seca la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para evitar cualquier exceso de humedad (Figura 23), luego se colocó los discos de biopelículas de 0.5 cm de diámetro en sus diferentes concentraciones (Figura 24) y se presionó para asegurar el contacto con la superficie del medio (Figura 25). Finalmente se colocaron todas las placas a 37°C en la incubadora durante 12 horas^{58,20}.



Figura 23. Inoculación en placa por la técnica de difusión en agar.



Figura 24. Preparación de discos de biopelículas para prueba de sensibilidad.

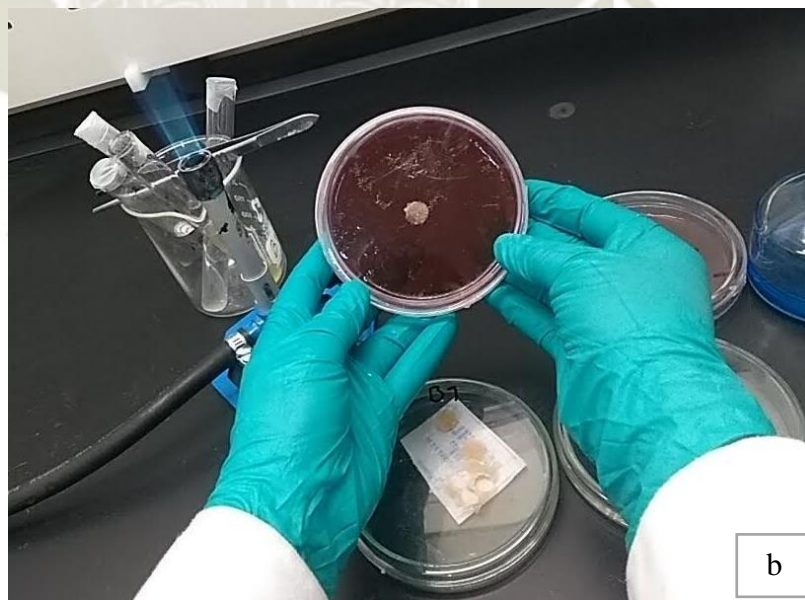
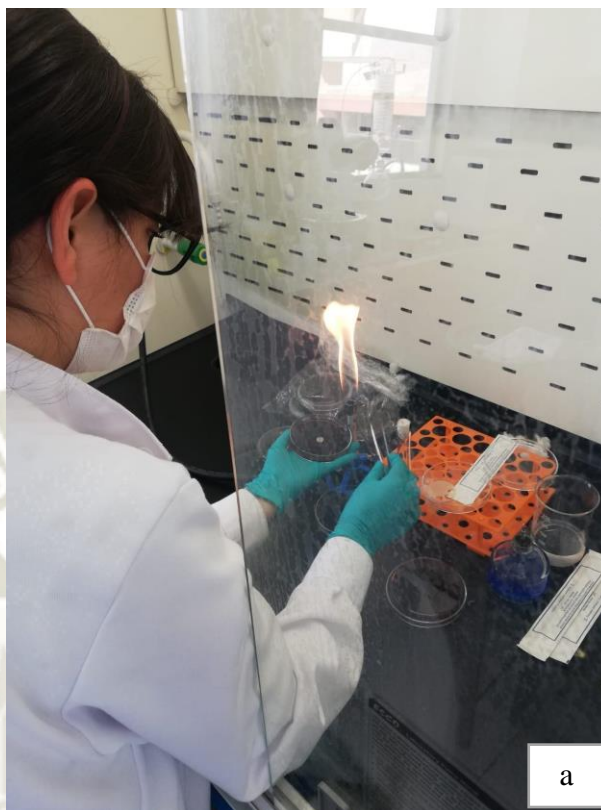


Figura 25. Procedimiento de la prueba de sensibilidad con biopelículas de quitosano con aceite de Muña (a) y resultado de la colocación del disco (b).

Efecto antioxidante

Para la evaluación de la actividad antioxidante de las películas elaboradas con aceite de Muña en concentraciones de 1 %, 2 % y 3 %, se pesó 1 g de cada muestra dentro de un tubo falcon con 10 mL de metanol. La mezcla se homogeneizó con la ayuda de un Vortex durante 15 minutos a 6000 rpm hasta su homogeneización. Luego fue llevada a la centrífuga por 15 minutos a 6000 rpm, luego extrajimos el sobrenadante en ausencia de luz hasta su estudio⁵⁹.



Figura 26. Muestra de biopelícula sometido al vortex para su disolución.

Método DPPH.

El ensayo de inhibición de DPPH se determinó con algunas modificaciones del propuesto por (Brand-Williams, Cuvelier y Berset, 1995)⁶⁰.

Preparación de la solución madre.

La solución madre de DPPH se preparó disolviendo 12.5 mg de DPPH en 100 mL de metanol, el procedimiento se realizó en ausencia de luz y se guardó en un frasco forrado (para evitar cualquier entrada de luz) en el refrigerador hasta su uso. Seguido preparamos la solución de trabajo tomando 40 mL de Solución madre diluido en 80 mL Metanol para su lectura junta a la muestra a analizar⁶¹.

Preparación de la curva de calibración.

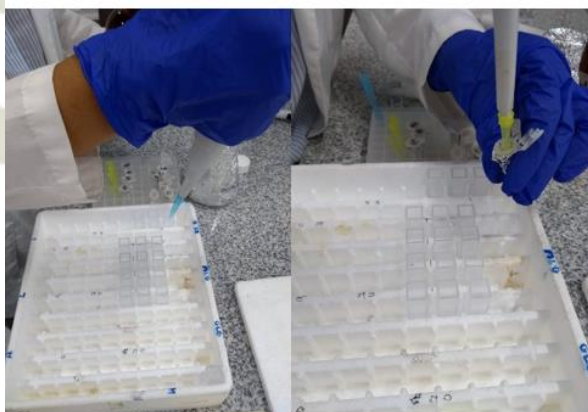
Se preparó una solución patrón, con 2.5 mg de Trolox en 10 mL de Metanol, para construir la curva de calibración de acuerdo a la siguiente Tabla 4⁶².

Tabla 4. Curva estándar de Trolox para DPPH⁶².

uM Trolox	Solución Stock (uL)
200	200
400	400
500	500
600	600
700	700
.800	800
900	900

Lectura en el Espectrofotómetro.

Las lecturas se hicieron por triplicado; cada muestra fue diluida en una relación de 1/1, 1/5, 1/10, 1/20, de las cuales se sacó 100 μ L de cada disolución, junto con 3.9 ml de solución de trabajo y fueron depositadas en las cubetas y se dejaron por 25 minutos en ausencia de luz hasta su lectura a 517 nm y 0.280 de absorbancia. Se utilizó como blanco al metanol y tres controles con 100 μ L de metanol y 3.9 mL de solución de trabajo. Los resultados se expresaron Posteriormente como equivalentes de Trolox^{63, 64, 65}. En la Figuras 27, 28 y 29 se muestra el procedimiento de las lecturas de las muestras en el espectrofotómetro.

**Figura 27. Adición de las muestras diluidas en las cubetas para el espectro.**

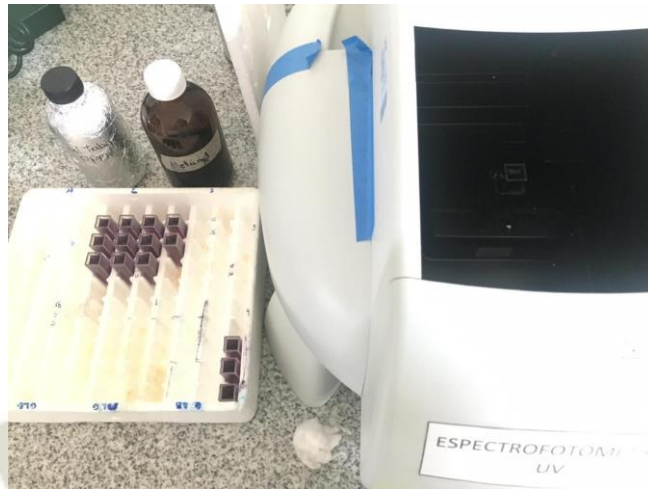


Figura 28. Muestras después de ser llevadas al espectrofotómetro.



Figura 29. Cubetas trabajadas después del espectro.

Análisis de resultados

Todos los datos obtenidos fueron registrados en el programa de Excel, y para las pruebas de comparación se utilizó el programa estadístico Statgrafics, realizando una prueba ANOVA y una prueba de t-Student.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Extracción de quitina a partir de exoesqueletos de camarón por fermentación láctica

Durante todo el proceso de fermentación se tomaron los valores de tiempo, pH y el porcentaje de Ácido láctico como se muestra en la Tabla 5 desde el día 0 hasta el día 4 que fue el último día de Fermentación.

Tabla 5. Resultados por horas del aumento en la producción de Ac. Láctico y disminución de pH.

Tiempo (hr)	Días	% Ácido láctico (g/mL)	pH
0	1	0.045	6.5
12	2	0.36	5
20	2	0.36	4.5
28	2	0.81	4.5
36	3	0.9	4.5
44	3	1.08	4
52	3	1.35	3.5
60	4	1.44	3.5
64	4	1.26	3.5
65	4	1.17	3.5
66	4	1.08	3.5
67	4	1.08	3.5
68	4	1.08	3.5
76	4	1.08	3.5
84	5	1.08	3.5
92	5	1.08	3.5

En el proceso fermentativo ocurre una reducción de pH debido a la acción de las bacterias con el medio el cual representa su fuente de energía obtenido de los azúcares⁶⁶ y un aumento de la acidez titulable, en nuestro caso los datos iniciales-finales fueron de 7-3.5 en la disminución de pH; un aumento en la acidez titulable de 0.045 hasta 1.8. A una temperatura constante de 37 °C, durante 5 días de fermentación; este aumento se da por la producción metabólica de ac. Láctico a partir de la fuente de carbono, en este caso la glucosa, la cual indicó la presencia de bacterias ácido lácticas y su adecuado crecimiento como lo menciona en su estudio Castro (2018)⁶⁷. El sistema

de fermentación se adecuó en beneficio de la producción de bacterias ácido lácticas tomando en consideración sus condiciones óptimas de crecimiento, autores como Dun (2019)⁶⁸, Zhang (2017)⁶⁹ e Yadav (2019)¹² reportaron resultados significativos entre 4 a 6 días de fermentación a una temperatura constante de 37 °C.

