Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Formulación de Biopelículas de Quitosano funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña" con propiedad antioxidante y antimicrobiana

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Bach. Kaysser Alberto VILLAR CALERO

ASESOR

Dr. César Máximo FUERTE RUITÓN

Lima, Perú

2021



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Villar, K. (2021). *Formulación de Biopelículas de Quitosano funcionalizadas con aceite esencial de Minthostachys mollis "Muña" con propiedad antioxidante y antimicrobiana*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	**Kaysser Alberto Villar Calero**
DNI	**73932202**
URL de ORCID	**No aplica**
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	**César Máximo Fuertes Ruitón** .
DNI	**15289369**
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-6170-3549
Datos de investigación	
Línea de investigación	B.2.1.3. Recursos Alimenticios
Grupo de investigación	NATURE-NATURAL RESOURCES RESEARCH
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Programa de Promoción de Tesis de Pregrado. A18040761-PTPGRADO.
Ubicación geográfica de la investigación	**Edificio:** Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara" **País:** Perú **Departamento:** Lima **Provincia:** Lima **Distrito:** Lima - Calle: Jr. Puno N°1002 **Latitud:** -12.056239 **Longitud:** -77.023377
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 – 2019
URL de disciplinas OCDE	Recubrimiento, Películas https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#2.05.03

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

FORMULACIÓN DE BIOPELÍCULAS DE QUITOSANO FUNCIONALIZADAS CON ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* "MUÑA" CON PROPIEDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA

Que presenta el Bachiller en Farmacia y Bioquímica:

KAYSSER ALBERTO VILLAR CALERO

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado Evaluador, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

18 SOBRESALIENTE

---

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

JURADO EVALUADOR (R.D. N.° 000013-2021-D-FFB/UNMSM)

- Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
- Dra. María Elena Salazar Salvatierra
- Dra. Norma Julia Ramos Cevallos
- Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz

Lima, 13 de julio de 2021.

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera
Presidente

DEDICATORIA

A mis padres Bruno Villar Pillaca y Maxima Calero Guerra por su infinito apoyo en mi formación profesional, quienes, con su ejemplo, inculcaron que la mejor manera de lograr las metas es con el atrevimiento, la perseverancia e inteligencia.

A mi hermano Brunws Villar quien con sus logros inculcó en mí la iniciativa de la formación universitaria, el liderazgo y servicio al prójimo.

A mi hermano Klisman Villar, por el gran soporte emocional en los momentos más difíciles que demandó la formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor César Fuertes Ruitón, un gran amigo y maestro que, con su total apertura para participar, formular y desarrollar proyectos de investigación, inculcó el valioso valor de la investigación, como soporte para desarrollar innovaciones.

A mis amigos, tanto docentes y alumnos del equipo de investigación ASEDIREN, cátedra de Química General e Inorgánica y Centro Federado por generar los más gratos momentos y recuerdos en mi etapa de formación universitaria, por sus consejos y enseñanzas y por las oportunidades dadas para demostrar y crecer en las habilidades que hoy me permiten un gran desempeño en mi vida profesional y personal.

A los docentes y personal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, que me brindaron su gentil apoyo en las distintas actividades desarrolladas durante mi etapa universitaria.

Un especial agradecimiento al **Vicerectorado de Investigación y Posgrado (VRIP)** y al equipo de investigación **NATURE-NATURAL RESOURCES RESEARCH** por la confianza depositada y brindarme la oportunidad de participar, en calidad de tesista, en el proyecto de investigación: ***BIOPELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO Y GOMA NATURAL FUNCIONALIZADAS CON ACEITES ESENCIALES DE Minthostachys mollis "Muña" Y Piper carpunya "Pinku", CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA***; identificado con el código: **A18040761** y ratificado bajo la Resolución Rectoral **03202-R-18** del 04 de Junio del 2018.

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA i
AGRADECIMIENTOS ii
ÍNDICE iv
ÍNDICE DE FIGURAS vii
ÍNDICE DE TABLAS viii
ABREVIATURAS ix
RESUMEN x
SUMMARY xi
I. INTRODUCCIÓN 1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 1
1.1.1. Descripción de la Situación Problemática 1
1.1.2. Formulación del problema 2
1.2. OBJETIVOS 3
1.2.1. OBJETIVO GENERAL 3
1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 3
1.3. IMPORTANCIA Y ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN 3
1.4. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN 4
II. MARCO TEÓRICO 5
2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO 5
2.2. BASES TEÓRICAS 6
2.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS BIOPELÍCULAS 7
2.2.1.1. PROPIEDADES MECÁNICAS 7
2.2.1.2. PROPIEDADES DE BARRERA 7
2.2.1.3. PROPIEDADES ÓPTICAS Y APARIENCIA 8
2.2.1.4. PROPIEDADES ESTRUCTURALES 8
2.2.2. COMPONENTES DE LAS BIOPELÍCULAS 9
2.2.2.1. PROTEÍNAS 10
2.2.2.2. POLISACÁRIDOS 11
2.2.2.2.1.Polisacáridos de origen animal 11
2.2.2.2.2.Polisacáridos de origen vegetal 12
2.2.2.2.3.Polisacáridos de origen marino 13
2.2.2.2.4.Polisacáridos microbianos 14
2.2.2.3. LÍPIDOS 15
2.2.2.3.1.Aceites y grasas 16
2.2.2.3.2.Aceites esenciales 16
2.2.2.3.3.Ceras 17

2.2.2.3.4.Resinas 17
2.2.2.3.5.Plastificantes 17
2.2.2.3.6.Emulsificantes 18
2.2.3. PREPARACIÓN DE BIOPELÍCULAS 18
2.2.4. GÉNERO MINTHOSTACHYS 19
2.2.4.1. ESPECIES DE MINTHOSTACHYS EN EL PERÚ 20
2.2.4.2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE *Minthostachys mollis* "Muña" 20
2.2.4.3. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE *Minthostachys mollis* "Muña" 21
2.2.4.4 CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA 22
2.2.4.5. USOS Y APLICACIONES DE LA ESPECIE *Minthostachys mollis* "Muña" 23
2.2.4.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA ESPECIE *Minthostachys mollis* "Muña" 24
2.2.4.7. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* "Muña" 24
2.2.4.8. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys Mollis* "Muña" 24
2.2.5. DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES DEL QUITOSANO 26
2.2.5.1. DESCRIPCIÓN 26
2.2.5.2. BIOPELÍCULAS DE QUITOSANO 28
2.2.5.3. PROPIEDAD ANTIMICROBIANA 29
2.3. GLOSARIO DE TÉRMINOS 30
III. HIPÓTESIS Y VARIABLES 31
3.1. HIPÓTESIS 31
3.2. VARIABLES 31
3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES 32
IV. MATERIALES Y MÉTODOS 33
4.1. ÁREA DE ESTUDIO 33
4.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN 33
4.3. POBLACIÓN Y MUESTRA 34
4.4. PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN 34
4.4.1. MATERIALES Y EQUIPOS 34
4.4.1.1. Materia prima 34
4.4.1.2. Reactivos químicos y materiales 34
4.4.1.3. Insumos y utensilios 35
4.4.1.4. Equipos e instrumentos 35
4.4.2. MÉTODOS 36
4.4.2.1. RECOLECCIÓN Y CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA 36
4.4.2.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA 36
4.4.2.3. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES 36
4.4.2.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL 36

4.4.2.5. PREPARACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS 37
4.4.2.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 38
4.4.2.6.1.Preparación del DPPH 38
4.4.2.6.2.Preparación de la muestra 39
4.4.2.6.3.Actividad captadora del radical libre DPPH 39
4.4.2.7 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA 39
4.4.2.7.1.Preparación del inóculo 39
4.4.2.7.2.Ensayo de la zona inhibición 40
4.4.2.8. EVALUACIÓN DE PROPIEDAD MECÁNICA 41
4.4.2.8.1.Fuerza de tracción 41
4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 42
V. RESULTADOS 43
5.1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA 43
5.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL 43
5.3. PREPARACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS 46
5.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE 47
5.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA: MÉTODO ZONA DE INHIBICIÓN 49
5.6. EVALUACIÓN DE PROPIEDAD MECÁNICA 56
5.6.1. Fuerza de tracción 56
VII. DISCUSIÓN 57
VIII. CONCLUSIONES 62
IX. RECOMENDACIONES 63
X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 64
XI. ANEXOS 78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de envases comestibles y sus funciones 9
Figura 2. Sistematización de incorporación de proteínas en las biopelículas 10
Figura 3. Comportamiento de lípidos (micelas) en solución acuosa y solvente orgánico 15
Figura 4. Ácidos grasos esenciales de las plantas 16
Figura 5. Distribución de todas las especies de Minthostachys 21
Figura 6. Planta de la Muña (*Minthostachys mollis*) 22
Figura 7. Descripción taxonómica de *Minthostachys mollis* 22
Figura 8. Estructura química de la celulosa, quitina y quitosano 26
Figura 9. Proceso de obtención de quitosano tradicional de los caparazones de crustáceo 27
Figura 10. Biopelícula de quitosano 28
Figura 11. Texturometro digital AEL 200, evaluando la fuerza de tracción de las biopelículas 41
Figura 12. Cromatograma GC-SM del AE de Muña. Siendo la mentona y la pulegona los componente en mayor cantidad, con una concentración de 32,72% y 40,94% respectivamente 45
Figura 13. La serie F (F1-F9) representa a las biopelículas con aceite esencial de Muña, la composición de cada biopelícula obedece al asignado en la Tabla 4. La serie B (B1-B3) representa a las biopelículas sin aceite esencial de Muña, la composición de cada biopelícula es acorde al asignado en la Tabla 4. 46
Figura 14. Porcentaje de actividad antioxidante de las biopelículas de la serie B (B1-B3) y biopelículas de la serie F (F1-F9). Las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$). 47
Figura 15. Porcentaje de actividad antioxidante de las biopelículas (3%, 2% y 1% de quitosano) sin aceite esencial y con aceite esencial al 5%, 2% y 0.5%. 48
Figura 16. Zonas de inhibición desarrolladas frente a *Escherichia coli* por las biopelículas control (B1, B2 y B3) y sistemas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9. 51
Figura 17. Zonas de inhibición desarrolladas frente a *Staphylococcus aureus* por las biopelículas control (B1, B2 y B3) y sistemas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9. 52
Figura 18. Zonas de inhibición desarrolladas frente a *Staphylococcus epidermidis* por las biopelículas control (B1, B2 y B3) y sistemas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9. 53
Figura 19. Zonas de inhibición desarrolladas frente a *Aspergillus niger* por las biopelículas control (B1, B2 y B3) y sistemas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9. 54
Figura 20. Actividad antimicrobiana de las diferentes biopelículas frente a los diversos patógenos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspegillus niger)* mediante el índice de severidad 55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Uso medicinal de la Muña 23

Tabla 2. Composición química de la Muña 24

Tabla 3. Especificaciones organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial de Muña 25

Tabla 4. Diseño para el estudio de la influencia de la concentración de quitosano (Q_0) y aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña" (As Es). 34

Tabla 5. Composición cuantitativa de cada biopelícula formada. Siendo la serie F biopelículas con aceite esencial de Muña en su composición y la serie B biopelículas sin contener aceite esencial de Muña. 38

Tabla 6. Escala de índice de severidad en biopelículas 40

Tabla 7. Composición y tiempo de retención del aceite esencial de *Minthostachys mollis* 44

Tabla 8. Valores obtenidos del índice de severidad para las biopelículas formuladas Frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Aspergillus niger*. 50

Tabla 9. Fuerza de tracción de las biopelículas sintetizadas. 56

ABREVIATURAS

m.s.n.m	:	metros sobre el nivel del mar
DPPH	:	2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo
Q_o	:	quitosano
AE	:	aceite esencial
mL	:	mililitro
mg	:	miligramo
v/v	:	volumen sobre volumen
µL/mL	:	microlitro sobre mililitro
F1,…, F9	:	Formulación de biopelícula N° 1 que contiene quitosano y aceite esencial, … , Formulación de biopelícula N° 9 que contiene quitosano y aceite esencial
B1, … , B3	:	Formulación de biopelícula (blanco) N° 1 sin aceite esencial, … , Formulación de biopelícula (blanco) N° 3 sin aceite esencial

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo central evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de las biopelículas formuladas a base de quitosano y funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña". Para ello se formularon 12 biopelículas (preparadas de manera aleatorizada) con distintas concentraciones de aceite esencial de Muña (AE) y quitosano (Q_0): F1 (Q_0 3% y AE 5%), F2 (Q_0 2% y AE 0.5%), F3 (Q_0 1% y AE 2%), F4 (Q_0 1% y AE 0.5%), F5 (Q_0 3% y AE 0.5%), F6 (Q_0 3% y AE 2%), F7 (Q_0 1% y AE 5%), F8 (Q_0 2% y AE 5%), F9 (Q_0 2% y AE 2%), B1 (Q_0 1%), B2 (Q_0 2%), B3 (Q_0 3%); una vez elaboradas las biopelículas se les realizó la prueba física de fuerza de tracción y determinación de la actividad antioxidante mediante la actividad captadora de radicales libre (DPPH) y la actividad antimicrobiana mediante ensayo de zona de inhibición. Las biopelículas funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña" mostraron que su propiedad mecánica: fuerza de tracción, fue disminuida y su actividad antioxidante ($p < 0,05$) fue potenciada. Así mismo las biopelículas funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña" mostraron inhibición de crecimiento bacteriano (*Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis y Escherichia coli*) y fúngico (*Aspergillus niger*). En conclusión se obtuvieron biopelículas que potencialmente podrían ser empleadas en recubrimiento de alimentos para mejorar su conservación; siendo las biopelículas: F3 (Q_0 1% y AE 2%) y F7 (Q_0 1% y AE 5%), las que presentaron adecuadas actividades antioxidante y antimicrobiana y propiedades mecánicas.

Palabras clave: biopelícula de quitosano, aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña", propiedad mecánica, bioactividad.

SUMMARY

The main objective of this research was to evaluate antioxidant and antimicrobial activity of biofilms formulated based on chitosan and functionalized with essential oil of *Minthostachys mollis* “Muña”. For this, 12 biofilms (prepared randomly) were formulated with different concentrations of Muña essential oil (EO) and chitosan (Q_0): F1 (Q_0 3% and EO 5%), F2 (Q_0 2% and EO 0.5%) , F3 (Q_0 1% and EO 2%), F4 (Q_0 1% and EO 0.5%), F5 (Q_0 3% and EO 0.5%), F6 (Q_0 3% and EO 2%), F7 (Q_0 1% and EO 5%), F8 (Q_0 2% and EO 5%), F9 (Q_0 2% and EO 2%), B1 (Q_0 1%), B2 (Q_0 2%), B3 (Q_0 3%); once the biofilms were made, the physical test of traction force and determination of the antioxidant activity were carried out by means of the free radical scavenging activity (DPPH) and the antimicrobial activity by means of the zone of inhibition test. Biofilms functionalized with essential oil of *Minthostachys mollis* “Muña” showed that their mechanical property: traction force, was decreased and their antioxidant activity ($p < 0.05$) was enhanced. Likewise, biofilms functionalized with essential oil of *Minthostachys mollis* “Muña” showed inhibition of bacterial growth (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli*) and fungal (*Aspergillus niger*). In conclusion, biofilms were obtained that could potentially be used in food coating to improve their preservation; biofilms being: F3 (Q0 1% and EO 2%) and F7 (Q0 1% and EO 5%), those presented adequate antioxidant and antimicrobial activities and mechanical properties..

Key words: chitosan biofilm, *Minthostachys mollis* “Muña” essential oil, mechanical properties, bioactivity.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1. Descripción de la Situación Problemática

Las biopelículas de quitosano hoy en día tienen una gran importancia en la economía del mundo. Esto, debido a que se ha demostrado que es un biopolímero que puede ir reemplazando el uso del plástico por ser degradable, compatible con alimentos, e incluso comestible[1].

Actualmente las tendencias encaminan a la población a buscar envases que produzcan un mínimo de contaminación o que sean biodegradables para logar un menor impacto negativo en el mundo.

Ello lleva a que las biopelículas de quitosano y otras, obtengan más valor y que se continúe con el desarrollo de nuevas tecnologías que buscan mejorar las propiedades de las biopelículas, como es el caso del uso de aceites esenciales (compuestos terpénicos) para aumentar la calidad de las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua[2, 3]; sin embargo, los trabajos donde se abordar la adición de AE a biopelículas de quitosano aún son escasos[4], ello se debe a la alta volatilidad de los aceites esenciales[5].

El AE de *Minthostachys mollis* "Muña"*,* en numerosos estudios ha mostrado tener una actividad bactericida y bacteriostática frente a microorganismos como las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y otras; también ha mostrado actividad fungicida frente a *Aspergillus niger*[6]. El AE de *Minthostachys mollis* también posee actividad antioxidante cuando es usada a concentraciones mayores a 200 ppm[7]. La importancia del uso de este AE de *Minthostachys mollis* "Muña"*,* radica en la poca toxicidad y efectos secundarios que puede causar[8, 9].

Es por ello que el uso concomitante del AE de *Minthostachys mollis* "Muña" en las biopelículas a base de quitosano resultan muy interesantes en estudiar por el gran potencial de actividad antimicrobiana y antioxidante que puedan tener.

1.1.2. Formulación del problema

Problema General

¿De qué manera se puede elaborar biopelículas de quitosano funcionalizadas con AE de *Minthostachys mollis* “Muña” y conocer su actividad antioxidante y antimicrobiana?

Problema Específico

1. ¿Qué terpenos forman parte de la composición del AE de *Minthostachys mollis* “Muña?
2. ¿De qué manera se puede elaborar biopelículas de quitosano funcionalizadas con AE de *Minthostachys mollis* “Muña”?
3. ¿Cuál es la capacidad antioxidante de las biopelículas de quitosano y AE de *Minthostachys mollis* “Muña al ser evaluado mediante pruebas de DPPH?
4. ¿Cuál es la capacidad antibacteriana de las biopelículas de quitosano y AE de *Minthostachys mollis* “Muña” frente a las bacterias: *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis y Escherichia coli*?
5. ¿Cuál es la capacidad antifúngico de las biopelículas de quitosano y AE de *Minthostachys mollis* “Muña” frente al hongo: *Aspergillus niger*?

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

Formular biopelículas de quitosano funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” y determinar su propiedad antioxidante y antimicrobiana

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el AE de *Minthostachys mollis* “Muña”
2. Formular y elaborar biopelículas a partir de quitosano y el AE de *Minthostachys mollis* “Muña”.
3. Determinar la actividad antioxidante de las biopelículas mediante pruebas de DPPH
4. Determinar la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis y Escherichia coli*.
5. Determinar la actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger*

1.3. IMPORTANCIA Y ALCANCE DE LA INVESTIGACIÓN

La preocupación latente por el negativo impacto hacia el ambiente que causa el uso de materiales de embalaje plásticos, no biodegradables, ha conllevado a la búsqueda de nuevos materiales que brinden una alternativa ecoamigable. Dando como producto a nuevos materiales que ofrecen la posibilidad de obtener películas delgadas para cubrir alimentos frescos o procesados para extender su vida útil.

Las biopelículas comestibles o simplemente biopelículas brindan ventajas adicionales como: comestibilidad, biocompatibilidad, apariencia estética, barrera a los gases, no toxicidad, no polución y su bajo costo. Además, las biopelículas sin o con aditivos alimentarios (antioxidantes, antimicrobianos), se han considerado en la preservación de alimentos por su capacidad para prolongar el tiempo de vida del alimento.

El quitosano después de la celulosa es el biopolímero natural con mayor abundancia. Este exhibe actividad antibacteriana y antifúngica además de alta capacidad para formar biopelículas sin la adición de plastificantes, lo cual lo hace un excelente recurso para la producción de biopelículas.

1.4. LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

Entre las limitaciones a mencionar, uno de los problemas principales encontrados está ligado a la disposición de equipos, horario de uso y personal adecuado para ejecutar las metodologías, la cual dificultó la ejecución de la parte experimental.

Otra problemática suscitada es la disposición de material (insumos, reactivos entre otros) los cuales tienen costos elevados y no pueden ser fácilmente costeados por los tesistas. Cabe resaltar que gracias al apoyo de la plana docente de los institutos de investigación se pudo disponer del uso de algunos insumos los cuales facilitaron la ejecución de la parte experimental.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Los últimos años las biopelículas han logrado mantener la atención de muchas personas, debido a su singular característica para preservar alimentos. El desarrollo de esta tecnología viene acompañada de dos razones: las nuevas tendencias de alimentación saludable, donde el alimento debe ser mínimamente procesado (más natural, mejor calidad, producto seguro) y el deseo por aumentar la vida media del alimento fresco[10].

El uso de las biopelículas permite aumentar la calidad de las frutas y verduras frescas porque genera una barrera entre ellos y su entorno, lo que prolonga su vida útil. Otro hecho relevante de las biopelículas es que se pueden comer con total seguridad, como si fueran parte del producto[11].

"Las biopelículas se constituyen por tres elementos: polímero, disolvente y plastificante. Las técnicas usuales para elaborar biopelículas son: eliminación del disolvente; gelificación térmica; por solidificación entre otras"[10].
En la presente tesis se abordó el uso de biopelículas a base de quitosano, las cuales son descritas más adelante en la sección: 4*.6.2. BIOPELÍCULAS DE QUITOSANO*

Vázquez en el trabajo de investigación titulado: "Recubrimientos y películas comestibles a base de quitosano con aceite esencial de *Cymbopogon citratus* aplicados en guayava (*Psidium guajava* L.)", concluyó que el AE de *Cymbopogon citratus* al ser usado para formular biopelículas de quitosano cumple el roll de ser fuente de compuestos antioxidantes. Así mismo la adición de AE de *Cymbopogon citratus* generó un cambio positivo sobre la propiedad de barrera de las biopelículas de quitosano, como: sensibilidad a la humedad. Así también el uso de esta biopelícula extendió la vida útil de la guayaba al reducir el crecimiento de microbiano. En consecuencia se genera un biopolímero prometedor para el recubrimiento de alimentos[12].

Ruiz en el trabajo de investigación titulado: “Aplicación de Quitosano con Aceites Esenciales contra *Botrytis cinerea* Pers. “Moho Gris” en *Lycopersicon esculentum* P. Mill “Tomate””, concluyó que: el uso de biopelículas de quitosano con AE de *O. vulgare* sobre tomates infectados con moho gris, redujo en un 24% tal infección durante su periodo de almacenamiento a una temperatura ambiente. Así mismo el uso de biopelículas no afecto las características sensoriales del tomate[13].

Cázarez en el trabajo de investigación titulado: “Efecto del aceite esencial de *Tagetes lucida* en una biopelícula de quitosano sobre *Botrytis cinérea* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi)”, concluyó que al usar biopelículas de quitosano con AE de *Tagetes lucida* sobre frutos de zarzamora Cv. Tupi, permitió una disminución de la dureza pero con un mínimo de cambios en la deformidad a temperaturas de 25°C y 4°C de almacenamiento[14].

2.2. BASES TEÓRICAS

Biopelícula es un término actualmente empleado en la literatura microbiana como en la literatura de nuevos materiales plásticos. La presente tesis aborda a la biopelícula en lo referente a materiales plásticos. Así mismo el término: biopelícula, en la literatura se muestra con sinónimos equivalentes como: películas, películas comestibles y biopelículas comestibles[15 – 19].

La biopelícula se define como una o varias capas continuas y delgadas de biopolímeros que pueden mejorar los atributos sensoriales, incrementar la vida útil de un alimento y ser consumido por los seres vivos[15, 16, 17].
Así mismo los biopolímeros son polímeros obtenidos de una fuente natural como los organismos vivos, o aquellos que son obtenidos de fuentes renovables que muestran una alta capacidad de biodegradación[18].

2.2.1. PROPIEDADES FÍSICAS DE LAS BIOPELÍCULAS

Las propiedades físicas de las biopelículas se agrupan en cuatro categorías: propiedades mecánicas, propiedades de barrera, propiedades ópticas y de apariencia y propiedades estructurales[4].

2.2.1.1. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas de las biopelículas incluyen: resistencia a la tracción, alargamiento, deformabilidad y módulo elástico. Estos son de suma importancia en los materiales de embalaje, ya que deben tener una resistencia mecánica adecuada para mantener su integridad durante la manipulación y el almacenamiento[20].

2.2.1.2. PROPIEDADES DE BARRERA

La calidad de los alimentos es afectada por migración de componentes volátiles, vapor de agua y gases que van hacia el ambiente. Ello generara sabores desagradables, deshidrataciones, oxidaciones, entre otros en los alimentos[21]. Las biopelículas previenen este tipo de problemática evitando la migración de tales sustancias y en consecuencia obteniendo alimentos con mayor calidad.

Las propiedades de barrera de una biopelícula son las que determinan el paso o impedimento de diferentes gases a través de ella[22]. La permeabilidad de los gases sobre la biopelícula se da cuando estos se solubilizan y luego difunden. Los gases inicialmente se disuelven en la biopelícula y luego a consecuencia de la gradiente de concentración, se difunden a través de ella[21, 23].

La permeabilidad al vapor de agua y permeabilidad a los gases, son propiedades de barrera estudiadas en las biopelículas por su aplicación en los alimentos.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA): Es una propiedad ampliamente estudiada en las biopelículas, debido a la importante función del agua en las reacciones de deterioro de los alimentos[24] y se define como: “la cantidad de vapor de agua que atraviesa un material por unidad de superficie, cuando entre sus paredes existe una diferencia de presiones, en condiciones de humedad relativa y temperatura específicas”[25]. Esta propiedad se determina por varios métodos, generalmente técnicas gravimétricas y el método descrito acorde norma ASTM

E96/E96M-10[26].

Permeabilidad a gases: La permeabilidad a los gases CO_2 y O_2 en las biopelículas son ampliamente estudiadas ya que tienen relación directa con la oxidación de los alimentos[27]. Para determinar la permeabilidad a los gases CO_2 y O_2 se emplea biopelículas aisladas, así mismo se puede hacer uso del método de acumulación en celdas que requiere cromatografía de gases[21].

2.2.1.3. PROPIEDADES ÓPTICAS Y APARIENCIA

La apariencia de una biopelícula se determina por la aceptación final del producto, por ello el color, brillo y translucidez son características muy importantes en las biopelículas[22].

Para medir estos atributos de las biopelículas, se emplean diferentes equipos, generalmente para determinar el color superficial se emplea un colorímetro, la opacidad mediante el uso de un espectrofotómetro y el brillo mediante el uso de un reflectómetro. El brillo, color, transparencia de las biopelículas varían acorde a su composición química y estructura[28].

2.2.1.4. PROPIEDADES ESTRUCTURALES

“Las propiedades de las biopelículas dependen de varios factores estructurales tales como: la relación entre la zona cristalina y amorfa, la movilidad de la cadena polimérica y las interacciones entre los grupos funcionales de los hidrocoloides, lípidos y aditivos”[21, 22]. “Para caracterizar la estructura de los biopolímeros y determinar la relación entre la química estructural del polímero y las propiedades físico-químicas y mecánicas de las biopelículas se pueden utilizar varias técnicas, tales como: microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X, calorimetría diferencial de barrido, análisis térmico mecánico y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier”[21].

2.2.2. COMPONENTES DE LAS BIOPELÍCULAS

Los componentes base utilizados en la formación de biopelículas son: proteínas, polisacáridos y lípidos[29]. Los polisacáridos más usados para formular biopelículas son: pectinas, alginatos, almidones, almidones modificados y gomas. Para el caso de proteínas se emplean: gelatina, queratina, proteína de soya, gluten de trigo, zeína y otros. Los materiales lipídicos, utilizan ceras, glicéridos, resinas y ácidos grasos[29, 30]. "Adicionalmente el uso de plastificantes, emulsificantes y otros aditivos es debido a que modifican sus propiedades físicas o funcionales[30, 31].

La sinergia de cada componente implementado logra un incremento de las propiedades de cada compuesto por lo que las propiedades de barrera y mecánicas dependen de los componentes que formen la matriz de la biopelícula (Figura 1)[32].