La degradación de glucosa para la producción de ácido láctico ocasionado por las bacterias ácido lácticas se dio por proceso anaeróbico hasta un pH de 3.4 similar al trabajo descrito en Martínez (2007)⁷⁰ y Ramírez (2016)⁷¹. Se evitó llegar a un pH más bajo del indicado para evitar el deterioro de los exoesqueletos tal como lo reporta Rao (2005)⁷². Los valores registrados en este trabajo muestran un óptimo proceso de fermentación el cual es de vital importancia para la remoción de minerales y la remoción parcial de proteínas.

3.2. Obtención de quitosano a partir de quitina extraída de exoesqueletos de camarón

Al obtener el quitosano se analizó la cantidad de minerales presentes en la muestra mediante el método de ceniza. El resultado se obtuvo reemplazando los datos en la fórmula (2) y el resultado se muestra en la Tabla 6.

Determinación de minerales por el método de ceniza, del quitosano obtenido de camarón.

Según la fórmula (2)

Tabla 6. Porcentaje de desmineralización.

	% Porcentaje de Ceniza.
Muestra cruda de camarón desacetilado.	94 %

Cabe resaltar que las etapas de desproteínización y desacetilación son independientes de la desmineralización, el uso de bases para la remoción de proteínas no afecta en la desmineralización.

Jung (2005)⁷³ e Tuyishime (2017)⁷⁴ describen a los microorganismos presentes como disolventes de calcio contenido en los exoesqueletos y depende de factores como el tamaño, fuente de carbono y pH durante la fermentación, además de la buena acidificación del medio para poder conservar el material y evitar el crecimiento de bacterias que putrefacta la muestra por la presencia de suero de leche. Por ello de un estudio comparativo se señaló que una concentración de 10 % de glucosa por 5 días de fermentación hasta un pH de 3 a temperatura constante, hay un buen porcentaje de desmineralización, variando los resultados entre 60 y 98 % como los describieron Kyung-Taek Oh (2008)⁷⁵ reportando un valor de 89 y 92 %, Bellaaj (2012)⁷⁶, Bellaaj (2013)⁷⁷ en dos de sus trabajos reportó 67 y 94 % de desmineralización. Arbia (2013)⁷⁸ también reportó un porcentaje de 98. En relación a nuestro resultado tuvimos un 94 % de desmineralización lo que calificaría como óptimo nuestros factores utilizados ya que se logra una casi remoción de los minerales presentes en los exoesqueletos de camarón.

Además de la ausencia de un método estándar las condiciones de cada reacción varían por ello el uso de esta vía biotecnológica representa un método de extracción reproducible Salas (2017)⁷⁹.

Determinación del porcentaje de Desproteínización del quitosano obtenido de camarón.

De la misma manera se obtuvo una muestra de quitosano y se llevó a analizar al laboratorio de Control de Calidad mediante el método de Kjeldahl para proteínas, una vez obtenido el resultado, los datos se reemplazaron en la fórmula (3) y se obtuvo el resultado que se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Porcentaje de desproteínización.

	% Porcentaje de Desproteínización.
Muestra cruda de camarón desacetilado.	33 %

El tamaño de partícula fue importante en las etapas de desproteínización y desmineralización para las reacciones entre una fase sólida y líquida para lograr llegar a los sitios sólidos activos, por lo que es necesario que los tamaños de las partículas varían entre 0.2 y 0.8 mm. Como lo reporta Tolaimate (2000)⁸⁰ también resalta que al usar tamaños menores a 1mm; la fracción sólida es suspendida en la fase líquida (suero de leche), complicando su separación por lo que nosotras utilizamos un tamaño de 0.5 mm permitiendo un balance para evitar la pérdida de partículas finas en la etapa de separación sólido – líquido.

La fermentación además de producir la desmineralización en los exoesqueletos de camarón produce una desproteínización simultánea como lo reportan en Arévalo (2016)¹⁹ e Yadav (2019)¹². Indicando que las enzimas presentes de forma natural en los crustáceos se activan a pH menores ocasionando el rompimiento del enlace peptídico de las proteínas y así provocar su hidrólisis para servir como fuente de nitrógeno y proteína para los microorganismos presentes.

Los valores de desproteínización varían de un trabajo a otro, partiendo desde un 40 % hasta 96 % de desproteínización, donde utilizan métodos más sofisticados con la ayuda de proteasas sintéticas que demandan un valor más en operación o la utilización de microorganismos especializados. Valores como 56 % reportado por Na (2019)⁸¹ y Aytakin (2010)⁸² que reporta valores de 88 % y 75 % en comparación. Flores (2012)⁸³ también reporta valores desde 60 hasta 70 % en un análisis de su trabajo. Como se puede ver en la Tabla 7, obtuvimos un valor alrededor de 33 % solo de la fermentación lo cual está cerca a los valores mínimos reportados que utilizan un medio de desproteínización más eficiente con enzimas y microorganismos, por lo que la etapa de desacetilación con hidróxido de sodio terminaría de remover las proteínas presentes en la muestra, otros trabajos como Monter (2016)⁸⁴. Usan una combinación mixta de un procedimiento biológico más uno químico utilizando como base el hidróxido de sodio para desproteínizar, pero esto de alguna manera daña la pureza del quitosano.

Rendimiento de Quitosano

Se tomó el valor inicial y final de la muestra de quitosano para reemplazarlo en la fórmula (4) y se obtuvo el resultado como se ve en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de rendimiento.

	% Rendimiento
A partir de 20 g iniciales de exoesqueletos secos de camarón.	58.5 %

A continuación, en la Tabla 9 se muestra la comparación de diferentes trabajos de investigación tomando en cuenta los parámetros tales como: rendimiento, temperatura, tiempo y pH.

Tabla 9. Tabla comparativa de otros trabajos con sus respectivos parámetros.

RENDIMIENTO (%)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (h)	PH	DESPROTEINIZACIÓN	REFERENCIA
46.4	40	72	8	Enzimas (Quimiotripsina)	Zubiria, 2014
48.8	40	72	8.5	Enzimas (papaína)	Zubiria, 2014
44	32	72	-	Fermentación	Bhaskar, 2010

En un estudio comparativo en Zubiria (2014)⁸⁵ se registran valores de 46.6 % y 48.8 % en su rendimiento con enzimas además de Bhaskar (2010)⁸⁶ informa de un valor 44 %, por lo que en este trabajo al obtener un 58.5 % de quitosano nos pone dentro del rango admisible. Se tuvo en cuenta los factores que afectan el rendimiento de nuestra muestra tales como temperatura y el uso de sustancias alcalinas, en nuestro caso usamos un método mixto para evitar el daño macromolecular a nivel de quitosano⁸⁷.

Caracterización de Quitosano por Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR).

Luego de utilizar el espectrofotómetro tomando una pequeña cantidad de muestra de quitosano, el equipo mostró los principales picos de los grupos más representativos de la estructura de quitosano, como se muestra en la Figura 30.

Análisis FTIR

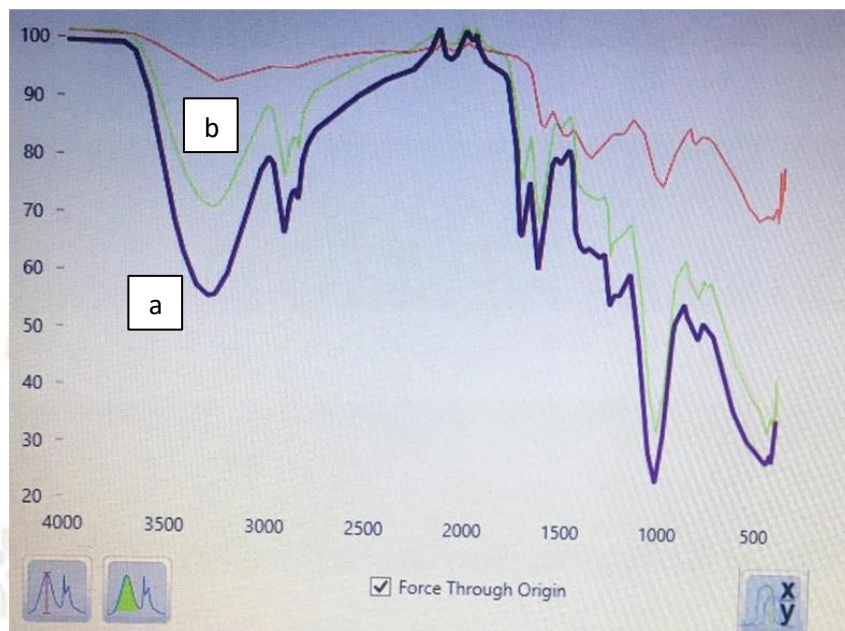


Figura 30. Espectros vistos en el FTIR (a) quitosano comercial y (b) quitosano sintetizado.

Los espectros se obtienen mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier, las bandas más características tienen un aproximado en 3450 cm^{-1} del grupo $-\text{OH}$, también una banda que identifica la presencia de grupos $-\text{NH}$ en 1654 cm^{-1} aproximadamente. Otra de las bandas características es la tensión antisimétrica del grupo C-O-C, a 1036 y 1082 cm^{-1} . Así lo registra Maza (2007)⁸⁸.

Los espectros de quitosano se obtienen mediante espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier y las tiras principales se muestran en la Figura X. Los análisis de este espectro muestran bandas características como se muestran en algunos trabajos donde las bandas de quitosano aislado tienen una banda ancha aproximadamente entre $3200\text{-}3374\text{ cm}^{-1}$ para la vibración por estiramiento de los grupos OH y NH, 1661 cm^{-1} para (amida I), 1595 cm^{-1} para (amida II), 1380 cm^{-1} para (amida III) Como lo reportaron Abdel-Rahman (2015)⁸⁹ y Kaya (2015)^{90, 91}. Si comparamos con el quitosano comercial el estiramiento asimétrico del puente C-O-C y 1080 cm^{-1} para el estiramiento $-\text{CO}$, según Ahyat (2017)⁹² es característica de su estructura.

Benhabiles (2013)⁹³ y Kumari (2014)⁹⁴, menciona que los resultados obtenidos proporcionan una alternativa importante hacia la producción de quitina y quitosano. Esto se debe a las condiciones operativas y las técnicas de análisis utilizadas, por lo que consideran como parámetros importantes: Temperatura, concentración y tiempo de reacción en cada etapa, así como el aumento del intervalo de factores.

Nuestro espectro muestra una banda ancha en 3254 cm^{-1} característica del quitosano y el estiramiento que denota la presencia de amidas (I, II) en 1626 cm^{-1} y 1506 cm^{-1} respectivamente. Guardando cierta similitud con trabajos anteriores. Se puede ver un estiramiento en 1025 cm^{-1} producto del carbolino de enlace C-O.

Porcentaje del grado de N-acetilación.

Luego del proceso de desacetilación es necesario calcular el % de N-acetilación por ello se utilizó los valores de Absorbancia de los picos de la Amida y así se reemplazó los datos en la fórmula (5) dicho resultado se muestra en la Tabla 10, así mismo este dato se toma para poder hallar el grado de desacetilación según la fórmula (6), el cual se muestra en la Tabla 11.

Tabla 10. Porcentaje de N-acetilación.

	% Porcentaje de N-acetilación.
Muestra cruda de camarón desacetilado.	19.15

Tabla 11. Grado de Desacetilación.

	DA (%)
Muestra cruda de camarón desacetilado.	80.84

Escobar (2013)⁹⁵ menciona que la quitina y el quitosano al ser poliglucosaminas, se distinguen por el grado de desacetilación de los grupos amino, donde el quitosano tiene un grado de N-acetilación entre 15-25 % que corresponde a 3.2 – 5.3 % del contenido de acetilo, he ahí la importancia de este parámetro. Existen varios métodos para su

determinación, pero el más referenciado es por FTIR mediante las bandas de vibración, donde se seleccionaron las bandas correspondientes a las bandas Amida (I o III) y o alguna otra banda de referencia como lo describe en sus trabajos Brugnerotto (2000)⁹⁶ e Hidalgo (2009)⁹⁷.

En el presente trabajo se tomó valores cercanos a las bandas indicadas ya que el equipo solo nos daba, datos de los picos más pronunciados por lo que tomamos bandas de 1374 cm^{-1} referente a la Amida III y como banda de referencia usamos el valor a 1542 cm^{-1} referente a la amida secundaria, de ellos obtuvimos un grado de N-acetilación de 19.15 %, que está dentro del rango mencionado y comprueba la eficiencia de nuestro método. Dándonos así un grado de desacetilación del 80 %, para la comprobación del polímero obtenido.

3.3. Extracción de aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*) por destilación de arrastre de vapor

La destilación de arrastre de vapor de agua ha sido y es uno de los métodos más comunes para la extracción de aceites esenciales de plantas, ya que mediante el uso del vapor de agua se vaporizan selectivamente los componentes volátiles de la materia prima vegetal⁹⁸.

De acuerdo al estudio realizado por Peña (2017)⁵¹, las principales características organolépticas del aceite esencial a partir de hojas frescas de Muña (*Minthostachys mollis*), fueron un líquido fluido, translúcido, de color amarillo limón, con olor intenso a mentol y sabor picante; estos resultados son similares al trabajo de investigación de Cano (2007)³¹; sin embargo, difiere con lo reportado en la Tabla 11 del presente trabajo que muestran resultados del aceite con el aspecto líquido translúcido, color amarillo claro y olor al mentol, y al trabajo de investigación de Castro (2012)⁹⁹, ya que fueron diferentes en cuanto al líquido aceitoso ligeramente translúcido, color amarillo claro y olor a mentol, esto se debería a que en este trabajo de investigación el autor efectuó la extracción del aceite esencial a partir de hojas secas de Muña (*Minthostachys mollis*). A continuación, en la Tabla 12 donde se describe las condiciones del proceso y los resultados obtenidos de la extracción de aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*).

Tabla 12. Condiciones del proceso y resultados obtenidos de la extracción del Aceite de Muña (*Minthostachys mollis*)

Reactor	Destilador por arrastre de vapor de agua
Cantidad de muestra	450 g
Tiempo de destilación	30 minutos
Temperatura de extracción	90°C
Temperatura del condensador	27°C
Rendimiento (%)	0.48
Color	Amarrillo claro
Aspecto del aceite	Ligeramente translúcido
Olor del aceite	Olor a mentol
Aceite recuperado	2.2 mL

* Elaboración propia.

Rendimiento

Se obtuvo aproximadamente 4.4 mL de aceite esencial de muña por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, el cual representa 0.48 % de rendimiento utilizando la fórmula (4) (Tabla 13).

Tabla 13. Rendimiento de aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*)

Planta	Rendimiento (%)	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
Aromática			
Muña	0.48	30	90
<i>(Minthostachys mollis)</i>			

Tabla 14. Comparación entre el rendimiento del aceite esencial de Muña
(Menthostachys mollis)

Aceite Esencial	Método de Extracción	Rendimiento (%)	Tiempo (Min)	Temperatura (°C)	Referencia
Muña (<i>Menthostachys mollis</i>)	Destilación de arrastre de vapor de agua	0.19	-	-	Cano (2008)
		0.27	-	-	Fuertes (2001)
		0.26	90	84	Castro (2012)
		1.05	-	-	Peña (2017)
		0.6	90	84	Torre Negra et al., (2016)

En la Tabla 14 se muestra que el rendimiento del aceite esencial de Muña es de 0.48 %, lo cual es un dato apreciable, ya que el rendimiento de aceites esenciales es bajo y varían de 0.01 % a 2.00 % de acuerdo a lo mencionado por Zekaria (2006)⁵⁴; dato comparado con la investigación de Cano (2008)³¹ muestra que obtuvieron un rendimiento del 0.19 % de aceite esencial de Muña, por su parte Fuertes (2001)¹⁰⁰ muestra un rendimiento de 0.27 % en la localidad de Tarma y 0.21 % de la localidad de Huaraz, así mismo el autor Castro (2012)⁹⁹ muestra un rendimiento de 0.26 %, dichos datos son inferiores a lo reportado en el presente estudio (0.48 %), esta variación de datos se debe a diferentes factores, como los métodos de cultivo, condiciones geobotánicas entre ellas el clima, altitud, pluviosidad, luminosidad, tipo de suelo, temperatura; edad de las plantas y épocas de recolección.

Por otro lado, el trabajo de investigación de Peña (2017)⁵¹ muestra que obtuvieron 1.05 % de rendimiento de aceite esencial de Muña al igual que Torre Negra et al., (2016)²³ con 0.6 % de rendimiento son datos superiores a lo reportado en el presente estudio, en ese sentido, el trabajo de investigación realizado por Yañez (2011)¹⁰¹ menciona que el proceso de secado de las hojas de la planta favorece la extracción de aceites esenciales logrando obtener mayores rendimientos, lo cual se realizó tanto en presente estudio como en las mencionadas anteriormente.

3.4. Elaboración de biopelículas compuestas de quitosano y aceite esencial de Muña (*Minthostachys mollis*).

Las biopelículas obtenidas a partir de la mezcla de quitosano y aceite esencial de Muña, mostraron un tono transparente con un ligero color naranja característico del quitosano extraído a partir de exoesqueletos de camarón, firmes y un tanto flexibles, se formaron por el modelo de solución acuosa a través de la evaporación del solvente como se muestra en la Figura 31 del proceso a las 0,12 y 24 horas de la formación de las biopelículas.



Figura 31. Solución de biopelícula fresca a las 0 horas (a), solución de biopelícula pasada las 12 horas a temperatura ambiente (b), solución de biopelícula pasada las 24 horas a temperatura ambiente (c).

El método de elaboración de biopelículas entre quitosano y aceite esencial de muña, estuvo basado en diferentes trabajos de investigación, entre ellos está la del autor Hernández (2011)⁵⁸ el cual disolvió quitosano de bajo, medio y alto peso molecular en una solución acuosa de 1 % (v/v) de ácido acético para obtener una concentración final al 2 % (p/v) y como agente antimicrobiano aceites esenciales y extractos de especias en concentraciones que oscilaron entre 100 y 750 mg/L, así mismo Madera (2019)⁵⁵ usó las mismas concentraciones quitosano disuelto en ácido acético al 1 % (v/v) llegando a la concentración en las biopelículas de 2 % (p/v) con la diferencia que usó como agente antimicrobiano el extracto acuoso de hoja de *Moringa oleífera* en una concentración de 1%, de acuerdo a lo anterior, el autor Hromiš (2015)¹⁰² usó las mismas concentraciones con respecto al quitosano y ácido acético 2 % (p/v) en una solución al 1 % (v/v) de ácido acético, con la diferencia de que agente antimicrobiano utilizado fue el aceite esencial de alcaravea en una concentración de 1 %, por lo tanto, en el presente estudio se usó las concentraciones del aceite esencial de muña al 1 %, 2 % y 3 % las cuales se basaron en las concentraciones utilizadas de aceites esenciales

con efecto antimicrobiano por los autores ya mencionados, cabe resaltar que para lograr una solución en concentraciones correctas con respecto al aceite esencial de *Minthostachis mollis* (Muña) se tomó en cuenta la concentración mínima inhibitoria de esta ante la cepa de *Escherichia coli*, siendo 500 ug/mL (1 %), lo cual convierte a este aceite esencial un promisorio para el control de componentes bacterianos según el importante trabajo de investigación realizado por Torre Negra et al., (2016)²³.

3.5. Evaluación del efecto antimicrobiano por halos de inhibición y el efecto antioxidante por el método de DPPH de las biopelículas.

Efecto antimicrobiano de las biopelículas de quitosano en presencia de la bacteria *Escherichia coli*.

La Figura 32A es el control donde se muestra el medio EMB ya sembrado con la cepa de *Escherichia coli* con el disco de biopelícula de quitosano al 2 %, el cual estuvo en incubación a unas condiciones estándares de crecimiento en 37 °C sin presencia de oxígeno durante 24 horas, en efecto, como se puede observar no hubo contaminación de algún microorganismo diferente al estudiado, sin embargo se observa un pequeño halo de inhibición de 21.3 mm lo cual muestra que la biopelícula control de quitosano al 2 % muestra posee efecto antimicrobiano ante la cepa *Escherichia coli*.

Este resultado coincide con un estudio realizado por el autor O'Callaghan y Kerry (2016)⁹⁰, quien menciona que el quitosano muestra mayor actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-negativas como la *Escherichia coli*, este comportamiento se atribuye a la mayor carga negativa de la membrana plasmática de la bacteria *Escherichia coli*, que induce a una mayor interacción electrostática con los grupos catiónicos del quitosano (NH₂ a pH<6). Según el autor Dutta (2009)⁴ esta interacción produce una desestabilización y posterior lisis de la membrana, conduciendo a la liberación de los constituyentes intracelulares de la bacteria.

Otro mecanismo propuesto se basa en la actuación del quitosano como quelante de metales traza, en condiciones ácidas, reduciendo los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. Un último modo de actuación describe la

penetración de oligómeros de quitosano en la célula inhibiendo el funcionamiento de enzimas intracelulares y/o interfiriendo en la síntesis de mRNA y proteínas⁴.