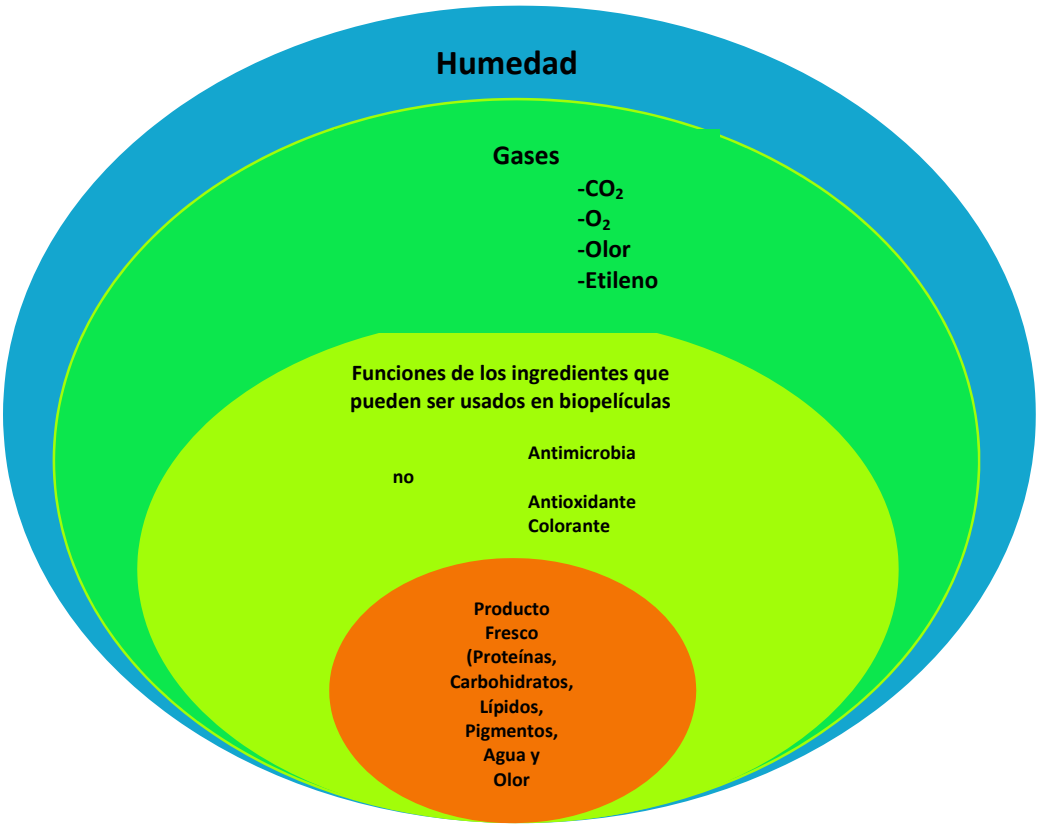


Figura 1. Representación esquemática de envases comestibles y sus funciones[33]

.

2.2.2.1. PROTEÍNAS

Las proteínas se pueden encontrar de forma natural, como proteínas globulares o proteínas fibrosas; las fibrosas están unidas entre sí en paralelo y las globulares se envuelven sobre sí mismas[34]. Las proteínas consideradas para ser usadas en la formación de biopelículas son: el caseinato, el suero láctico, el colágeno y la zeína (Figura 2)[33].



Figura 2. Sistematización de incorporación de proteínas en las biopelículas[33]

El caseinato tiene adecuadas características para la producción de biopelículas emulsionadas, por su naturaleza anfifílica (un producto que contiene en su molécula uno o muchos grupos hidrofílicos y uno o muchos grupos lipofílicos), su estructura desordenada y la capacidad de formar puentes de hidrógeno[33].

El suero láctico es una buena barrera para el CO_2 pero frágil. Las propiedades mecánicas mejoran al adicionar un agente plastificante, por ejemplo: glicerol. Para la fabricación de biopelículas, el primer paso es obtener una solución concentrada de proteínas sobre la cual se aplica calor para desnaturalizar las proteínas. Después de esto, se refrigera para eliminar el gas encerrado y obtener el material del paquete[33].

Las biopelículas obtenidas **con colágeno**, son utilizadas desde hace mucho tiempo en productos cárnicos, como embutidos. El beneficio que da esta película es evitar perder humedad y dar un aspecto uniforme al producto, mejorando sus propiedades estructurales[35].

La zeína es una prolamina y la proteína principal del maíz. Es un material relativamente hidrófobo y termoplástico porque es fuerte, brillante, resistente a bacterias, insoluble en agua, antioxidante y biopelícula adhesiva[33].

2.2.2.2. POLISACÁRIDOS

Las biopelículas basadas en polisacáridos se caracterizan por ser no tóxicas y estar abundantemente disponibles en la naturaleza. Además, posee permeabilidad selectiva al oxígeno y dióxido de carbono[36]. Esta característica permite que las biopelículas a base de polisacárido prolonguen la vida útil de las frutas, una dificultad de los polisacáridos es la baja permeabilidad al agua[33].

2.2.2.2.1. Polisacáridos de origen animal

Quitina y quitosano. La quitina es el biopolímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa. Es obtenido del exoesqueleto de los crustáceos, las paredes celulares de hongos y otros materiales biológicos. Por medio de la desacetilación de la quitina, se obtiene el quitosano.

Es preciso mencionar que al darse la desacetilación de la quitina siempre queda un pequeño porcentaje de grupos –N-acetilo en la estructura del quitosano[33].

Estructuralmente cabe mencionar que la quitina es una estructura cuyo polímero de repetición se nombra: β-(1→4) 2 acetamino-2 deoxi-D glucopiranosa. Y el quitosano al tener 100% de desacetilación se nombra: β-(1→4)-2-amino-2-deoxi-D-glucopiranosa[37].

El quitosano, derivado de la quitina posee actividad antibacteriana y antifúngica, además posee una gran capacidad de formación de biopelículas[38, 39]. Debido a sus características, como la biodegradabilidad, la no toxicidad y la biocompatibilidad, es usado en la industria alimentaria, química y biomédica[36]. El quitosano se caracteriza por ser insoluble en agua y soluble en solventes ácidos, como ácido clorhídrico diluido, ácido fórmico y ácido acético[40]. La actividad

antibacteriana del quitosano radica en su naturaleza policatiónica, que permite la interacción y formación de complejos polielectrólicos con polímeros que se producen en la superficie de las bacterias. El quitosano tiene la capacidad de reducir la pérdida de agua al crear una barrera semipermeable que controla el intercambio de gases, de esa manera mantiene los productos vegetales durante períodos prolongados[41].

2.2.2.2.2. Polisacáridos de origen vegetal

Celulosa y derivados de celulosa. La es el compuesto orgánico con mayor abundancia en la tierra, formado por unidades de D-glucoiranosa unidas a través de enlaces glucósidos β-1,4. Los derivados de celulosa son empleado para formar biopelículas naturales de bajo costo, ya que son sustancias insípidas, inodoras y biodegradables[39]. Los derivados de celulosa más utilizados son carboximetilcelulosa, metilcelulosa e hidroxipropilo metilcelulosa[42]. En particular, se ha informado que la carboximetilcelulosa es un polímero soluble en agua con gelatinización térmica y excelentes propiedades de formación de biopelícula[43]. Sin embargo, las biopelículas derivadas de celulosa presentan barreras de vapor de agua pobres debido a la inherente naturaleza hidrofílica de este compuesto.

Almidón. Es un polisacárido compuesto de amilasa (25%) y amilopectina (75%)[44] ampliamente disponible en la naturaleza y se produce para biopelículas biodegradables de tela, ya que las biopelículas de almidón son transparentes, sin sabor, incoloras e insípidas[45]. La mayor fuente de almidón es el maíz, pero también se puede obtener del trigo, la tapioca, la papa y el arroz. Las biopelículas con alto contenido de almidón de amilosa exhiben impermeabilidad al oxígeno, resistencia al aceite, termosensibilidad y solubilidad en agua y otras características físicas similares a las biopelículas de plástico. Pueden retrasar el crecimiento microbiano al disminuir la actividad del agua.

Pectina. Son un grupo de polisacáridos derivados de plantas que se encuentran en frutas y verduras, la mayoría extraídas de la cáscara de cítricos y el orujo de manzana[46]. La pectina (E440) es un polisacárido aniónico con estructura de ácido α-D-galacturónico (1 → 4) y se usa en productos alimenticios como gelificantes, estabilizantes y espesantes como yogures, mermeladas, leche y helados[47, 48]. La

pectina se divide en dos categorías; dependiendo de su grado de metilación, estas son pectinas de bajo metoxilo y pectinas de alto metoxilo, con un grado respetable de metoxilación inferior y superior a 50%. Este grado de metoxilación tiene un efecto decisivo sobre el mecanismo de gelación[32].

Goma arábiga. Se obtiene de tallos de varias especies de acacia y es el polisacárido más empleado industrialmente porque presenta propiedades únicas de emulsificación, formación de biopelícula y encapsulación[49] y está compuesto de galactosa, arabinosa, ramnosa y ácido glucorónico[50]. En la actualidad, se utiliza en la industria alimentaria para aromatizar, confitería y panadería, y también en la industria farmacéutica y cosmética[51]. Se ha aplicado en tomates, plátanos y papayas para mejorar la calidad y la vida útil[16, 52].

2.2.2.2.3. Polisacáridos de origen marino

Alginato. Es un polisacárido derivado del álcido algínico, extraído de las algas marinas de la familia Phaeophyceae; están compuestas por ácidos D-manuronico y ácido α-glucorónico unidades por enlaces 1-4; en general, las secuencias de M y G en la cadena dependen de la fuente de alginato y la edad de la planta[36]. La formación de geles mediante la adición de iones de calcio involucra los bloques G, por lo que a mayor concentración de unidades G, mayor resistencia al gel[53]. Los recubrimientos a base de alginato también son útiles para la conservación de los alimentos[54].

Carragenano. Es un polímero soluble en agua sulfatada, extraídos de varias algas rojas de la familia Rhodophyceae. Se utilizan en la industria alimentaria, láctea y farmacéutica, como la gelificación, la emulsión y la estabilización de ingredientes[55]. Tres tipos principales de carragenanos son: k, l y λ-carragenanos, ellos dependen de la posición de los grupo sulfato, Fabra y col informan que el mecanismo de formación de biopelícula de carragenano incluye gelificación durante el secado a temperatura moderada, lo que lleva a una biopelícula sólida formada por polisacáridos de doble hélice después de la evaporación del solvente[56, 57].

2.2.2.2.4. Polisacáridos microbianos

Goma Gellan. Es una clase de polisacárido producido por la bacteria *Sphingomonas elodea* (antiguamente clasificada como *Pseudomonas elodea*) y presenta propiedades coloidales y gelificantes únicas y buena capacidad para formar películas[58]. El uso de goma gellan en la industria alimentaria está aumentando porque se está usando como agente texturizante y gelificante[59], también es usado como transportador de aditivos alimentarios, como agentes antienvejecimiento y antimicrobianos, colorantes, saborizantes, y nutracéuticos[60, 61]. Los recubrimientos a base de goma gellan se han aplicado eficazmente sobre vegetales frescos cortados, como manzanas, mangos, melones y peras para mejorar la vida útil y la calidad[62].

Goma xantana. Es un exopolisacárido sintetizado por la bacteria *Xanthomonas campestris*, es un compuesto generalmente reconocido seguro como estabilizador de alimentos, espesante y emulsionante[63]. La solución viscosa se forma en agua fría o caliente. La goma xantana es estable a un alto rango de pH, temperatura y a la degradación enzimática[64]. Tiene una estructura de residuos de β-D-glucosa unidos a 1,4 y una cadena lateral de trisacárido unido a residuos de D-glucosa alternos. La cadena de trisacáridos está formada por el ácido β-D-manosa-1-4-β-D-galacturónico: 1-2-α-D-manosa[65]. Los recubrimientos a base de goma Xantana se han usado recientemente para mejorar la calidad y el tiempo de la vida útil de los alimentos, también como portadores de compuestos bioactivos de tuna mínimamente procesada[66] y manzanas frescas cortadas[67], entre otras frutas.

2.2.2.3. LÍPIDOS

Los lípidos son compuestos que tienen la capacidad de ser disolventes orgánicos miscibles o apolares, pero pocos de ellos contienen micelas formadoras de partes hidrófilas e hidrófobas (Figura 3)[68].

Las biopelículas basadas en lípidos cuentan con beneficios como minimizar la pérdida de humedad, proporcionar brillo y reducir la complejidad y costo del empaque[69]. La presentación de lípidos puede afectar algunas características de las biopelículas, siendo la barrera frente a la humedad la más afectada. Las ceras animales y vegetales tienen una barrera de humedad de mayor eficiencia que las resinas, monoglicéridos, diglicéridos, alcoholes grasos, emulsionantes y agentes tensioactivos[70].

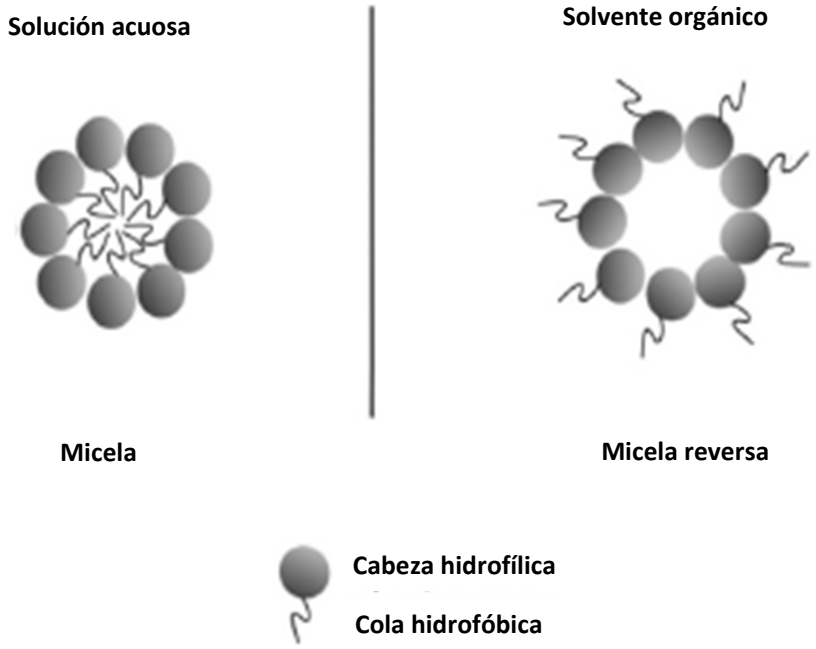


Figura 3. Comportamiento de lípidos (micelas) en solución acuosa y solvente orgánico[33]

2.2.2.3.1. Aceites y grasas

Los aceites y grasas son mezclas de triglicéridos que provenientes de plantas y animales, respectivamente. Tales mezclas, químicamente son similares diferenciándose en el aspecto físico, siendo los aceites líquidos y las grasas sólidas[71]. La Figura 4 representa químicamente los compuestos de lípidos que son comunes en diferentes aceites, tales como aceite de canola, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de salvado de arroz, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de palma; solo la manteca de cacao, el aceite de coco y el aceite de maní están exentos de linolénico[72].