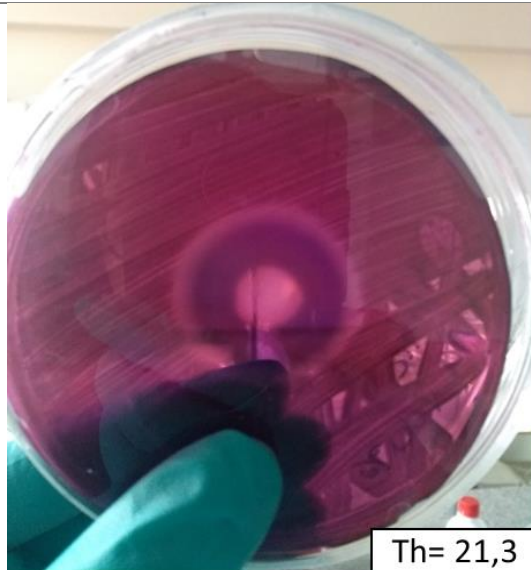
Por otro lado, Sole (2016)¹⁰³ menciona que la actividad antimicrobiana del quitosano se ve influenciada por el peso molecular, el grado de desacetilación, el grado de polimerización, su concentración, el microorganismo diana, la hidratación de la película y el pH del medio. Las condiciones descritas para el aumento de la actividad antimicrobiana del quitosano son un peso molecular menor a 10 kDa, mayor grado de desacetilación, menor pH y carácter catiónico por dilución en ácido acético glacial.

En el presente trabajo el pH obtenido del quitosano fue neutro y tuvo un grado de desacetilación de 80.84 % el cual no es despreciable para el resultado obtenido.



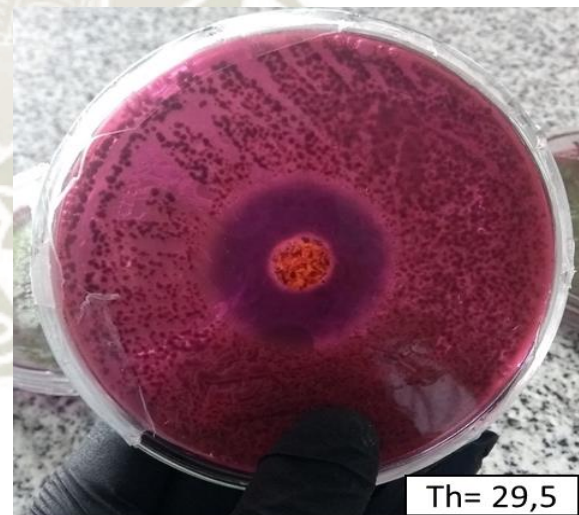
A) Control

B) Biopelícula de quitosano con 1% de
aceite de Muña



C) Biopelícula de quitosano con 2% de
aceite de Muña

D) Biopelícula de quitosano con 3% de
aceite de Muña



Th= Tamaño de halo

Figura 32. Biopelículas de quitosano con concentraciones de aceite esencial de muña (1%, 2% y 3%) frente a la cepa bacteria de *Escherichia coli*.

En la Figura 32 B,C,D se observa el efecto antimicrobiano de la biopelícula de quitosano con de aceite esencial de *Minthostachis mollis* (Muña) al 1 %, 2 % y 3 % ante la bacteria *E. coli*, el cual estuvo en incubación a unas condiciones estándares de crecimiento en 37 °C sin presencia de oxígeno durante 24 horas, mostrando diferentes tamaños de halos de inhibición 25.1 mm, 26.6 mm y 29 mm respectivamente, los resultados obtenidos a partir de la experimentación y el registro fotográficos muestra que la biopelícula de quitosano con aceite esencial de muña al 3% posee mayor tamaño de halo de inhibición, por lo que el efecto antimicrobiano de la biopelícula posee un efecto frente a la bacteria estudiada *Escherichia coli*.

A la actualidad no se han encontrado muchos estudios previos sobre el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a la bacteria gram negativa *Escherichia coli*, pero sí encontramos referencias nacionales e internacionales que nos muestran el efecto antimicrobiano del aceite de la planta frente a *Escherichia coli*. Dichas investigaciones coinciden con los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, como es el estudio de los autores Torre negra (2016)¹⁰⁴ y Camacho (2015)¹⁰⁵ que demuestra que el aceite de *Minthostachys mollis* tuvo un efecto antimicrobiano frente a la cepa *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*, a una concentración mínima inhibitoria de 500 ug/mL y 600 ug/mL respectivamente, concluyendo así que la inhibición del crecimiento de las cepas *Escherichia coli* usando el aceite de la planta se debía al gran contenido de monoterpenos oxigenados que contaba con una notable actividad antibacteriana, como son el carvacrol y el timol.

De acuerdo a lo anterior, el autor Xu (2008)¹⁰⁶ en su estudio realizado, concluye que el mecanismo de la acción del carvacrol y el timol genera una ruptura de la membrana citoplasmática de las bacterias Gram negativas como viene a ser la *Escherichia coli*, lo cual promueve el aumento de su permeabilidad logrando despolarizar y desestabilizar su potencial.

Finalmente, los resultados obtenidos en el presente estudio demuestran que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* inhibe el crecimiento de cepas *Escherichia coli*, esta actividad antimicrobiana de la planta *Minthostachys mollis* (muña) son propiedades apreciables debido a que los aceites esenciales pueden actuar como desacopladores, los cuales interfieren en la translocación de los protones sobre la membrana y consecuentemente interrumpir la fosforilación del ADP. Los compuestos terpenoides pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles las cuales afectan la actividad enzimática catalizadoras a nivel de la membrana^{30,31}.

El carvacrol es uno de los componentes más importantes de esta actividad más notables, pues su mecanismo se basa en desintegrar los precursores grasos, enlenteciendo el intercambio de sustancias a través de la membrana. Este compuesto acaba las reservas ATP bacterianas ocasionando un pésimo metabolismo. Otro componente, el cinaldehído, inhibe enzimas como carboxilasa y proteasas al bloquear la vía respiratoria de las bacterias impidiendo el tránsito normal del potasio y modificando el pH. El carvacrol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas, de esta manera se sigue evidenciando sosteniendo que el aceite esencial de *Minthostachys mollis* es una buena fuente natural y disponible que posibilitará desarrollar diferentes formas farmacéuticas con actividad farmacológico^{32,33}.

Análisis de resultados

Los ensayos se realizaron por triplicado y se analizaron en el programa estadístico STATGRAFICS en el cual se utilizó la prueba ANOVA de un solo factor, teniendo como resultado el Gráfico 1 obtenido a partir de la tabla ANOVA (ANEXO 1), el valor de P es igual a 0.0038, puesto que el valor-P de la prueba es menor que 0.05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media del efecto antimicrobiano de biopelículas de concentración de aceite esencial de Muña al 1 %, 2 % y 3 %, con un nivel del 95.0 % de confianza.

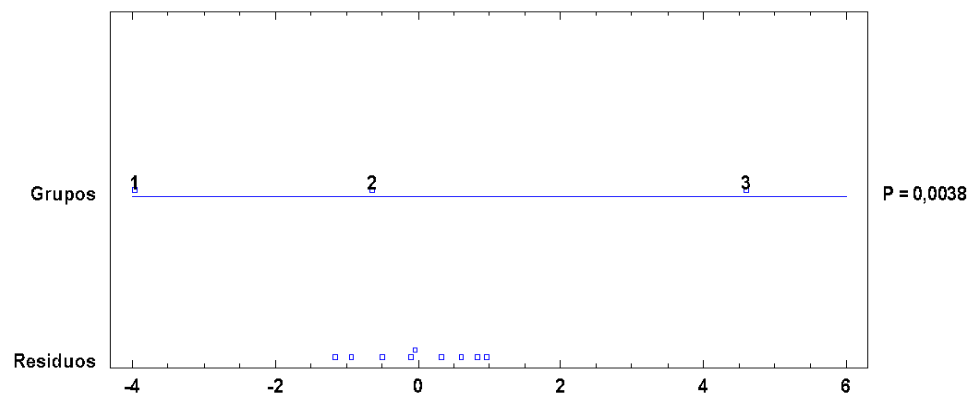


Gráfico 1. ANOVA para actividad antimicrobiana

El Gráfico 2 muestra que los datos ingresados al programa estadístico Statgraphics, tomando valores máximos y mínimos y la mediana, se encuentra en el medio dando una distribución asimétrica.

Gráfico Caja y Bigotes

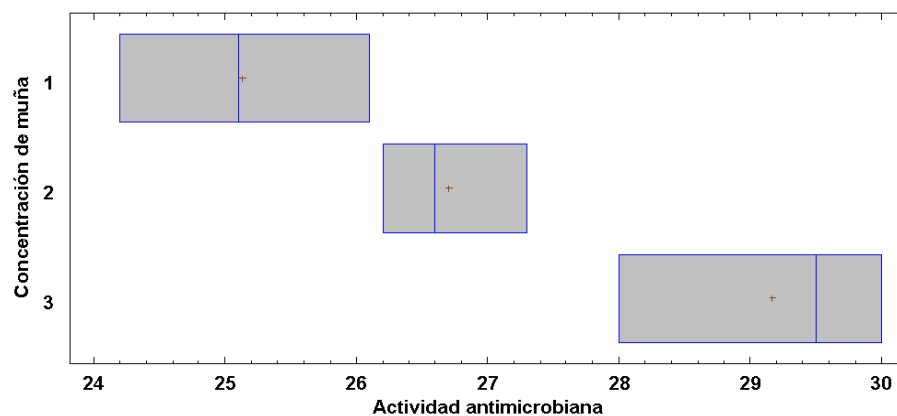


Gráfico 2. Caja de bigotes de actividad antimicrobiana

Habiendo obtenido diferencia significativa en la prueba ANOVA de un solo factor, se pasó a realizar la prueba de t- Student para determinar si hay una diferencia estadística significativa entre las medias del tamaño de los halos de inhibición entre el grupo 2 y

grupo 3, de acuerdo a la Tabla 15, se puede observar que entre el grupo 1 que uso la concentración de muña al 1 % y el grupo 2 que uso la concentración de muña al 2 %, valor de P es igual a 0.069, puesto que el valor-P de la prueba es mayor que 0.05, por lo tanto no existe diferencia significativa entre ambos grupos analizados.

Tabla 15. Prueba t- Student de los grupos con concentraciones de aceite de Muña al 1% y 2%

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias					95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de desv. estándar	Inferior	Superior
efect	Se asumen varianzas iguales	,512	,514	-2,463	4	,069	-1,56667	,63596	-3,33237	,19904
	No se asumen varianzas iguales			-2,463	3,228	,085	-1,56667	,63596	-3,51204	,37870

Con respecto al grupo 2 que uso la concentración de muña al 2% y el grupo 3 que uso la concentración de muña al 3 %, en la Tabla 16 se puede observar que el valor de P es igual a 0.022, puesto que el valor-P de la prueba es menor que 0.05, existe diferencia significativa, por lo tanto, la biopelícula con concentración de aceite esencial de Muña al 3 % es significativamente diferente a las demás.

Tabla 16. Prueba t- Student de los grupos con concentraciones de aceite de Muña al 2 % y 3%

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias					95% de intervalo de confianza de la diferencia	
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de desv. estándar	Inferior	Superior
efect	Se asumen varianzas iguales	1,741	,257	-3,619	4	,022	-2,46667	,68150	-4,35882	-,57451
	No se asumen varianzas iguales			-3,619	3,058	,035	-2,46667	,68150	-4,61243	-,32090

Con respecto al grupo 1 que uso la concentración de muña al 1 % y el grupo 3 que uso la concentración de muña al 3 %, en la Tabla 17 se puede observar que el valor de P es igual a 0,008, puesto que el valor-P de la prueba es menor que 0.05, existe diferencia

significativa, por lo tanto, la biopelícula con concentración de aceite esencial de Muña al 3 % es significativamente diferente a las demás.

Tabla 17. Prueba t- Student de los grupos con concentraciones de aceite de Muña al 1 % y 3 %

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de dev. estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
efect	Se asumen varianzas iguales	,117	,750	-4,956	4	,008	-4,03333	,81377	-6,29272	-1,77394
	No se asumen varianzas iguales			-4,956	3,967	,008	-4,03333	,81377	-6,30006	-1,76661

En el gráfico 4, se puede observar como el grupo 3 que es la biopelícula de quitosano con aceite esencial de muña al 3 % muestra una diferencia estadística significativa ante las demás.

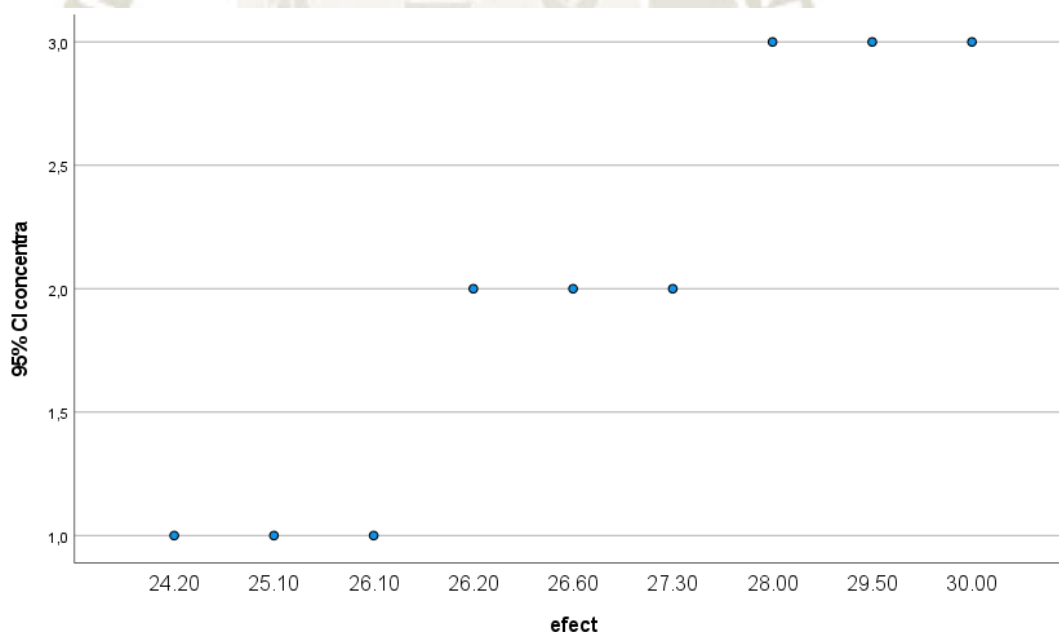


Gráfico 3. Prueba de t-Student.

Existen diferentes trabajos de investigación que han demostrado el efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, como los de Carhuapoma et al. (2009)¹⁰⁷, quienes validaron la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Minthostachys mollis*, demostrando en manera cuantitativa su efecto

antimicrobiano frente a cuatro cepas Gram negativas (-) como *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella tiphy* y *Pseudomona aeruginosa*, Camacho (2011)¹⁰⁸ que estudió el efecto antibacteriano de la muña (*Minthostachys setosa*) frente a *Escherichia coli* y *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, concluyendo que el aceite esencial tiene actividad antimicrobiana, también Torre Negra et al., (2016) (2015)^{23,109} confirmaron en sus estudios que la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Scherichia coli*.

Efecto antioxidante

Para poder determinar el efecto antioxidante usando espectrofotómetro es necesario tener una curva patrón la cual se muestra en la Tabla 18 el cual muestra los resultados de la curva de calibración.

Tabla 18. Datos obtenidos en el espectrómetro para la construcción de la curva de calibración y controles.

ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE			
Nro. Muestra	Um TE	Abs	%Inhibición
1	200	0.975	6.75210406
2	400	0.890	14.8814078
3	600	0.785	24.9234889
4	700	0.745	28.7490436
5	900	0.701	32.9571538
CT1	1.048		
CT2	1.053		
CT3	1.036		
PROMEDIO	1.0456		

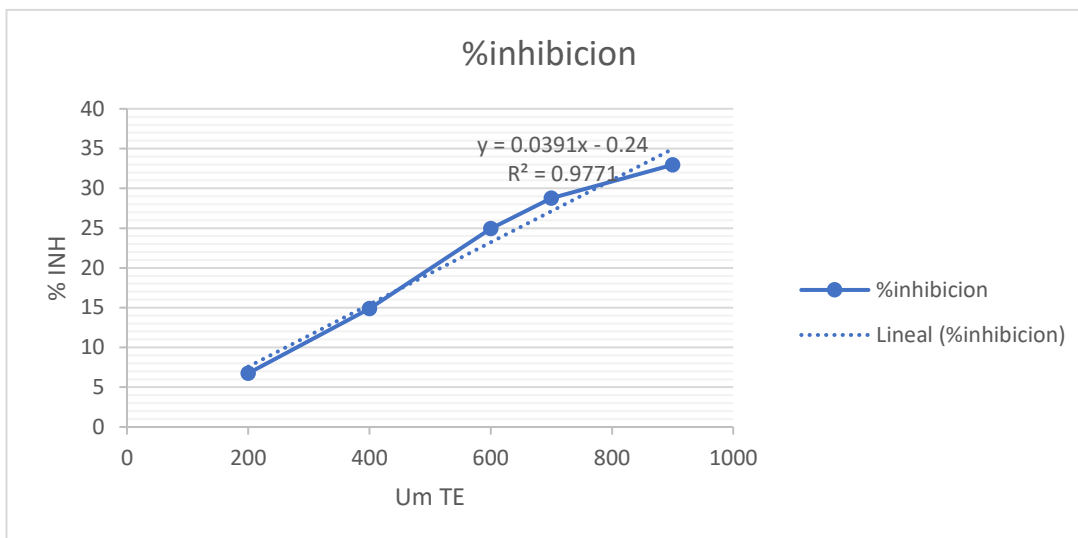


Gráfico 4. Curva de calibración en base a la concentración y % de inhibición.

Evaluamos la capacidad antioxidante partiendo de la curva de calibración de referencia (Gráfica 5), usando una concentración conocida de Trolox nos dio determinadas absorbancias para poder hallar el porcentaje de inhibición con el promedio de los controles. De los resultados obtenidos vemos que, a concentraciones de 700, 800, 900 um TE obtenemos un % de Inhibición mayor al 15 %, la cual es más recomendable como lo indica Granados (2012)³⁴ para poder determinar que la biopelícula si tiene actividad antioxidante, partiendo de estas concentraciones se tomó como factores de dilución 1/1, 1/5, 1/19 y 1/20, al momento de trabajar con las biopelículas. De la curva de calibración puedo hallar la fórmula para comprobar el manejo del operador resultando así un valor de $R^2 = 0.9771$ y se sacó un promedio como se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Tabla de resultados del promedio del porcentaje de inhibición de las biopelículas

Muestra	Absorbancia			% Inhibición			Promedio %INH	
	Dilución n	Ra	Rb	Rc	Ra	Rb		Rc
P1	1	0.946	0.949	0.953	2.8082	2.5000	2.089	2.47
P2	1	0.935	0.92	0.93	2.5026	4.0667	3.024	3.19
P3	1	0.9444	0.955	0.948	4.4212	3.3075	4.01662	3.92

Otros autores al realizar sus ensayos estadísticos obtuvieron resultados satisfactorios, como se ve en la (Tabla 20).

Tabla 20. Resumen Estadístico para Actividad antioxidante.

Biopelícula	Capacidad Inhibitoria %	Referencia
QUITOSANO + CERA DE ABEJA	28.96 - 11.64	Nevena (2015)
QUITOSANO	7.8 - 66.6	Sameh (2018)
QUITOSANO + PEPTOIDES	Set-16	Elchinger (2017)

En estos resultados evaluamos la capacidad de eliminación del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH) ya que este es un radical estable coloreado y tiene la capacidad de aceptar protones obtenidos de entidades oxidante en este caso nuestra biopelícula puede ser o no captadora de radicales libres que actúan como átomos de hidrogeno o donadores de electrones y así ver si hay o no decoloración total debido al máximo atrapamiento de radicales DPPH. En los siguientes estudios como reporta Nevena (2015)¹¹⁰ en sus biopelículas, los valores del porcentaje de inhibición teniendo como mayor porcentaje 28.96 % y 11.64 % el mínimo. De la misma manera Sameh (2018)¹¹¹ reporta como mayor porcentaje 66.6 ± 0.3 y $7.8 \pm 0,4$ como menor valor en su análisis de varianza. Elchinger (2017)¹¹² publica un artículo en relación a la actividad antioxidante del quitosano registrando un porcentaje entre 9 y 16 % que al adicionar peptoides en un mayor tiempo logra una mejor captación de radicales libres.

De nuestras absorbancias podemos observar que tienen cierta relación con los controles realizados en la curva de calibración, pero nuestros porcentajes de inhibición son muy bajos registrando valores que no muestran, efecto de la capacidad antioxidante, estos resultados se ven a primera instancia en muestras no diluidas; los valores registrados en las muestras diluidas tienen un rango mucho más bajo, por lo que no es necesario considerar. El quitosano aparenta tener capacidad antioxidante, pero es importante mencionar que se puede ver afectada esta capacidad, por los grupos NH_2 al ser bloqueados por el procedimiento en el desarrollo de la biopelícula, además el aceite de muña en conjunto aporta cierta cantidad pero en conjunción con el

quitosano más otros factores como tiempo, luz y la variabilidad puede haber afectado el resultado ya que al tener una cantidad tan mínima cualquier factor puede disminuir su capacidad antioxidante.