Las biopelículas a base de lípidos han demostrado tener buenas propiedades de barrera al vapor de agua, resistencia al agua, alargamiento y transparencia[73]. Estas biopelículas se pueden probar en alimentos, por ejemplo para recubrir hamburguesas de carne de cerdo para aumentar la calidad de los alimentos[74].

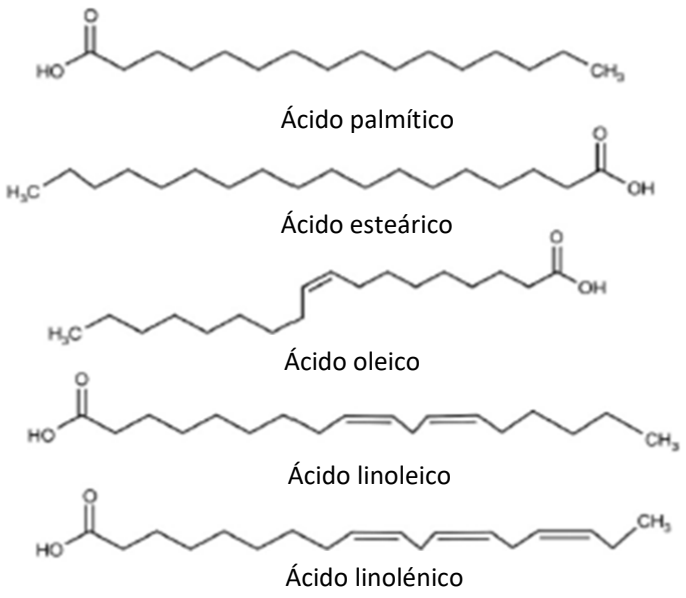


Figura 4. Ácidos grasos esenciales de las plantas[33]

2.2.2.3.2. Aceites esenciales

Los AE son extractos ricos en compuestos terpénicos hidrófobos y volátiles. Contienen una importante actividad antimicrobiana debido a los terpenos, terpenoides y componentes aromáticos de los que se forman[75].

2.2.2.3.3. Ceras

Las ceras tienen un peso molecular más alto porque están formadas por ésteres (ácido de cadena larga + alcohol de cadena larga). Las ceras son de origen animal y vegetal. Tienen una función de protección que cubre los tejidos. Estos son útiles en biopelículas para reducir la eficacia de la permeabilidad a la humedad para una alta hidrofobicidad[69]. Sin embargo, las biopelículas con ceras sufren desventajas, como ser quebradizas o formar una matriz rígida; esto depende mucho de los otros componentes y concentraciones de cera.

Sin embargo, las ceras no son malos materiales para biopelículas; Por ejemplo, Chiumarelli y Hubinger[76] reportaron una biopelícula con propiedades de barrera, propiedades mecánicas y propiedades de estructura excelentes. Dicha biopelícula estaba compuesta por almidón de yuca, glicerol, cera de carnauba y ácido esteárico.

2.2.2.3.4. Resinas

Las resinas son producidas por las células vegetales para responder a lesiones o infecciones en los árboles y arbustos. Las resinas son translúcidas con tonos marrón amarillento mayormente y físicamente son sólidas o semisólidas[24]. Las biopelículas con resinas mejoran el brillo, la transparencia y estabilidad de la emulsión sólida. Las propiedades de barrera al vapor de agua, gases, muestran ser muy óptimas[77].

2.2.2.3.5. Plastificantes

Los plastificantes, compuestos de bajo peso molecular aumentan la flexibilidad y la resistencia de un material. La adición de plastificantes en la biopelícula o el recubrimiento ayuda a aumentar la permeabilidad al agua y los gases debido a la capacidad de reducción de las fuerzas intermoleculares en un polímero. El glicerol y los polisorbatos son plastificantes populares[78].

La adición de diversos plastificantes lipídicos mejoran las biopelícula al aumentar el espesor y reteniendo la humedad necesaria[79].

2.2.2.3.6. Emulsificantes

Los emulsificantes son sustancias de carácter iónico que ayudan a reducir la tensión superficial entre dos fases inmiscibles, permitiendo ser miscibles. La función principal es prevenir la separación de fases al mantener el equilibrio hidrofílico-lipofílico[28]. Los emulsificantes con mayor importancia para la formación de biopelículas son las lecitinas; son una mezcla o fracciones de fosfolípidos, se originan en lecitina de huevo animal o lecitina de soja vegetal[80].

La lecitina de soja usada en la formación de biopelículas mejora el color, opacidad, solubilidad y microestructura[81].

2.2.3. PREPARACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Las formación de biopelículas se debe a las fuerzas intermoleculares como: la interacción electrostática o iónica y enlaces covalentes, por ello se requiere que las moléculas estén disueltas. Para poder disolver los biopolímeros se debe: modificar el pH del medio, adicionar sales, aumentar la temperatura de la solución, realizar una modificación enzimática, usar solventes de grado alimenticio o adicionar otros productos químicos[82].

Es muy importante controlar las condiciones del proceso para formar biopelículas, porque una alteración en el proceso tiende a cambiar las características finales de la biopelícula[83].

Para producir biopelículas se puede emplear el método húmedo y el método seco. El método seco no requiere el uso de solventes; dos ejemplos de este método son: la extrusión y el prensado en caliente. El prensado en caliente aplica calor a temperaturas que sobrepasen al punto de fusión para fundir el material. El método húmedo utiliza solventes para dispersar los materiales formadores de biopelícula, seguido de un secado o deshidratado para eliminar el solvente y darle consistencia a la biopelícula[84].

Los materiales forman una estructura de gel, con todos los ingredientes, siendo indiferente el proceso usado. Los hidrocoloides son gelatinizados o gelificados para formar biopelículas, los mecanismos de formación de la mayoría de los biopolímeros después de la gelificación aún no son determinados con claridad[84].

Cuando el hidrocoloide está solubilizado se incluye los lípidos y aditivos necesarios, estas emulsiones se emplean para recubrimientos o para la preparar biopelículas. Para formar un recubrimiento en el alimento, se aplica la atomización o la inmersión de la emulsión sobre el alimento[20, 24]. Las biopelículas se obtienen pro procesos de: extrusión y laminación o por preformado en placa (*casting*), estos procesos también se emplean en la industria de los polímeros sintéticos[20]. El principal método para formar biopelículas es removiendo el solvente por evaporación y preformado en placa, este método se emplea para componentes dispersos en una solución acuosa, tal técnica consiste en verter la solución en moldes, luego se elimina el solvente por secado. En este proceso se controla el espesor de la biopelícula por medio de aplicadores, así mismo se controla la velocidad y temperatura de secado porque influyen en la estructura cristalina y propiedades finales de la biopelícula[23].

2.2.4. GÉNERO MINTHOSTACHYS

Minthostachys es un género de arbustos aromáticos que crece abundantemente en elevaciones medias, está presente en los Andes desde el Venezuela hasta Argentina[85].

A lo largo de su área de distribución, las poblaciones de Minthostachys habitan en hábitats secos, abiertos y muy perturbados, así como en bosques húmedos/nublados[85].

2.2.4.1. ESPECIES DE MINTHOSTACHYS EN EL PERÚ

En el Perú se reportan 8 especies de Minthostachys[86, 87]

- *Minthostachys andina* (Britton) Eplin.
- *Minthostachys glabrescens* (Bentham) Epling
- *Minthostachy mandoniana* (Briquet) Epling
- *Minthostachys mollis (Kunth)* Griseb.
- *Minthostachys salicifolia* Epling
- *Minthostachys setosa* (Briquet) Epling.
- *Minthostachys spicata* (Bentham) Epling
- *Minthostachys tomentosa* (Bentham) Epling.

2.2.4.2. DESCRIPCIÓN GENERAL DE *Minthostachys mollis* "Muña"

Es especie es conocida como: "Muña", en la lengua quechua y como: "coa" o "huaycha" en la lengua aymara[88].

Esta especie arbustiva se caracteriza por ser aromática, crecer en pendientes pedregosas o rocosas, encontrarse en regiones altas y áridas. Esta especie se extiende desde los 2600 a 3800 msnm[86].

La especie *Minthostachys mollis* "Muña" crece en climas lluviosos y de elevada luminosidad y se distribuye geográficamente desde Colombia, Venezuela y Ecuador por el norte, a través de Brasil y Bolivia por el este, Perú al centro, Argentina por el sur de Sudamérica. (Figura 5)[89].

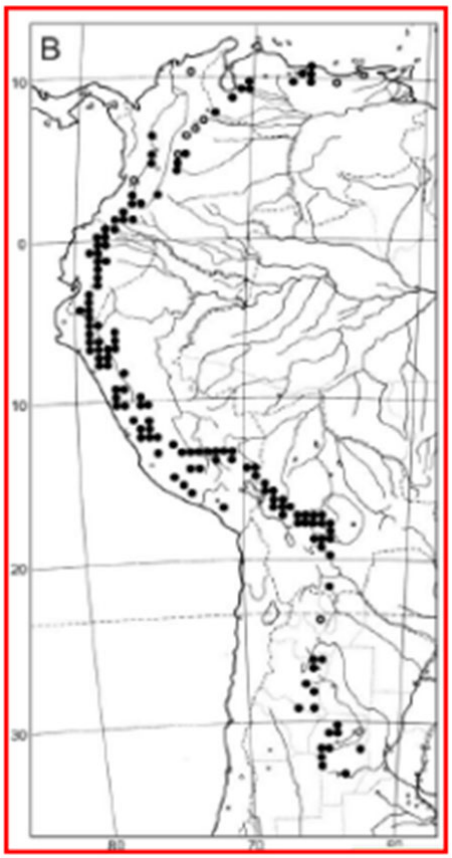


Figura 5. Distribución de todas las especies de Minthostachys[85]

2.2.4.3. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE *Minthostachys mollis* "Muña"

"Es una especie vegetal arbustiva aromática que pertenece a la familia Labiadas, esta especie llega a medir de 0,8 a 1,5 metros; se caracteriza por ser erecta, pubescente y frondosa en la zona superior y muy ramificada desde su base. Sus hojas son simples, asimétricas desde la base, decusadas, pecioladas, dentadas, pubescentes en el haz y en el envés (pelos glandulosos y pelos tectores). Las flores son pequeñas pentámeras, actinomorfas, tubulosas y dispuestas en forma variada, se encuentran en la parte superior de las ramas; su corola es de forma tubular, llega a medir de 2,5 – 4 mm de longitud, tiene estambres pequeños en la mitad del su tubo corolar; con ovario súpero, estilo ginecobásico y estigma bificado. El fruto es un folículo compuesto por cuatro mericarpos" (Figura 6)[90, 91].



Figura 6. Planta de la Muña (*Minthostachys mollis*) [89]

2.2.4.4. CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA

La Figura 7, muestra la descripción taxonómica de la especie *Minthostachys mollis* "Muña".

DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnoliopsida
SUBCLASE	:	Asteridae
ORDEN	:	Verbenales
FAMILIA	:	Lamiaceae
GENERO	:	Minthosthachys (Benth.) Spach
ESPECIE	:	*Minthostachys mollis* (Kunth) Grisebach

Figura 7. Descripción taxonómica de *Minthostachys mollis* [89]

2.2.4.5. USOS Y APLICACIONES DE LA ESPECIE *Minthostachys mollis* "Muña"

La Muña tiene el uso tradicional como digestivo, frente a cólicos, antiflatulento (carminativo), antihemético, antidiarreico, antitusígenas, antiasmático, expectorante[92], antiespasmódico[93], antiséptico, analgésico, antiinflamatorio, febrífugas y para atenuar jaquecas y soroche[92].

Se utiliza como condimento para preparar los alimentos, también se emplea para proteger los alimentos por ejemplo la papa frente a plaga de insectos[94], como fumigante orgánico frente al gorgojo de los andes y como antimoho[93].

En la industria agropecuaria usada para controlar: ectoparásitos y endoparásitos, así como en el control de parásitos en los animales domésticos y el tratamiento de sarna en equinos y camélidos (Tabla 1)[92].

Tabla 1. Uso medicinal de la Muña[89]

Dolencia	Parte utilizada	Modo de aplicación
Dolor de estómago	Hojas	Mate de hojas
Diarrea	Hojas	Mate de hojas
Mal de aire	Hojas	Frotar hojas entre las manos y oler
Resfrío	Hojas	Bañarse con el agua de esta planta
Inflamaciones	Ramas	Lavarse con el agua de esta planta
Enterocolitis	Hojas	Mate, calentar las hojas y colocarlas en el vientre
Febrífugo	Ramas	Hervir la planta y bañarse con esta agua
Indigestión	Hojas	Tomar el mate
Dolor de dientes	Hojas	Masticar las hojas, hasta que calme el dolor

2.2.4.6. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA ESPECIE *Minthostachys mollis* "Muña"

En la Tabla 2 se muestra la composición bromatológica de 100g de Muña.

Tabla 2. Composición química de la Muña[89]

Componente	Cantidad
Agua (g)	16.00
Proteína (g)	3.20
Grasa (g)	2.80
Carbohidrato (g)	66.30
Fibra (g)	9.40
Ceniza (g)	11.70
Calcio (mg)	2237.00
Fósforo (mg)	269.00
Hierro (mg)	22.40
Retinol (mg)	306.00
Tiamina (mg)	0.35
Riboflamina (mg)	1.81
Niacina (mg)	6.85
Energía (Kcal)	268.00

2.2.4.7. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* "Muña"

El AE se caracteriza por poseer un aroma agradable, se ubica en hojas y tallos. Es un líquido de incoloro a amarillento, con un sabor ardiente. Para su obtención se recurre a la destilación por vapor húmedo o vapor seco[95].

2.2.4.8. COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys mollis* "Muña"

La composición, concentración y presencia de determinados terpenos en el AE de *Minthostachys mollis* "Muña" varía acorde a su lugar de procedencia. En la Tabla 3 se muestra las especificaciones organolépticas y fisicoquímicas[86, 92].

Tabla 3. Especificaciones organolépticas y fisicoquímicas del AE de Muña

Especificación	Descripción
Aspecto	Líquida, clara amarillenta, transparente
Color	Incoloro
Olor	Característico
Sabor	Picante
Densidad relativa	0.92
Índice de refracción	1.4699
Solubilidad en alcohol al 70º	5
Índice de mentona	33.88 %
Índice de menta	22 %
Índice de acidez	1.683
Índice de ésteres	5.819
Rotación específica	-2ª 45´
Índice de éter	16.80 %
Contenido de mentol total	4.042 %
Solubilidad en etanol	95 %

Los terpenos identificados mayoritariamente en el AE de *Minthostachys mollis* "Muña" son los siguientes.

Pulegona: Uno de los componentes más importantes por su abundancia; es tóxico en cantidades altas, daña el hígado y puede llegar a provocar un aborto. La toxicidad del AE explica el efecto nocivo de esta frente a plagas y parásitos. También es usada en perfumería y para preparar saborizantes.

Mentona: A lado de la pulegona representan regularmente más del 75 % de la composición del AE. Componente popular de la menta (*Mentha piperita*), se caracteriza por poseer buen aroma, es requerido en perfumería y posee propiedades digestivas.

Carvacrol: Componente dominante en baja proporción. Carvacrol se encuentra en especies como: tomillo del monte serpolio (*Thymus serpyflum*), la ajedrea de jardín (*Satureja hortensis*) y orégano (*Origanium vulgare*).

Carvona: Se obtiene de las semillas de la alcaravea (*Carum carvi*). Es usado por su buen sabor y propiedades digestivas.

Mentol: Se encuentra en pequeñas cantidades. Se utiliza para aminorar el dolor de garganta.

Linalol: Se encuentra en pequeñas cantidades. Se emplea como condimento y como insecticida.

Timol: Componente conocido del AE de tomillo. Funciona como antiséptico, alivia el dolor y la inflamación de la garganta[86, 92].

2.2.5. DESCRIPCIÓN Y PROPIEDADES DEL QUITOSANO

2.2.5.1. DESCRIPCIÓN

El quitosano está compuesto por β-D-glucosamina y N-acetilglucosamina unidas por enlaces glucosídicos β-1,4, la calidad del quitosano responde a un menor grado de acetilación. El quitosano se produce al desacetilar la quitina que está presente en varios organismos vivos con muchas funciones, siendo el componente estructural principal en el exoesqueleto de artrópodos y de las paredes celulares de hongos y levaduras[96]. Las cáscaras de cangrejo y camarones son la principal fuente de quitina obtenida de los productos de desecho de la industria pesquera[97]. (Figura 8).

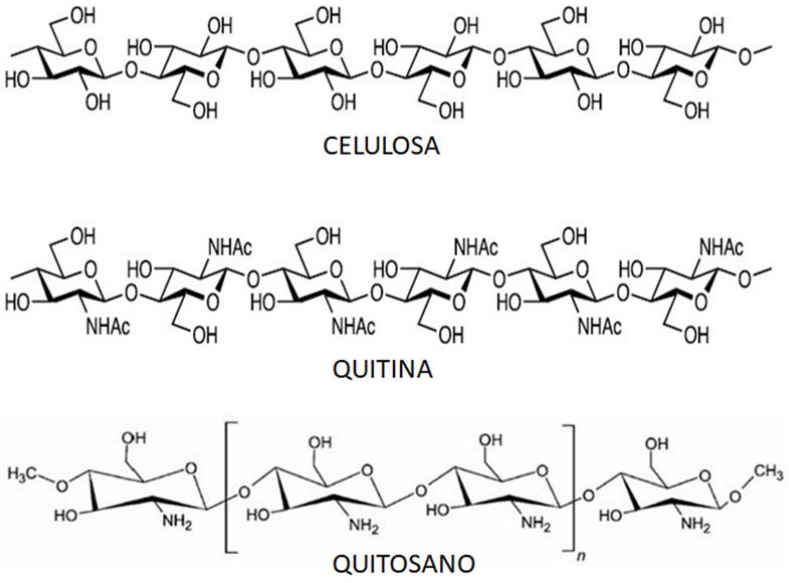


Figura 8. Estructura química de la celulosa, quitina y quitosano[37]

El quitosano es un material no tóxico, biocompatible y biodegradable con propiedades catiónicas por lo tanto, reacciona con especies cargadas negativamente, las cuales aportan importantes ventajas al ser incorporados. Estas propiedades pueden usarse para incorporación y/o liberación programada de compuestos activos. El quitosano permite producir diferentes matrices, incluidas soluciones de viscosidad controlada, como: geles, biopelículas, membranas, micropartículas y nanopartículas[98].

El quitosano por sus propiedades antioxidantes ha sido empleado para formar biopelículas con el fin de beneficiar a muchos productos alimenticios envasados en este tipo de material. Tales biopelículas de quitosano pueden llevar componentes funcionales específicos, como conservantes, antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes y nutracéuticos. Su uso principal se debe a que aumenta favorablemente la conservación de los alimentos (Figura 9)[99].

El quitosano es insoluble en agua o solventes orgánicos y soluble en ácido acético a bajas concentraciones[100]. Las biopelículas de quitosano también se pueden preparar utilizando otros ácidos orgánicos como agentes disolventes, incluidos los ácidos fórmico, láctico y oxálico (pH <6.5).

El quitosano presenta propiedades antimicrobianas frente a una amplia variedad de microorganismos patógenos y de descomposición, incluidos hongos y bacterias grampositivas y gramnegativas[101]. Las biopelículas a base de quitosano son económicas, transparentes y permeables al vapor de agua. Sin embargo, presentan baja permeabilidad al CO_2 y al O_2, no son termoplásticos y no pueden extruirse, moldearse ni estirarse como muchos materiales de embalaje convencionales[102].

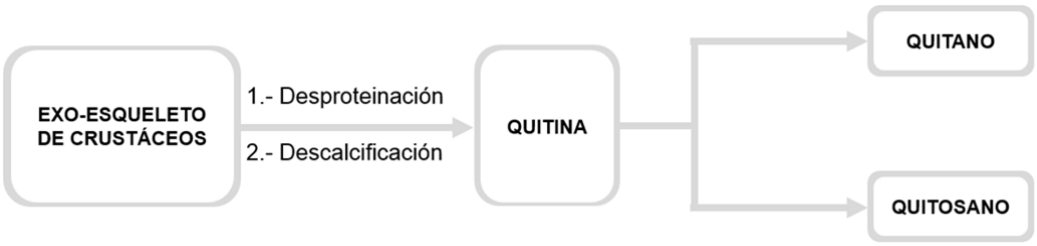


Figura 9. Proceso de obtención de quitosano tradicional de los caparazones de crustáceos[103]

2.2.5.2. BIOPELÍCULAS DE QUITOSANO

Las biopelículas de quitosano se caracterizan por ser transparentes y firmes. Las biopelículas de quitosano se aplican para conservar diferentes frutas debido a modifican la atmósfera del fruto mediante una barrera al CO_2 y O_2 y protegen de la degradación causada por microorganismos[103]. Las propiedades funcionales de las biopelículas a base de quitosano pueden mejorarse combinándolas con otros hidrocoloides. Además, el aumento de la hidrofobicidad del quitosano se puede lograr agregando lípidos neutros, ácidos grasos, ceras y arcillas, aunque tales aditivos a menudo comprometen la mecánica y estabilidad química de las biopelículas y/o sus características organolépticas. Además, se han propuesto varios enfoques químicos y físicos que mejoran las propiedades mecánicas, como la adición de agentes de reticulación, irradiación y ultrasonido[104]. Otra forma para la mejora de las propiedades mecánicas y físicas de las biopelículas es mezclando proteínas, como la proteína de la leche, la proteína de soja, el colágeno o la gelatina, con polisacáridos, como el quitosano, los almidones, los alginatos o la celulosa (Figura 10).



Figura 10. Biopelícula de quitosano[105]

2.2.5.3. PROPIEDAD ANTIMICROBIANA

El quitosano tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras. El quitosano tiene cargas positivas que interactúa con las cargas negativas de las macromoléculas alrededor de la superficie de los microorganismos, esta interacción se da cuando se tiene como medio a soluciones ácidas diluidas, se presume que la interacción se da por competencia con los iones de Ca^{+2} hacia los espacios electronegativos de la superficie celular, ello genera inestabilidad a la estructura celular, compromete la integridad de la membrana y en consecuencia se produce su debilitamiento[104]. Debido a esta habilidad de formar biopelículas, la biopelícula formada con quitosano disminuye la contaminación en la superficie de los alimentos[106].

2.3. GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **Aceite esencial:** Mezcla compleja de compuestos alifáticos de bajo peso molecular, monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos[107].
- **Biopelícula:** Se define como una o varias capas continuas y delgadas de biopolímeros que pueden mejorar los atributos sensoriales, incrementar la vida útil de un alimento y ser consumido por los seres vivos[15, 16, 17]. Así mismo los biopolímeros son polímeros obtenidos de una fuente natural como los organismos vivos, o aquellos que son obtenidos de fuentes renovables que muestran una alta capacidad de biodegradación[18].
- **Antioxidante:** Sustancia predominante en alimentos rojos, naranjas y purpuras de consumo común que puede ayudar a prevenir efectos nocivos de los radicales libres sobre nuestras células[108].
- **Antimicrobiano:** Sustancia nociva para los microorganismos, que inhibe su crecimiento[109].
- **Fuerza de tracción:** Es la fuerza que se opone a la fuerza que estira los cuerpos. Se da al someter un cuerpo a dos cargas de igual dirección, sentido contrario y divergentes[110].
- ***Minthostachys mollis* "Muña":** Especie vegetal conocida en la lengua quechua como: "Muña"[88]. Es un arbusto aromático que crece en pendientes pedregosas y rocosas, también se encuentra en regiones altas y áridas. Este se extiende desde los 2600 a 3800 msnm[86].
- **Potencialización:** Acción y efecto de potenciar. Elevación de una cantidad o una expresión a una potencia[111].
- **Quitosano:** Conformado por unidades de monosacáridos: β-D-glucosamina y N-acetilglucosamina, ambos unidos a través de enlaces glicosídicos β-1,4[96].

III. HIPÓTESIS Y VARIABLES

3.1. HIPÓTESIS

Las biopelículas formadas a partir del polímero: quitosano, al ser funcionalizadas con AE de *Minthostachys mollis* “Muña” presentan un aumento de sus actividades antioxidante y antimicrobiana.

3.2. VARIABLES

Variable Independiente

- Biopelícula de quitosano funcionalizada con AE de *Minthostachys mollis* “Muña

Variable Dependiente

- Efecto antioxidante
- Efecto antimicrobiano
- Propiedad Mecánica

3.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	Definición conceptual	Indicadores	Tipo de variable/escala de medición	Valor
Biopelícula de quitosano funcionalizada con AE de *Minthostachys mollis* "Muña	Sustancia a distinta concentración con propiedades beneficiosas para conservar los alimentos.	Asignación de la sustancia experimental	Cualitativo/Ordinal	Serie F (F1-F9) representa a las biopelículas con aceite esencial de Muña. Serie B (B1-B3) representa a las biopelículas sin aceite esencial de Muña. La composición de cada biopelícula está acorde al asignado en la Tabla 4.
Efecto antimicrobiano	Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* y crecimiento fúngico de *Aspergillus niger*	Método: Zona de inhibición	Cuantitativo	Porcentaje acorde al índice de severidad
Efecto antioxidante	Capacidad de captar radicales libre DPPH	Método: Captación de radical libre DPPH	Cuantitativo	Porcentaje de captación de Radicales libres
Propiedad mecánica	La fuerza de tracción	Método: método ASTM D882	Cuantitativo	Fuerza de tracción en MPa

Nota: elaboración propia

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

CENTROS DE EJECUCIÓN

- Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"-Sección Carbohidratos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM
- Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco Antonio Garrido Malo" de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM
- Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

4.2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Estudio analítico experimental.

Se realizó un diseño factorial. Considerándose como diseño de dos factores: quitosano y el aceite esencial de Muña.

Cada factor consta de 3 niveles (concentraciones distintas):

- Para el quitosano: 1%, 2% y 3%.
- Para el AE de Muña: 0,5%, 2% y 5%.

Siendo el diseño factorial de 2 factores y 3 niveles (3x3), lo cual nos dio 9 condiciones experimentales.

Se estudiaron 9 condiciones experimentales conteniendo en mL/100 mL de sistema, 5 mL de glicerina, 2 mL de propilenglicol y la cantidad de solución de ácido acético al 1% necesario para completar 100 mL de sistema en conjunto con las cantidades de quitosano y aceite esencial detalladas en la Tabla 4. La asignación y orden para cada sistema fue establecido aleatoriamente.

Tabla 4. Diseño para el estudio de la influencia de la concentración de quitosano (Q_0) y AE de *Minthostachys mollis* "Muña" (As Es).

SISTEMA	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Q_0	3%	2%	1%	1%	3%	3%	1%	2%	2%
As Es	5%	0,5%	2%	0,5%	0,5%	2%	5%	5%	2%

4.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población de estudio se conformó por la biopelículas elaboradas a partir de quitosano y AE *Minthostachys mollis* "Muña" en el Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara"-Sección Carbohidratos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica-UNMSM.

Se elaboraron 3 biopelículas por cada condición experimental formada (9 condiciones experimentales) y 1 biopelícula para cada nivel de la variable quitosano. Siendo un total de 30 biopelículas formuladas.

4.4. PROCEDIMIENTOS, TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

4.4.1. MATERIALES Y EQUIPOS

4.4.1.1. Materia prima

- Hojas de *Minthostachys mollis* "Muña"

4.4.1.2. Reactivos químicos y materiales

- Caldo Mueller-Hinton marca Merck
- Caldo Dextrosa Sabouraud marca Merck
- Agar Mueller-Hinton marca Merck
- Agar Dextrosa Sabouraud marca Merck
- Ácido acético marca Merck
- Glicerina marca IDSA
- Metanol grado analítico marca Merck
- Propilenglicol marca Merck
- Reactivo DPPH (2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo) marca Sigma-Aldrich

- Quitosano desacetilado marca Sigma-Aldrich

4.4.1.3. Insumos y utensilios

- Agua destilada
- Asa de kolle
- Beaker de 100 mL y 250 mL
- Cubetas de plástico
- Espátulas
- Frascos de vidrio
- Fiolas de 50 mL y 100 mL pyrex
- Gradilla
- Magnetos
- Matrax Erlenmeyer pyrex 500 mL
- Micropipeta 10 µL, 100 µL, 200 µL,1000 µL
- Papel aluminio
- Placas Petri de 10 cm de diámetro
- Pipetas de 1 mL, 5 mL, 10 mL y 50 mL
- Probeta de 100 mL
- Tips
- Tubos de ensayo pyrex

4.4.1.4. Equipos e instrumentos

- Agitador magnético
- Balanza analítica
- “Cromátografo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C”
- Estufa de aire circulante
- Espectrofotómetro UV-VIS marca GENESIS.
- Mechero Bunsen
- Vortex marca SCIOLOGEX.
- Texturometro digital AEL 200

4.4.2. MÉTODOS

4.4.2.1. RECOLECCIÓN Y CLASIFICACIÓN SISTEMÁTICA

La recolección de la especie vegetal se realizó a partir de plantas frescas. Se recolectaron de la ciudad de Pomacochas, Bongará del departamento de Amazonas. (2300 m.s.n.m.), se conservaron en condiciones óptimas hasta su uso en la obtención del AE de la Muña.