Resultados estadísticos en el STATGRAPHICS.

Mediante el programa de Statgraphics se procesaron los datos obtenidos del efecto antioxidante como se muestra en la Tabla 21.

Tabla 21. Resumen Estadístico para Actividad antioxidante.

Concentración de muña	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Mínimo
1	3	69.2009	9.22788	13.3349%	59.5663
2	3	89.0509	18.9347	21.2627%	73.5283
3	3	106.265	14.4176	13.5677%	90.7278
Total	9	88.1722	20.5157	23.2678%	59.5663

La Tabla 22 ANOVA descompone la varianza de Actividad antioxidante en dos componentes: un componente entre grupos y un componente dentro-de-grupos. La razón-F, que en este caso es igual a 4.75195, es el cociente entre el estimado entre grupos y el estimado dentro-de-grupos. Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre la media de Actividad antioxidante entre un nivel de Concentración de Muña y otro, con un nivel del 95.0 % de confianza (Gráfico 5).

Tabla 22. ANOVA para Actividad antioxidante por Concentración de muña.

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2064.07	2	1032.03	4.75	0.0580
Intra grupos	1303.09	6	217.181		
Total (Corr.)	3367.15	8			

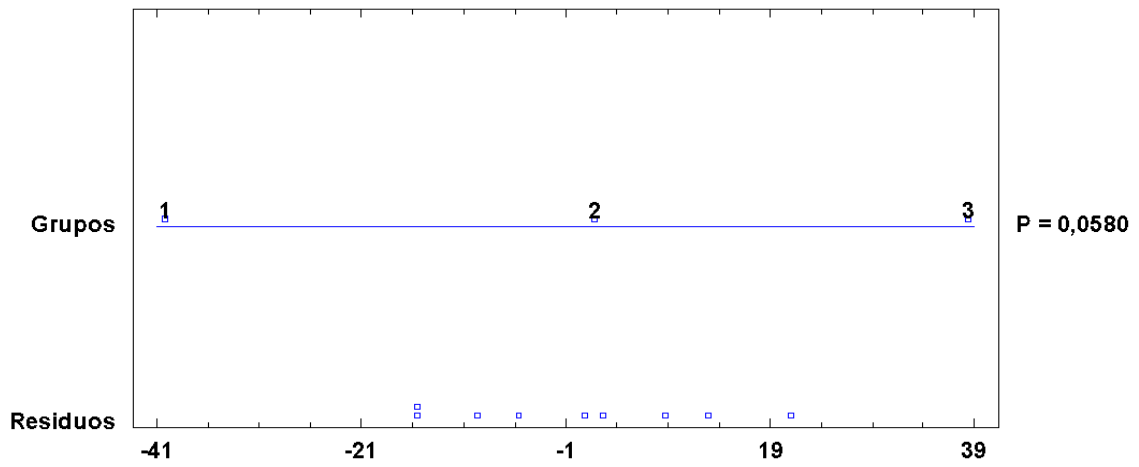


Gráfico 5. De ANOVA en el efecto antioxidante.



CONCLUSIONES

PRIMERA. De acuerdo a los resultados obtenidos del trabajo de investigación se concluye que, la biopelícula compuesta por quitosano a partir de exoesqueletos de camarón y aceite esencial de Muña (*Minthostachis mollis*) confiere un efecto antimicrobiano ante la cepa *Echerichia coli* obteniendo así una diferencia significativa menor ($p < 0.05$) a diferencia del efecto antioxidante el cual, no reportó diferencia significativa.

SEGUNDA. Se logró un óptimo proceso de fermentación y extracción de quitina obteniendo un 94 % de desmineralización mediante el método de cenizas y un 33 % de desproteínización siguiendo la metodología de Kjeldahl, dándole un valor agregado a estos desechos.

TERCERA. La extracción del quitosano del exoesqueleto de *Cryphiops caementarius* (Camarón de río) recolectado de la zona de Corire de la región Arequipa, obtuvo un rendimiento de 58.5 % en peso y un grado de desacetilación del 80.84 % el cual fue obtenido en base a la N-acetilación. Dando un valor agregado como material biológico para su utilización, debido a su estructura como se muestra en su caracterización por espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), mostrando sus grupos característicos de amida (I y II), hidroxilos y la presencia de la tensión C-O, característica del quitosano.

CUARTA. Se logró la extracción de aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) a partir de hojas secas, utilizando el método de destilación por arrastre de vapor de agua, con un rendimiento de 0.48 %. Existe un rango aproximado en el rendimiento de aceites entre 0.01 – 2.00 %, colocando nuestro resultado dentro del rango establecido.

QUINTA. Al comparar el efecto antimicrobiano de las biopelículas elaboradas a partir de quitosano con diferentes concentraciones de aceite de muña (1%, 2% y 3%), se evidenció un mayor efecto inhibitorio en la biopelícula al 3% frente a la cepa bacteriana *Echerichia coli*. Este resultado fue visto en el análisis estadístico concluyendo así una diferencia significativa de la biopelícula al 3% frente a las demás concentraciones.

SEXTA. A partir de la evaluación del efecto antioxidante, no se logró obtener resultados positivos, ya que el efecto antioxidante de la biopelícula a diferentes concentraciones de esencial de muña puede perder debido a factores físicos a los cuales fue sometida la biopelícula, por lo que requiere un mayor análisis.

RECOMENDACIONES

Ampliar estudios de investigación sobre la producción de biopelículas de quitosano con aceite de muña como un empaque natural para cubrir frutos, mejorando y optimizando las concentraciones de quitosano y aceite esencial, para lograr un bioempaque mucho más resistente y con propiedades que favorezcan a la industria alimentaria.

Extraer el quitosano aprovechando los desechos de crustáceos provenientes de industrias o negocios pesqueros, como alternativa de innovación en el desarrollo de productos con valor añadido y un potencial desarrollo de una planta de economía circular a partir de productos marinos y de la misma forma con la extracción de aceites esenciales a partir de residuos agroindustriales tales como las cáscaras de frutos cítricos.

Orientar este trabajo de investigación en la agrobiodiversidad peruana, siendo un ejemplo, el uso de estas biopelículas con diferentes aceites esenciales y su potencial uso para la aplicación en cultivos nativos tales como aguaymanto, uva, lúcuma, etcétera con el fin de prevenir infecciones de una manera natural contra diversos hongos y bacterias comunes y por ende evitar la pérdida de grandes campos de cultivo.

Mediante este trabajo se promueve a que estudios posteriores se enfoquen en un análisis más profundo sobre las propiedades y efectos de la biopelícula compuesta por quitosano y aceite de muña.

Evaluar el comportamiento del aceite esencial de muña que fue incorporado a la biopelícula ya que este presenta fenoles lo que beneficia a la captación de radicales libres por lo que sería recomendable estudiar el porqué de su inactivación al momento de mezclarse con la biopelícula e inhibir su capacidad antioxidante.

BIBLIOGRAFIA

1. Rodríguez-Martínez A V., Sendón R, Abad MJ, González-Rodríguez M V., Barros-Velázquez J, Aubourg SP, et al. Migration kinetics of sorbic acid from polylactic acid and seaweed based films into food simulants. *LWT - Food Sci Technol.* 2016;65:630–6.
2. Salmieri S, Acroix MOL. Physicochemical Properties of Alginate / Polycaprolactone-Based Films Containing Essential Oils *AND.* 2006;
3. Mahdi S, Rezaei M, Hadi S, Mohamad S, Hosseini H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chem [Internet].* 2010;122(1):161–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.033>
4. Dutta PK, Tripathi S, Mehrotra GK, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chem [Internet].* 2009;114(4):1173–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.047>
5. Bougueraa FZ, Essabti F, Mouhri S El, Ettiqaqi S. Effect of Deacetylation Time Degree of deacetylation. 2018;(Dd):1263–5.
6. Pérez, Prieto. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de. 2007;
7. Polo G. IM. Sostenibilidad : Obtención De. 2016; Available from: [https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/50471/Polo Galindo%2C Ignacio María.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/50471/Polo%20Galindo%20Ignacio%20María.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
8. Kaya M, Baran T, Asan-Ozusaglam M, Cakmak YS, Tozak KO, Mol A, et al. Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2015;20(1):168–79.
9. Varlamov VP, Il'ina A V., Shagdarova BT, Lunkov AP, Mysyakina IS. Chitin/Chitosan and Its Derivatives: Fundamental Problems and Practical Approaches. *Biochem.* 2020;85:154–76.

10. Feofilova EP. Chronicle of the eighth international conference “Modern perspectives in chitin and chitosan studies.” *Appl Biochem Microbiol.* 2007;43(4):473–473.
11. Islam S, Bhuiyan MAR, Islam MN. Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering. *J Polym Environ.* 2017;25(3):854–66.
12. Yadav M, Goswami P, Paritosh K, Kumar M, Pareek N, Vivekanand V. Seafood waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials. *Bioresour Bioprocess* [Internet]. 2019;6(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0243-y>
13. Marcia E, Malespín J, Sánchez M, Benavente M. Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. *Nexo Rev Científica.* 1970;24(1):33–42.
14. Colina M, Ayala A, Rincón D, Molina J, Medina J, Ynciarte R, et al. Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos escala piloto e industrial. *Rev Iberoam Polímeros.* 2014;15(1):21–43.
15. Wasiw G. J, Yépez P. V. Evaluación Poblacional del Camarón *Cryphiops caementarius* en Ríos de la Costa Sur del Perú. *Rev Investig Vet del Perú.* 2015;26(2):166.
16. Moreno-Reyes JE, Méndez-Ruiz CA, Díaz GX, Meruane JA, Toledo PH. Composición química del camarón de río *Cryphiops caementarius* (Molina, 1782) (Decapoda: Palaemonidae) en dos poblaciones del norte de Chile: Consideraciones reproductivas y ambientales. *Lat Am J Aquat Res.* 2015;43(4):745–54.
17. Tan YN, Lee PP, Chen WN. Microbial extraction of chitin from seafood waste using sugars derived from fruit waste-stream. *AMB Express* [Internet]. 2020;10(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s13568-020-0954-7>
18. Marinela D, Colina N, Karen L, Medina D, Alejandro J, Colina V, et al.