4.4.2.2. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Las muestras recolectadas se estudiaron en el Museo de Historia Natural de la UNMSM, acorde al sistema de clasificación de Cronquist (1988)[112].

4.4.2.3. OBTENCIÓN DE ACEITES ESENCIALES

El AE de *Minthostachys mollis* "Muña" se obtuvo por arrastre de vapor[113] en la Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

4.4.2.4. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL

La caracterización del aceite esencial se determinó mediante el uso de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas.

Equipo: "Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890"
Detector: "Espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C"
Columna: "J&W 122-1545.67659 DB-5ms, 325 °C: 60 m x 250 µm x 0.25 µm"

Ello se realizó en la Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Universidad Peruana Cayetano Heredia

La temperatura de la columna del GC empezó en 40 °C y subió a 5 °C/min hasta 180 °C; 2.5 °C/min hasta 200 °C por 5min y finalmente 10 °C manteniéndose por 3 minutos.

Tratamiento de la muestra: En un mL de diclorometano se diluyó 20 µL de la muestra.

Condiciones de la operación:

- Tiempo de corrida: 54 min
- Volumen de Inyección: 1 µL
- Split: 100:1
- Gas portador: He, 1 mL/min

4.4.2.5. PREPARACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS[114- 116]

Se utilizó quitosano (Q_0) marca SIGMA ALDRICH, con un grado de desacetilación entre 75% - 85%.
El quitosano fue preparado a tres concentraciones (1%, 2% y 3% p/v).
El AE fue preparado a tres concentraciones (0,5%, 2% y 5%. v/v).
Como medio para disolución se usó solución de ácido acético al 1% v/v.

Para preparar la solución de biopelículas se procedió de la siguiente manera:

- En la solución de ácido acético se incorporó quitosano. Luego se homogenizó mediante el uso de un agitador magnético a 400 rpm por 10 min a 60 ºC, cerrando con celofán la boquilla del matraz (tanque 1).
- En otro matraz (tanque 2) se agregó aceite esencial y propilenglicol, se homogenizaron a 400 rpm por 5 min a 60ºC, cerrando con celofán la boquilla del matraz.
- Terminado el tiempo de homogenización se trasvasó el contenido del tanque 2 al tanque 1, todo en temperatura de 60ºC. Luego se agregó glicerol y se procedió a homogenizar la solución por 20 min a 600 rpm con una temperatura de 60ºC.
- Pasado el tiempo de homogenización, se vertió 20 mL de la solución formada en una placa Petri de 9 cm de diámetro y se dejó a secar por 24 horas a 40ºC en una estufa de aire circulante.
- Obtenidas las biopelículas se dejaron en un desecador a temperatura ambiente.
- Las cantidades requeridas de quitosano, AE de *Minthostachys mollis* “Muña”, propilenglicol y glicerina para cada biopelícula se detallan en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición cuantitativa de cada biopelícula formada. Siendo la serie F biopelículas con aceite esencial de Muña en su composición y la serie B biopelículas sin contener aceite esencial de Muña.

	Quitosano (%)	Aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña"(%)	Propilenglicol (%)	Glicerina (%)	Solución de ácido acético al 1% csp
F1	3%	5%	2%	5%	100%
F2	2%	0.50%	2%	5%	100%
F3	1%	2%	2%	5%	100%
F4	1%	0.50%	2%	5%	100%
F5	3%	0.50%	2%	5%	100%
F6	3%	2%	2%	5%	100%
F7	1%	5%	2%	5%	100%
F8	2%	5%	2%	5%	100%
F9	2%	2%	2%	5%	100%
B1	1%	-	2%	5%	100%
B2	2%	-	2%	5%	100%
B3	3%	-	2%	5%	100%

4.4.2.6. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE[117, 118]

4.4.2.6.1. Preparación del DPPH

La preparación del reactivo se da a una concentración de 0.05 mM, disolviendo 2 mg del reactivo en 100 mL de metanol.

4.4.2.6.2. Preparación de la muestra

En un tubo falcon de 15 mL se pesó 30 mg de muestras de biopelícula, luego se trozaron y se agitaron en un vortex con 3 mL de metanol durante 5 minutos. La mezcla se dejó en reposo durante 3 h, a 25ºC, y luego se sometió a agitación vigorosa en el vortex durante otros 5 min.

4.4.2.6.3. Actividad captadora del radical libre DPPH

Luego una alícuota (0,80 mL) de la solución se mezcló con 1,2 mL de DPPH (0.05 mM) en metanol. La mezcla se agitó por un minuto en vortex y luego se colocó la muestra en una habitación oscura durante 30 minutos. La disminución de la absorbancia se determinó a 517 nm usando un espectrofotómetro UV-visible. La actividad antioxidante se determinó por porcentaje de inhibición del radical DPPH (captación de Radicales libres) con la siguiente ecuación.

$$\%\text{captación de Radicales libres} = [1 - \left(\frac{(\text{Abs DPPH} - (\text{Abs MP} - \text{Abs B/M})}{\text{Abs DPPH}}\right)] x 100\%$$

Dónde:

Abs DPPH: Es la absorbancia del control de DPPH A 517nm.
Abs MP: Es la absorbancia de la muestra restando la absorbancia del blanco de muestras.

Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y la capacidad antioxidante de la biopelícula se expresó en % de actividad de eliminación de radicales DPPH / mg de biopelícula.

4.4.2.7. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

4.4.2.7.1. Preparación del inóculo

Las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* y *Aspergillus niger* fueron proporcionados por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. Las cepas bacterianas se suspendieron en 10 mL de caldo Mueller-

Hinton[92] y las cepas de *Aspergillus niger* se suspendieron en 10 mL de caldo Sabouraud Dextrosa[95].

Luego después de 24 h las bacterias se sembraron en agar Tripticasa de soya y *Aspergillus niger* en agar Sabouraud Dextrosa, y se llevó a incubar por 24 h.

Al término de la incubación, se prepararon con solución salina estéril suspensiones equivalentes a tubo 0.5 en la escala de McFarland.

4.4.2.7.2. Ensayo de zona de inhibición

Se utilizó el ensayo de zona de inhibición[119, 120] para determinar la actividad antimicrobiana de las películas formuladas. Las biopelículas se cortaron en fragmentos de 1,5 cm de cada lado aproximadamente. Luego los fragmentos de biopelículas se transfirieron asépticamente a placas preparadas con Agar Mueller-Hinton y Agar Dextrosa Sabouraud (proporcionado por el laboratorio de microbiología y Parasitología), en las cuales previamente se había sembrado los microorganismos a ser evaluados. Sobre cada placa se colocaron tres muestras de biopelícula. Luego, se incubaron a 37ºC durante 48 horas. El efecto antimicrobiano se verificó observando zonas de inhibición en el área de contacto, además mediante el índice de severidad se les otorgó un valor cuantitativo. El índice de severidad se determina acorde a la escala que se muestra en la Tabla 6, la cual se basa en el porcentaje de biopelícula afectada por el microorganismo.

Tabla 6. Escala de índice de severidad en biopelículas

Índice de severidad	Porcentaje de biopelícula afectada
1	1-24%
2	25-49%
3	50-74%
4	75-99%
5	100%

El porcentaje de índice de severidad se calcula mediante la ecuación descrita por Pérez y col[121, 122].

$$\text{“Índice de severidad} = \frac{Xi(1)+Xi(2)+Xi(3)+Xi(4)+Xi(5)}{N}\text{„}$$

Dónde:

“Xi = Número de biopelículas afectadas por diferente grado de daño: 1, 2, 3, 4, 5= grado de daño en la escala manejada”,

“N = Número total biopelículas por unidad experimental”.

4.4.2.8. EVALUACIÓN DE PROPIEDAD MECÁNICA[123-125]

4.4.2.8.1. Fuerza de tracción

Las pruebas de fuerza de tensión o tracción se realizaron para cada tipo de biopelícula obtenida. Estas pruebas fueron realizadas a temperatura ambiente con un medidor de tracción en láminas AEL 200 acorde al método ASTM D882. Las tiras de biopelícula (1,5 cm x 8 cm) equilibradas se fijaron entre los agarres con una separación inicial de 50 mm, y la velocidad de la cruceta se fijó en 50 mm/min. Se probaron al menos tres réplicas de cada formulación. En la figura 11 se muestra el momento en que se aplica la fuerza de tensión.



Figura 11. Texturometro digital AEL 200, evaluando la fuerza de tracción de las biopelículas.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente por el método de varianza ANOVA y una prueba post-hoc de diferencia mínima significativa (LSD) (nivel de confianza, a: 0.05) sobre los resultados obtenidos con el fin de establecer diferencias significativas. Todos los datos se analizaron usando el software estadístico SPSS Statistics 25 (IBM Corp, EE.UU.).

V. RESULTADOS

5.1. IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

Acorde a la Constancia Nº 297-USM-2018 (Anexo 3) del Museo de Historia Natural de UNMSM se detalla:

DIVISION:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE:	ASTERIDAE
ORDEN:	LAMIALES
FAMILIA:	LAMIACEAE
GÉNERO:	Minthostachys
ESPECIE:	*Minthostachys mollis* (kunth) Griseb
Nombre vulgar:	"Muña"

5.2. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL

Se identificaron un total de 29 compuestos. En la Tabla 7 se detalla el porcentaje que representa a cada componente identificado y su tiempo de retención. En la Figura 12 se muestra el cromatograma obtenido, siendo resaltante la presencia de dos picos que representan a los compuestos identificados en mayor cantidad.

La mentona y la pulegona son los componentes identificados en mayor cantidad, con una presencia de 32,72% y 40,94% respectivamente.

Tabla 7. Composición y tiempo de retención del aceite esencial de *Minthostachys mollis*

Número	Nombre del compuesto (NIST08.L)	t_R (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	α-Pineno	13.38	0.56
2	Sabineno	14.63	0.25
3	β-Pineno	14.87	0.73
4	β-Mirceno	15.01	0.42
5	3-Octanol	15.22	0.35
6	*p-Cimeno*	16.30	0.54
7	D-Limoneno	16.46	1.92
8	*cis*-Ocimeno	16.85	0.33
9	γ-Terpineno	17.36	1.04
10	β-Linalool	18.55	1.66
11	Mentona	20.56	32.72
12	Isopulegona	21.11	1.09
13	*trans*-Dihidrocarvona	21.79	1.85
14	Pulegona	23.05	40.94
15	D-Carvona	23.15	3.67
16	Piperitona	23.47	1.42
17	Isotimol	24.51	0.53
18	Metileugenol	25.14	0.39
19	Acetato de Timol	25.81	0.32
20	Eucarvona	25.88	0.74
21	Carvacrol	26.35	0.99
22	Acetato de Geraniol	26.58	0.97
23	β-Cariofileno	28.22	2.77
24	Metilisoeugenol	28.87	0.55
25	α-Cariofileno	29.17	0.40
26	Germacreno D	29.82	0.71
27	Biciclogermacreno	30.22	1.07
28	Elemicino	30.57	0.34
29	Isoelemicino	33.74	0.73

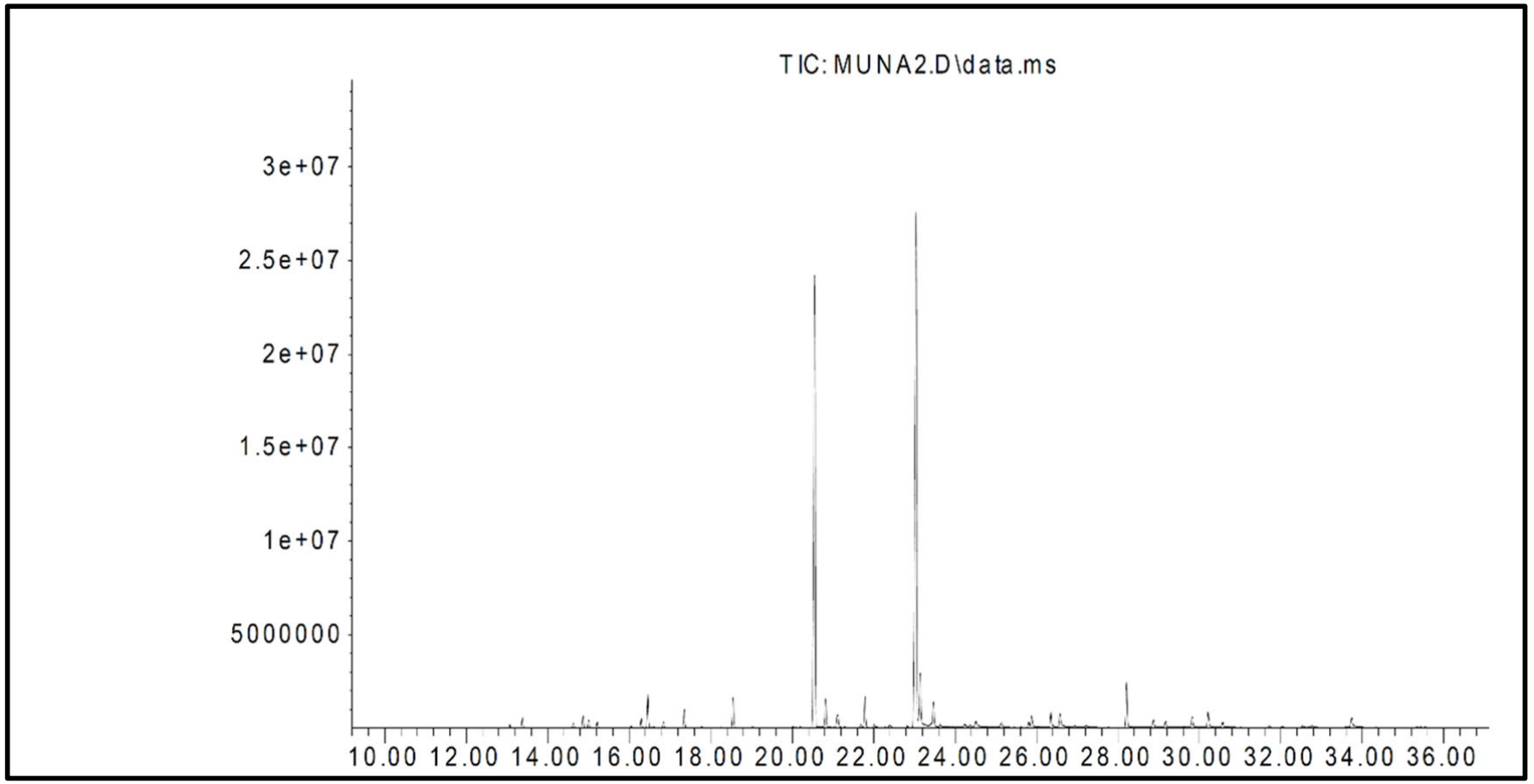


Figura 12. Cromatograma GC-SM del AE de Muña. Siendo la mentona y la pulegona los componente en mayor cantidad, con una concentración de 32,72% y 40,94% respectivamente.