- Ciencias Químicas. 2017;2:1–18.
19. Arévalo AP. Fermentación láctica de la cáscara de camarón con *Lactobacillus delbrueckii* para la obtención de quitina. 2016;
 20. Baca C. Efecto inhibitorio del aceite esencial “muña” *Minthostachys mollis* sobre el género *Proteus*, causantes de infecciones del tracto urinario. 2017;1–76. Available from:
http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/4777/Baca_Melo_Cynthia_Madeine.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 21. Alonso J, Desmarchelier C. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. Bases científicas para su aplicación en atención primaria de la salud. Buenos Aires: Fitociencia; 2006. 664 p.
 22. Diaz M. Determinación del rendimiento a diferentes tiempos de extracción de aceite esencial de la raíz *Salvia trifilis* Epling (mejorana) por el método de arrastre de vapor. *Agroindustrial Sci.* 2017;7(2):73–7.
 23. Torrenegra M, Granados C, Durán M, León G, Yáñez X, Martínez C, et al. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia* [Internet]. 2016;20(1):69–74. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/rori/v20n1/v20n1a08.pdf>
 24. Reyes García M, Gómez-Sánchez Prieto I, Espinoza Barrientos C, Bravo Rebatta, Fernando Ganoza Morón L. Tablas Peruanas De Composición De Alimentos Ministerio De Salud República del Perú [Internet]. Lima; 2009. Available from: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Tabla de Alimentos.pdf>
 25. González-guñez R, Silva-aguayo G, Urbina-parra A, Gerding- M. ACEITE ESENCIAL DE *Eucalyptus globulus* Labill Y *Eucalyptus nitens* H . Deane & Maiden (MYRTACEAE) PARA EL CONTROL DE *Sitophilus zeamais* Motschulsky ESSENTIAL OIL OF *Eucalyptus globulus* Labill AND *Eucalyptus nitens* H . Deane & Maiden (MYRTACEAE) FOR THE. 2016;204–16.

26. Glicerio LM, Osorio M del R, Martínez Useche SR. Comparación de dos métodos de extracción del aceite esencial de *Citrus sinensis* L. Comparison of two methods for extraction of essential oil from *Citrus sinensis* L. Rev Cuba Farm [Internet]. 2015;49(4):742–50. Available from: <http://scielo.sld.cu>
27. Peredo-Luna H, Palou-García E, López-Malo A. Aceites esenciales: métodos de extracción. Vol. 3, Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2009. p. 8.
28. A. A. EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *MINTHOSTACHYS MOLLIS* (TIPO) AL 25, 50, 100 % FRENTE A *PORPHYROMONAS GINGIVALIS* ESTUDIO IN VITRO. Tesis Univ Cent DEL ECUADOR Fac Odontol UNIDAD Investig TITULACIÓN Y Grad. 2016;53(9):1–111.
29. Huari G. Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial *Minthostachys mollis* (Muña) en *Streptococcus mutans*. 2014;97.
30. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Curr Med Chem. 2005;10(10):813–29.
31. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “Muña.” Cienc Invest. 2008;9(1):27–31.
32. Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. Lett Appl Microbiol. 2008;47(3):174–9.
33. Hernández M. Efecto antifúngico del aceite esencial de *Minthostachys Mollis* (Muña) sobre las cepas de *Cándida Albicans* ATCC10231. Estudio In Vitro. tesis UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE ODONTOLOGÍA CARRERA DE ODONTOLOGÍA. 2018.
34. Granados Conde C, Yáñez Rueda X, Santafé P, Gilmar G. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander Avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial das folhas e *mollis* *Minthostachys moritzianus* *Calycolpus* Norte. 2012;10(1):12–23.

35. P. G. Complementos nutricionales y alimentos funcionales. Acribia S. Zaragoza, España; 2007. 129–144 p. p.
36. Proestos C, Sereli D, Komaitis M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. *Food Chem.* 2006;95(1):44–52.
37. Dicko M, Gruppen H, Traoré A, Voragen AGJ, van Berkel WJ. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Biotechnol Mol Biol Rev.* 2006;1:21–38.
38. Trouillas P, Marsal P, Siri D, Lazzaroni R, Duroux JL. A DFT study of the reactivity of OH groups in quercetin and taxifolin antioxidants: The specificity of the 3-OH site. *Food Chem.* 2006;97(4):679–88.
39. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 2006;99(1):191–203.
40. Rizzo M, Ventrice D, Varone MA, Sidari R, Caridi A. HPLC determination of phenolics adsorbed on yeasts. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;42(1):46–55.
41. Stratil P, Klejdus B, Kubáň V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. *Talanta.* 2007;71(4):1741–51.
42. Dimitrios B. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci Technol.* 2006;17(9):505–12.
43. Tsao R, Deng Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2004;812(1-2 SPEC. ISS.):85–99.
44. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Sci Technol.* 1995;28(1):25–30.
45. Miliauskas G, Venskutonis PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.* 2004;85(2):231–7.
46. Castañeda C. B, Ramos Ll. E, Ibáñez V. L. Evaluación de la capacidad

- antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. *Horiz méd.* 2008;56–72.
47. López P. OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DE DESECHOS DEL EXOESQUELETO DE CAMARÓN TITÍ (*XIPHOPENAEUS RIVETI*) PARA EL DESARROLLO DE PELICULAS POLIMÉRICAS PLASTIFICADAS CON GLICERINA. Universidad de San Buenaventura; 2014.
 48. Solida RDEF. Fermentación láctica de cabezas de camarón (*Penaeus* sp) en un reactor de fermentación sólida. *Rev Mex Ing Química.* 2002;1(1–2):45–8.
 49. Sedaghat F, Yousefzadi M, Toiserkani H, Najafipour S. Bioconversion of shrimp waste *Penaeus merguensis* using lactic acid fermentation: An alternative procedure for chemical extraction of chitin and chitosan. *Int J Biol Macromol [Internet].* 2017;104:883–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.06.099>
 50. Patiño L, Saavedra A. Extracción por arrastre de vapor de aceite esencial del romero. 2014;239–52.
 51. Peña D, Gutiérrez M. Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* sobre microorganismos frecuentes en vías respiratorias bajas. *Rev Cienc Y Tecnol.* 2017;13(3):55–66.
 52. Cerón - Salazar I, Cardona - Alzate CC. Evaluación del proceso integral para la obtención de aceite esencial y pectina a partir de cáscara de naranja. 2011;65–86.
 53. Pumaylle KO, Ricardo L, Quiroz P, Liz D, Luján B, Justino R, et al. *Scientia Agropecuaria* Extracción , caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd Extraction , characterization and evaluation of antibacterial activity of essential oil of *Senecio graveolens* Wed. 2012;3:291–302.
 54. Zekaria D. Los aceites esenciales: una alternativa a los antimicrobianos [Internet]. 2006. Available from: https://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/wpsa1182855355a.pdf

55. Madera - Santana J, De Dios - Aguilar M, Colín - Chavez C, Mariscal - Amaro L, Nuñez - Colín C, Veloz - Garcia R, et al. Recubrimiento a base de quitosano y extracto acuoso de hoja de Moringa oleífera obtenido por UMAE y su efecto en las propiedades fisicoquímicas de fresa (*Fragaria x ananassa*). *Rev Ciencias Biológicas y la Salud*. 2019;11(2):155–63.
56. Cutter CN. The effectiveness of triclosan-incorporated plastic against bacteria on beef surfaces. *J Food Prot*. 1999;62(5):474–9.
57. Dickinson and Company. Patrón de turbidez BBL preparado McFarland Turbidity Standard No. 0.5. Bd [Internet]. 2005;3. Available from: [http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421\(0205\)_es.pdf](http://bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/8808421(0205)_es.pdf)
58. Hernández-Ochoa L, Gonzales-Gonzales A, Gutiérrez-Mendez N, Muñoz-Castellanos LN, Quintero-Ramos A. Estudio de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Rev Mex Ing Qum*. 2011;10(3):455–63.
59. Jing Y, Diao Y, Yu X. Free radical-mediated conjugation of chitosan with tannic acid: Characterization and antioxidant capacity. *React Funct Polym* [Internet]. 2019;135(September 2018):16–22. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2018.12.005>
60. Zhang W, Zhao H, Zhang J, Sheng Z, Cao J, Jiang W. Different molecular weights chitosan coatings delay the senescence of postharvest nectarine fruit in relation to changes of redox state and respiratory pathway metabolism. *Food Chem* [Internet]. 2019;289(March):160–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.03.047>
61. Weerakkody R, Labbett D, Cheng L, Kosaraju SL. Effect of Physicochemical Modifications on Antioxidant Activity of Water-soluble Chitosan. *Food Biophys*. 2011;6(1):127–32.
62. Determinación de actividad antioxidante.
63. Colobatiu L, Gavan A, Potarniche AV, Rus V, Diaconeasa Z, Mocan A, et al.

- Evaluation of bioactive compounds-loaded chitosan films as a novel and potential diabetic wound dressing material. *React Funct Polym* [Internet]. 2019;145(September):104369. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104369>
64. Rui L, Xie M, Hu B, Zhou L, Yin D, Zeng X. A comparative study on chitosan/gelatin composite films with conjugated or incorporated gallic acid. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2017;173:473–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.05.072>
65. Ren J, Li Q, Dong F, Feng Y, Guo Z. Phenolic antioxidants-functionalized quaternized chitosan: Synthesis and antioxidant properties. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2013;53:77–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.11.011>
66. Rosero Narvárez CJ. Bioconversión de desechos de crustáceos mediante fermentación láctica y maloláctica para la obtención de quitosano. Vol. 8. Universidad Centra del Ecuador; 2019.
67. Castro R, Guerrero-Legarreta I, Bórquez R. Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation. *Biotechnol Reports* [Internet]. 2018;20:e00287. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00287>
68. Dun Y, Li Y, Xu J, Hu Y, Zhang C, Liang Y, et al. Simultaneous fermentation and hydrolysis to extract chitin from crayfish shell waste. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2019;123:420–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.088>
69. Zhang H, Yun S, Song L, Zhang Y, Zhao Y. The preparation and characterization of chitin and chitosan under large-scale submerged fermentation level using shrimp by-products as substrate. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;96:334–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.017>
70. Martínez-lópez V, Trinidad S, Ruiz BS, Patricia L. Dinámica poblacional y aislamiento de bacterias ácido lácticas en lactosuero fermentado Dynamic