5.3. PREPARACIÓN DE LAS BIOPELÍCULAS

En la Figura 13 se muestra las biopelículas obtenidas luego de eliminar el medio dispersante.

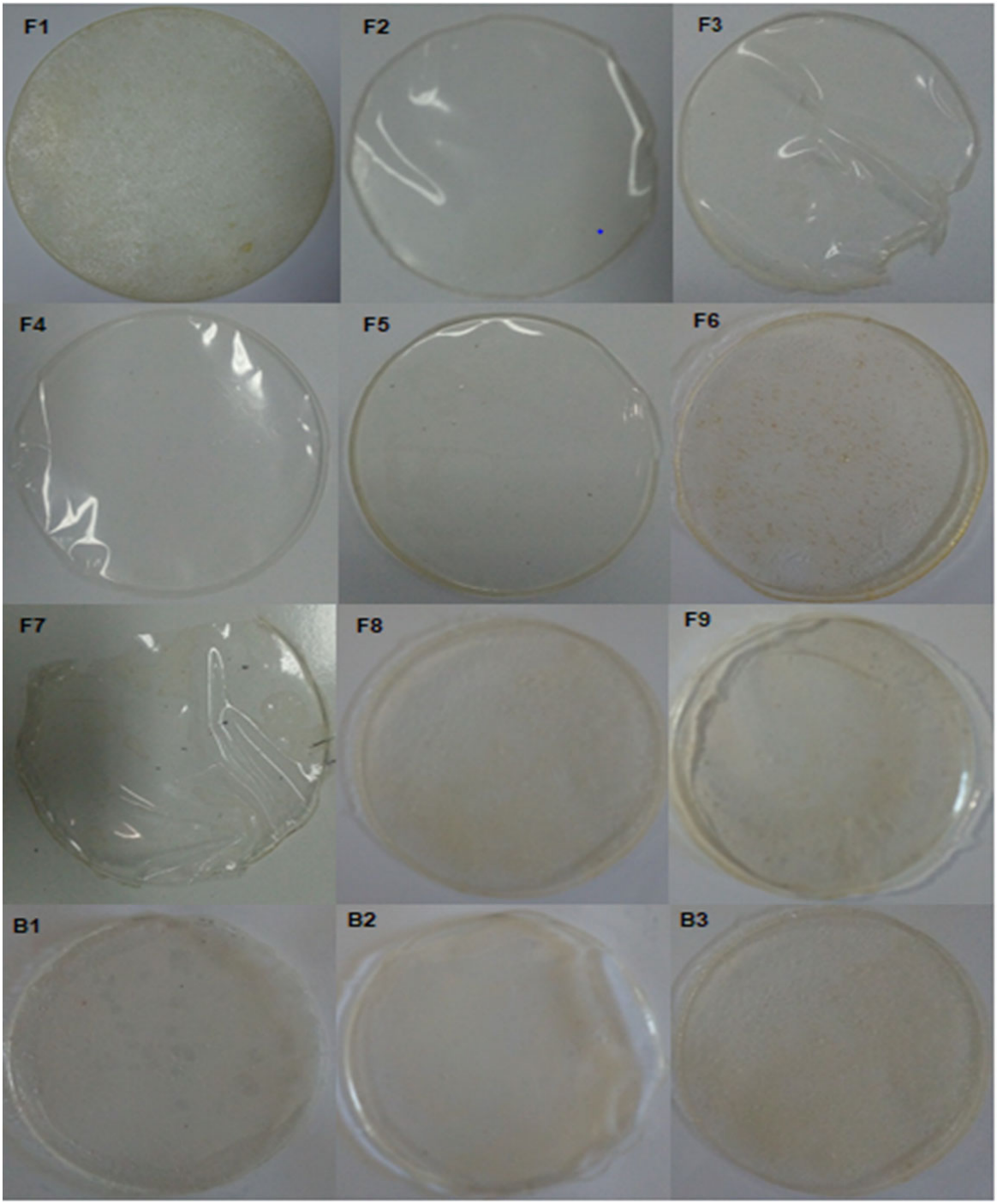


Figura 13. La serie F (F1-F9) representa a las biopelículas con aceite esencial de Muña, la composición de cada biopelícula obedece al asignado en la Tabla 4. La serie B (B1-B3) representa a las biopelículas sin aceite esencial de Muña, la composición de cada biopelícula es acorde al asignado en la Tabla 4.

5.4. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

En este ensayo se evaluó las capacidades antioxidantes (captadora de radicales DPPH) de las biopelículas con AE de *Minthostachys mollis* “Muña” (con agente antioxidante) y biopelículas sin AE de *Minthostachys mollis* “Muña” (sin agente antioxidante). En la Figura 14, se pueden observar los valores del porcentaje de actividad antioxidante obtenidos para las biopelículas.

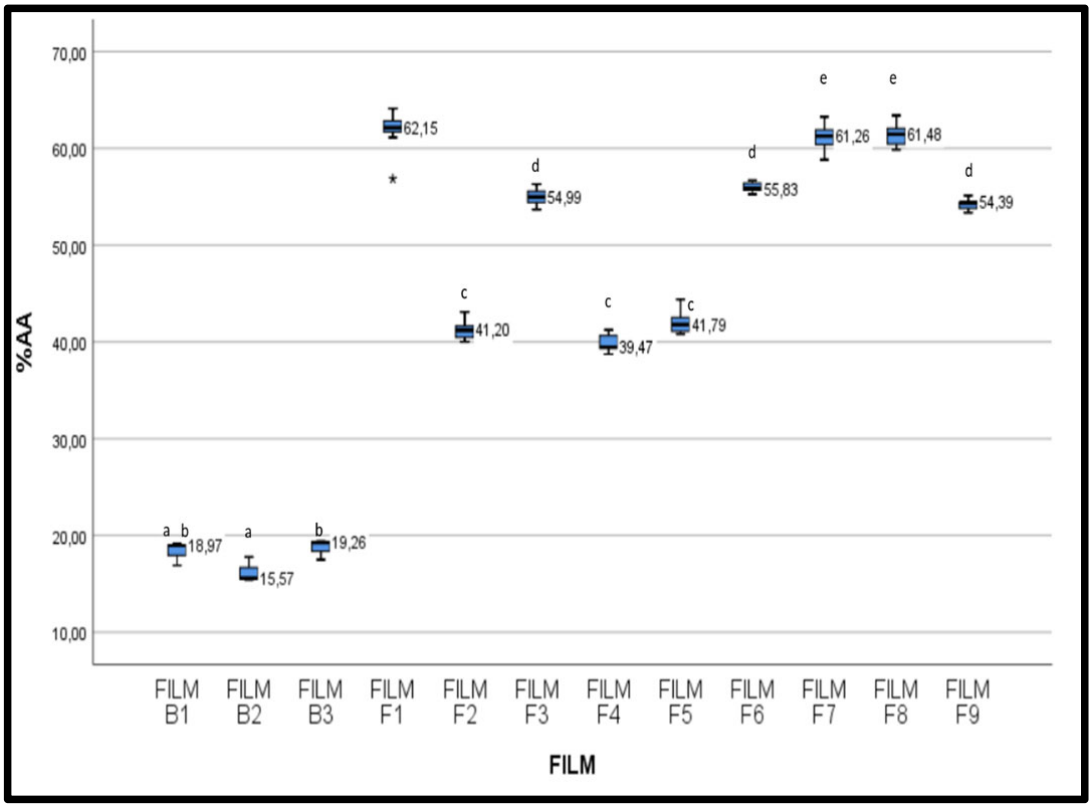


Figura 14. Porcentaje de actividad antioxidante de las biopelículas de la serie B (B1-B3) y biopelículas de la serie F (F1-F9). Las columnas con la misma letra no son significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Para el análisis de los datos obtenidos, se agruparon las biopelículas cuyo valor de porcentaje de actividad antioxidante no son significativamente diferentes (α: 0.05). Se observó que las biopelículas agrupadas coincidían en tener el mismo porcentaje de AE de *Minthostachys mollis* "Muña".

Así mismo se observa que el porcentaje de actividad antioxidante fue mayor para las biopelículas con una concentración de 5% de AE de *Minthostachys mollis* "Muña" (62.15, 61.48 y 61.26%), seguido por las biopelículas con una concentración de 2% de AE de *Minthostachys mollis* "Muña" (55.83, 54.99 y 54.39%). Las biopelículas con una concentración de 0.5% de AE de *Minthostachys mollis* "Muña" presentaron una disminución notable de la actividad antioxidante (41.79, 41.20 y 39.47%).

En la Figura 15 se muestra el porcentaje de la actividad antioxidante de las biopelículas agrupadas con una misma concentración de aceite esencial.

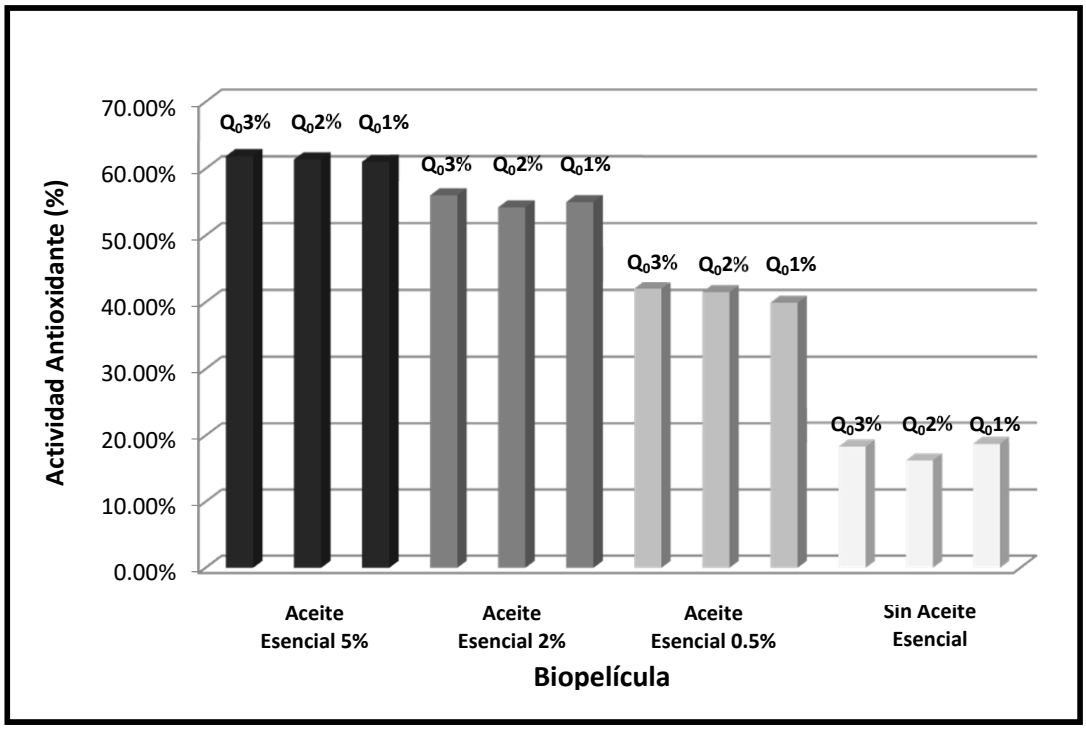


Figura 15. Porcentaje de actividad antioxidante de las biopelículas (3%, 2% y 1% de quitosano) sin aceite esencial y con aceite esencial al 5%, 2% y 0.5%.

5.5. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA: MÉTODO ZONA DE INHIBICIÓN

En este ensayo, se evaluó la capacidad de inhibición de los antimicrobianos contenidos en las biopelículas frente a los microorganismos presentes en el agar sólido que modela el comportamiento del alimento, en relación al control del crecimiento de *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* y *Aspergillus niger*. La evaluación se realizó a través de la observación de la formación de zonas claras en la superficie de contacto, así como alrededor de las muestras de biopelículas.

La información obtenida de la fórmula de índice de severidad para cada biopelícula diseñada se muestran en la Tabla 8, se detalla los resultados de las biopelículas con y sin incorporación de AE de *Minthostachys mollis* “Muña” (agente antimicrobiano) y biopelículas sin AE de *Minthostachys mollis* “Muña” (sin agente antimicrobiano) para comparar su comportamiento.

En las Figuras 16, 17, 18 y 19 se muestra las zonas de inhibición desarrolladas por las biopelículas formuladas frente a los microorganismo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Aspergillus niger* respectivamente.

En la Figura 20 se muestra el valor de índice de severidad obtenido para cada biopelícula frente a los microorganismo *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Aspergillus niger*.

Tabla 8: Valores obtenidos del índice de severidad para las biopelículas formuladas frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Aspergillus niger*.