- population and lactic acid bacteria isolation from fermented whey. *Nov Sci*. 2016;
71. Ramírez López C, Vélez Ruiz J. Aislamiento, caracterización y selección de bacterias lácticas autóctonas de leche y queso fresco artesanal de cabra. *Inf Tecnol*. 2016;27(6):115–28.
 72. Rao MS, Stevens WF. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *J Chem Technol Biotechnol*. 2005;80(9):1080–7.
 73. Jung WJ, Kuk JH, Kim KY, Park RD. Demineralization of red crab shell waste by lactic acid fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005;67(6):851–4.
 74. Philibert T, Lee BH, Fabien N. Current Status and New Perspectives on Chitin and Chitosan as Functional Biopolymers. *Appl Biochem Biotechnol*. 2017;181(4):1314–37.
 75. Oh KT, Kim YJ, Nguyen VN, Jung WJ, Park RD. Effect of crab shell size on bio-demineralization with lactic acid-producing bacterium, *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* KCTC-3074. *Biotechnol Bioprocess Eng*. 2008;13(5):566–70.
 76. Ghorbel-Bellaaj O, Younes I, Maâlej H, Hajji S, Nasri M. Chitin extraction from shrimp shell waste using *Bacillus* bacteria. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2012;51(5):1196–201. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.034>
 77. Ghorbel-Bellaaj O, Hajji S, Younes I, Chaabouni M, Nasri M, Jellouli K. Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2013;61:243–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.001>
 78. Arbia W, Adour L, Amrane A, Lounici H. Optimization of medium composition for enhanced chitin extraction from *Parapenaeus longirostris* by

- Lactobacillus helveticus using response surface methodology. Food Hydrocoll [Internet]. 2013;31(2):392–403. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2012.10.025>
79. Salas Ovilla R, Rosas Quijano R, Galvez Lopez D. La quitina: lo mejor de los desechos marinos. Rev Cienc UANL [Internet]. 2017;84(2007–1175):7–10. Available from: https://www.researchgate.net/publication/326904237_LA_QUITINA_LO_MEJOR_DELOS_DESECHOS_MARINOS
 80. Tolaimate A, Desbrières J, Rhazi M, Alagui A, Vincendon M, Vottero P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. Polymer (Guildf). 2000;41(7):2463–9.
 81. Guo N, Sun J, Zhang Z, Mao X. Recovery of Chitin and Protein from Shrimp Head Waste by Endogenous Enzyme Autolysis and Fermentation. J Ocean Univ China. 2019;18(3):719–26.
 82. Aytakin O, Elibol M. Cocultivation of Lactococcus lactis and Teredinobacter turnirae for biological chitin extraction from prawn waste. Bioprocess Biosyst Eng. 2010;33(3):393–9.
 83. Flores-Albino B, Arias L, Gómez J, Castillo A, Gimeno M, Shirai K. Chitin and L(+)-lactic acid production from crab (Callinectes bellicosus) wastes by fermentation of Lactobacillus sp. B2 using sugar cane molasses as carbon source. Bioprocess Biosyst Eng. 2012;35(7):1193–200.
 84. Monter J., Tirado JM, Zamudio PB, Rios- C, Ornelas J de J, Salgado R, et al. Extracción y caracterización de propiedades fisicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de Brachystola magna (Girard). Rev Mex Ing Quim. 2016;15(3):749–61.
 85. Zubiria Suarez J, Jiménez De las Salas A. ECONOMICOS Y AMBIENTALES ANALYSIS METHODS FOR REMOVING WASTE CHITIN SHRIMP. 2014;(1):1–9.
 86. Narayan B, Velappan SP, Zituji SP, Nakkerike S. Yield and chemical

- composition of fractions from fermented shrimp biowaste. 2010;(March 2009):64–70.
87. Lara López MA. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO PROCEDENTE DEL HONGO GANODERMA AUSTRALE PARA APLICACIÓN EN BIOPOLÍMEROS. Univercidad Central del Ecuador; 2016.
 88. Ily Maza Mejía CJH. Caracterización Fisicoquímica de Quitosano para su Aplicación como Biosorbente de Metales. 2007;1–5.
 89. Abdel-Rahman RM, Hrdina R, Abdel-Mohsen AM, Fouda MMG, Soliman AY, Mohamed FK, et al. Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. Int J Biol Macromol [Internet]. 2015;80:107–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.06.027>
 90. Kaya M, Erdogan S, Mol A, Baran T. Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. Int J Biol Macromol [Internet]. 2015;72:797–805. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.09.034>
 91. Kaya M, Baran T. Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*). Int J Biol Macromol [Internet]. 2015;75:7–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.01.015>
 92. Kitin P, Ahyat NM, Mohamad F, Ahmad A, Azmi AA. CHITIN AND CHITOSAN EXTRACTION FROM *Portunus pelagicus*. Malaysian J Anal Sci. 2017;21(4):770–7.
 93. Benhabiles MS, Tazdait D, Abdi N, Lounici H, Drouiche N, Goosen MFA, et al. Assessment of coating tomato fruit with shrimp shell chitosan and N,O-carboxymethyl chitosan on postharvest preservation. J Food Meas Charact. 2013;7(2):66–74.
 94. Kumari S, Rath PK. Extraction and Characterization of Chitin and Chitosan from (*Labeo rohita*) Fish Scales. Procedia Mater Sci [Internet].

- 2014;6(Icmpc):482–9. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mspro.2014.07.062>
95. Escobar Sierra DM, Castro Ramírez AM, Vergara Castrillón NA. Determining the Relation between the Proportion of the Amino Group and the Degree of Deacetylation of Chitosan. 2013;73–88.
 96. Brugnerotto J, Lizardi J, Goycoolea FM, Argüelles-Monal W, Desbrières J, Rinaudo M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer (Guildf)*. 2001;42(8):3569–80.
 97. Llópiz Yurell J, Fernández G, Paneque A, Nieto O, Fernández M, Hidalgo C. Estudio de quitosanos cubanos derivados de la quitina de la langosta. *Rev Iberoam Polímeros*. 2009;10(1):11–27.
 98. Casado I. Optimización de la extracción de Aceites Esenciales por destilación en Corriente de Vapor. 2018;84.
 99. Castro MA. COMPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS TERPÉNICOS DEL ACEITE ESENCIAL DE MUÑA (*Minthostachys mollis*) EXTRAÍDOS DE LAS HOJAS FRESCAS Y SECAS. 2012.
 100. Fuertes Ruitón CM, Chipana Munguía Y. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb “Muña” de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Cienc Invest*. 2001;4(1):23–39.
 101. Carlos Yáñez AC, Rios N, Mora F, Rojas L, Diaz T, Velasco J, et al. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ambrosia peruviana* Willd. De los llanos venezolanos. *Rev Peru Biol*. 2011;18(2):149–51.
 102. Hromiš NM, Lazić VL, Markov SL, Vaštag ŽG, Popović SZ, Šuput DZ, et al. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax [Internet]. *JOURNAL OF FOOD ENGINEERING*. Elsevier Ltd; 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.001>
 103. Sole Beaty J, Atares Huerta L. Films activos de quitosano para la

- conservación de carne. 2016;1–37.
104. Torrenegra-Alarcón M, Granados-Conde C, Durán-Lengua M, León-Méndez G, Yáñez-Rueda X, Martínez C, et al. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia*. 2016;1(20):69.
 105. Quispe J. Caracterización fisicoquímica de, aceite esencial de la muña (*Minthostachys setosa*) y su estudio antibacteriano. 2015;115. Available from: http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3592/QuispeSanchez_J.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 106. Xu J, Zhou F, Ji BP, Pei RS, Xu N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*. 2008;47(3):174–9.
 107. Carhuapoma, M.; López, S.; Andamayo, D.; Bell C. Aceite esencial de “muña” *Minthostachys mollis*, Griseb y su efecto antibacteriano frente a cuatro cepas de bacterias Gram negativas. *Rev Acad Perú Salud*. 2009;16(2):51–3.
 108. Camacho H. Caracterización físicoquímica del aceite esencial de la muña (*Minthostachys setosa*) y su estudio antibacteriano. Universidad Nacional del Callao, Facultad de Ingeniería Química Callao-Perú.; 2011.
 109. Alarcón MET, Melo GEM, González JG, Méndez GL. Actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales frente a microorganismos implicados en el acné. *Rev Cuba Farm*. 2015;49(3):512–23.
 110. Hromiš NM, Lazić VL, Markov SL, Vaštag ŽG, Popović SZ, Šuput DZ, et al. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. *J Food Eng*. 2015;158:86–93.
 111. Sameh S A, Kenawy E, Sonbol FI, Sun J, El-zawawy NA. Pharmaceutical Potential of a Novel Chitosan Derivative Schiff Base with Special Reference to Antibacterial , Anti-Biofilm , Antioxidant , Anti - Inflammatory , Hemocompatibility and Cytotoxic Activities. 2019;31527.
 112. Elchinger PH, Delattre C, Faure S, Roy O, Badel S, Bernardi T, et al.

Antioxidant Activities of Peptoid-Grafted Chitosan Films. Appl Biochem Biotechnol [Internet]. 2017;181(1):283–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-016-2212-7>

ANEXOS

ANEXO 1

Tabla ANOVA para el efecto antimicrobiano por Concentración de muña

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	24,8067	2	12,4033	16,20	0,0038
Intra grupos	4,59333	6	0,765556		
Total (Corr.)	29,4	8			

PRUEBA NO PARAMÉTRICA

Prueba de Kruskal-Wallis para Actividad antimicrobiana por Concentración de muña

<i>Concentración de muña</i>	<i>Tamaño Muestra</i>	<i>Rango Promedio</i>
1	3	2,0
2	3	5,0
3	3	8,0

Estadístico = 7,2 Valor-P = 0,0273237

La Prueba de Kruskal-Wallis la cual compara las medianas en lugar de las medias.

La prueba de Kruskal-Wallis evalúa la hipótesis de que las medianas de Actividad antimicrobiana dentro de cada uno de los 3 niveles de Concentración de muña son iguales. Primero se combinan los datos de todos los niveles y se ordenan de menor a mayor. Luego se calcula el rango (rank) promedio para los datos de cada nivel. Puesto que el valor-P es menor que 0,05, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas con un nivel del 95,0% de confianza.

PRUEBA DE T- STUDENT

1-2

Estadísticas de grupo

	concentra	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
efect	1	3	25,1333	,95044	,54874
	2	3	26,7000	,55678	,32146

2-3

Estadísticas de grupo

	concentra	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
efect	2	3	26,7000	,55678	,32146
	3	3	29,1667	1,04083	,60093

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de desv. estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
efect	Se asumen varianzas iguales	1,741	,257	-3,619	4	,022	-2,46667	,68150	-4,35882	-,57451
	No se asumen varianzas iguales			-3,619	3,058	,035	-2,46667	,68150	-4,61243	-,32090

1-3

Estadísticas de grupo

	concentra	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
efect	1	3	25,1333	,95044	,54874
	3	3	29,1667	1,04083	,60093

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene de igualdad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de desv. estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
									Inferior	Superior
efect	Se asumen varianzas iguales	,117	,750	-4,956	4	,008	-4,03333	,81377	-6,29272	-1,77394
	No se asumen varianzas iguales			-4,956	3,967	,008	-4,03333	,81377	-6,30006	-1,76661