		N° de biopelículas afectadas por grado de daño					Índice de severidad
		1	2	3	4	5	
Escherichia coli	B1	1	0	0	0	0	1
	B2	1	0	0	0	0	1
	B3	1	0	0	0	0	1
	F1	3	0	0	0	0	1
	F2	3	0	0	0	0	1
	F3	3	0	0	0	0	1
	F4	3	0	0	0	0	1
	F5	3	0	0	0	0	1
	F6	3	0	0	0	0	1
	F7	3	0	0	0	0	1
	F8	3	0	0	0	0	1
	F9	3	0	0	0	0	1
Staphylococcus aureus	B1	1	0	0	0	0	1
	B2	1	0	0	0	0	1
	B3	1	0	0	0	0	1
	F1	3	0	0	0	0	1
	F2	3	0	0	0	0	1
	F3	3	0	0	0	0	1
	F4	3	0	0	0	0	1
	F5	3	0	0	0	0	1
	F6	3	0	0	0	0	1
	F7	3	0	0	0	0	1
	F8	3	0	0	0	0	1
	F9	3	0	0	0	0	1
Staphylococcus epidermidis	B1	1	0	0	0	0	1
	B2	1	0	0	0	0	1
	B3	1	0	0	0	0	1
	F1	3	0	0	0	0	1
	F2	3	0	0	0	0	1
	F3	3	0	0	0	0	1
	F4	3	0	0	0	0	1
	F5	3	0	0	0	0	1
	F6	3	0	0	0	0	1
	F7	3	0	0	0	0	1
	F8	3	0	0	0	0	1
	F9	3	0	0	0	0	1
Aspergillus niger	B1	0	0	1	0	0	3
	B2	0	0	1	0	0	3
	B3	0	0	1	0	0	3
	F1	0	3	0	0	0	2
	F2	0	3	0	0	0	2
	F3	0	3	0	0	0	2
	F4	0	3	0	0	0	2
	F5	0	3	0	0	0	2
	F6	0	3	0	0	0	2
	F7	0	3	0	0	0	2
	F8	0	3	0	0	0	2
	F9	0	3	0	0	0	2

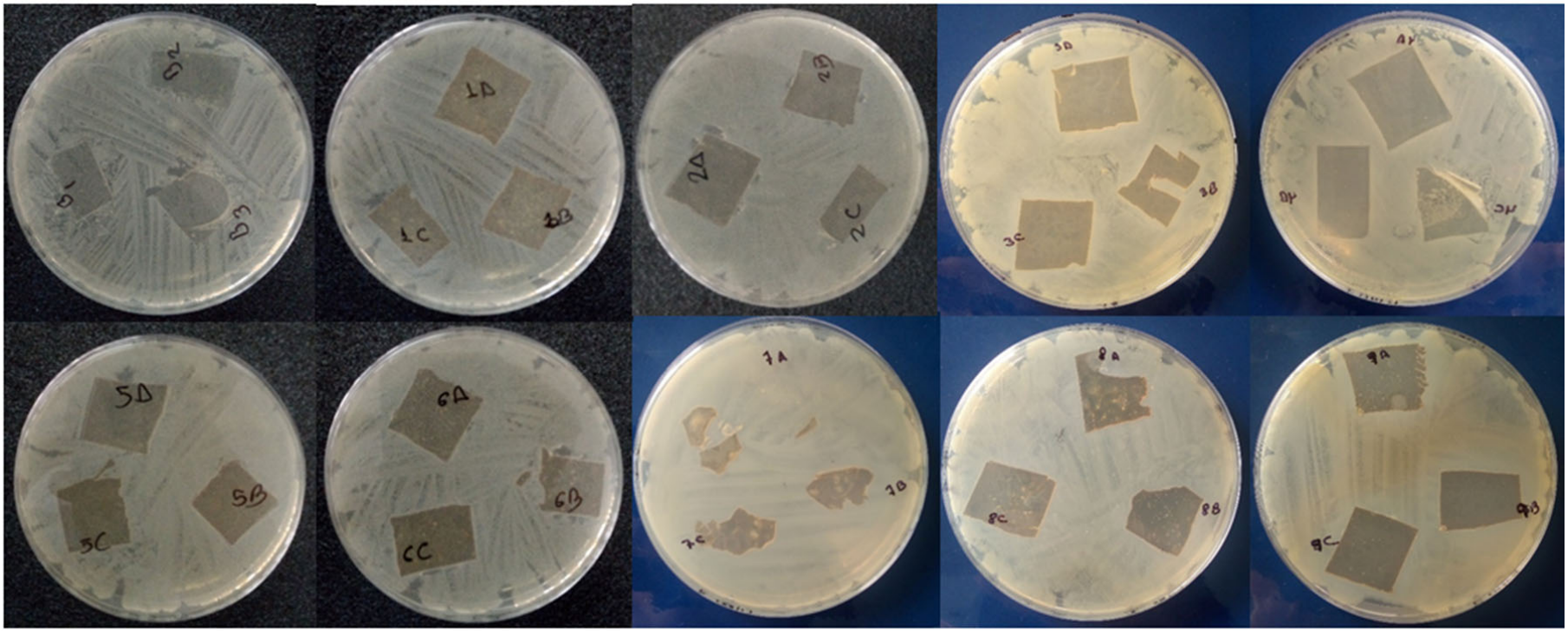


Figura 16. Zonas de inhibición desarrolladas frente a *Escherichia coli* por las biopelículas control (B1, B2 y B3) y sistemas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9.

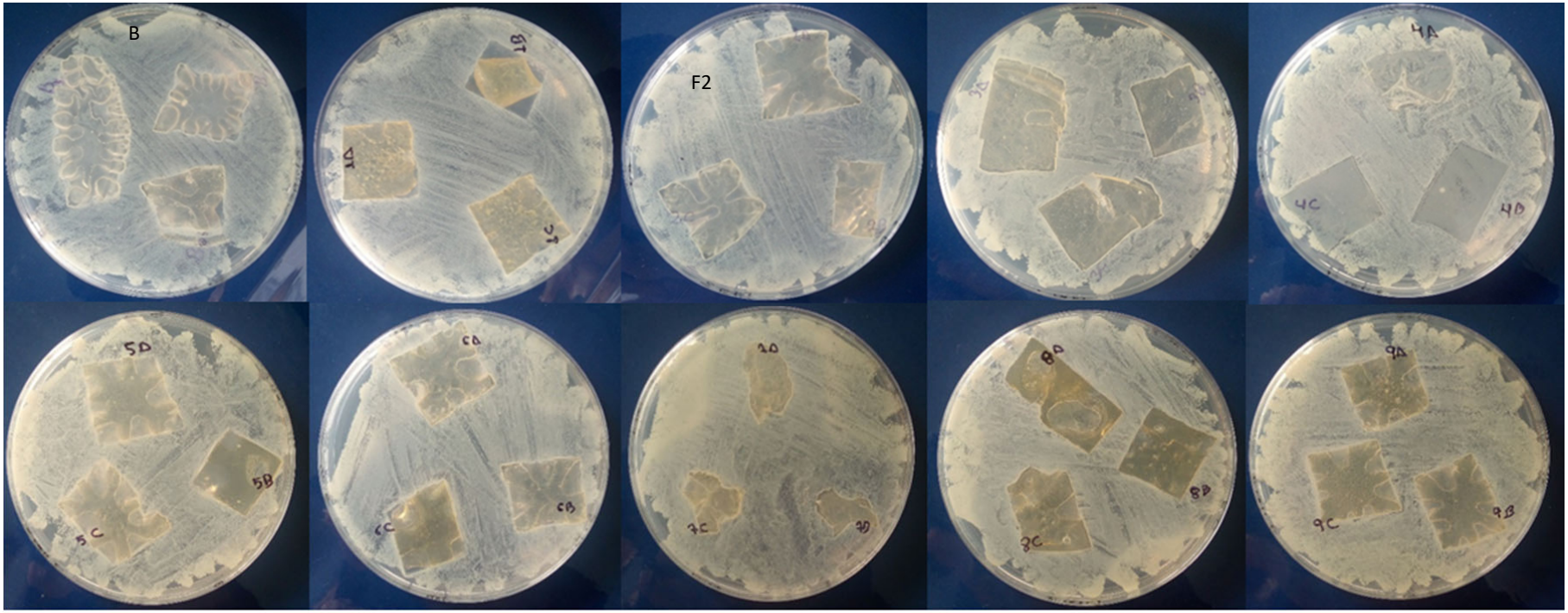


Figura 17. Zonas de inhibición desarrolladas frente a *Staphylococcus aureus* por las biopelículas control (B1, B2 y B3) y sistemas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9.

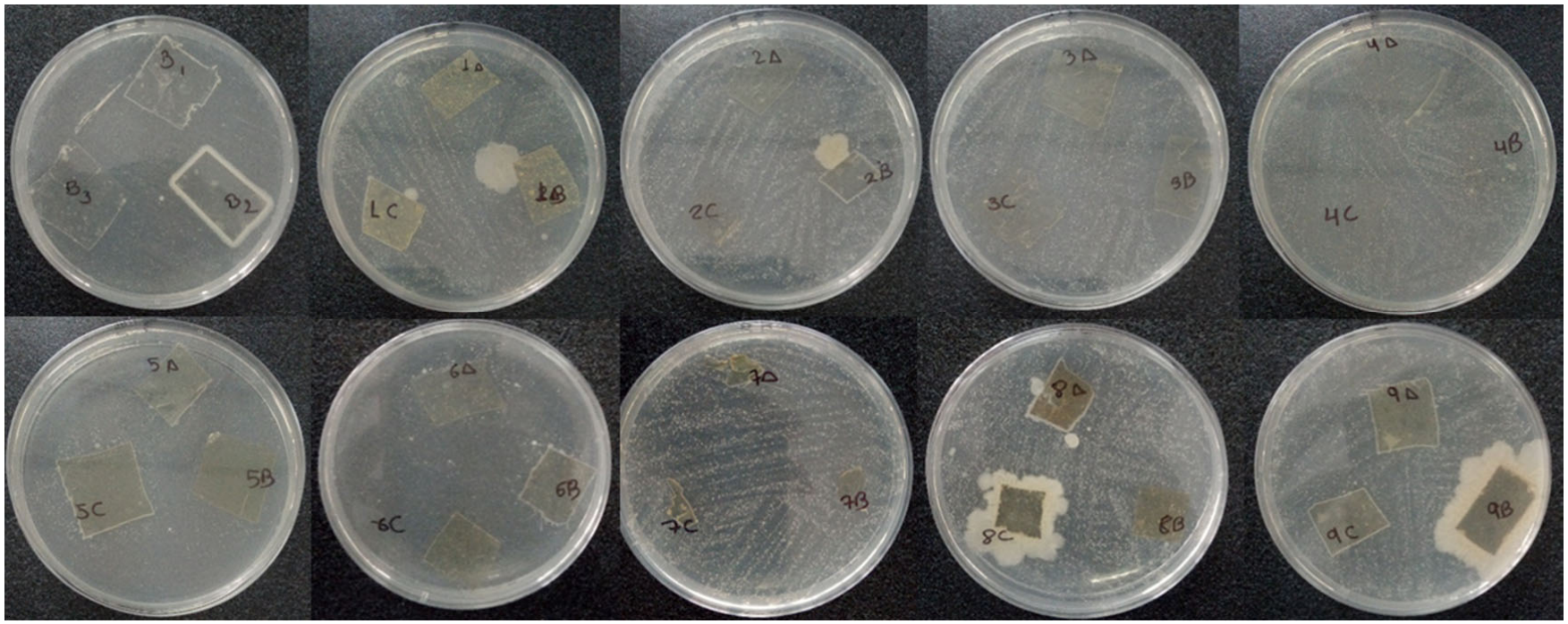


Figura 18. Zonas de inhibición desarrolladas frente a *Staphylococcus epidermidis* por las biopelículas control (B1, B2 y B3) y sistemas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9.

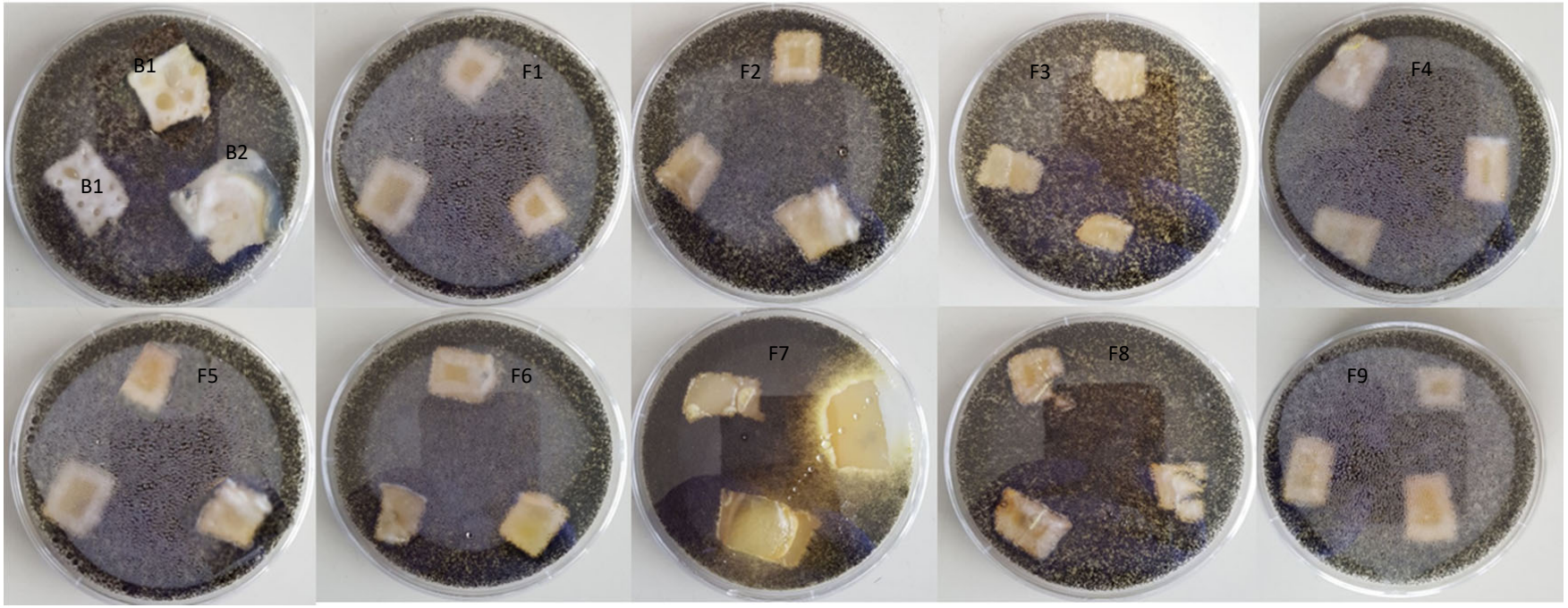


Figura 19. Zonas de inhibición desarrolladas frente a *Aspergillus niger* por las biopelículas control (B1, B2 y B3) y sistemas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9.

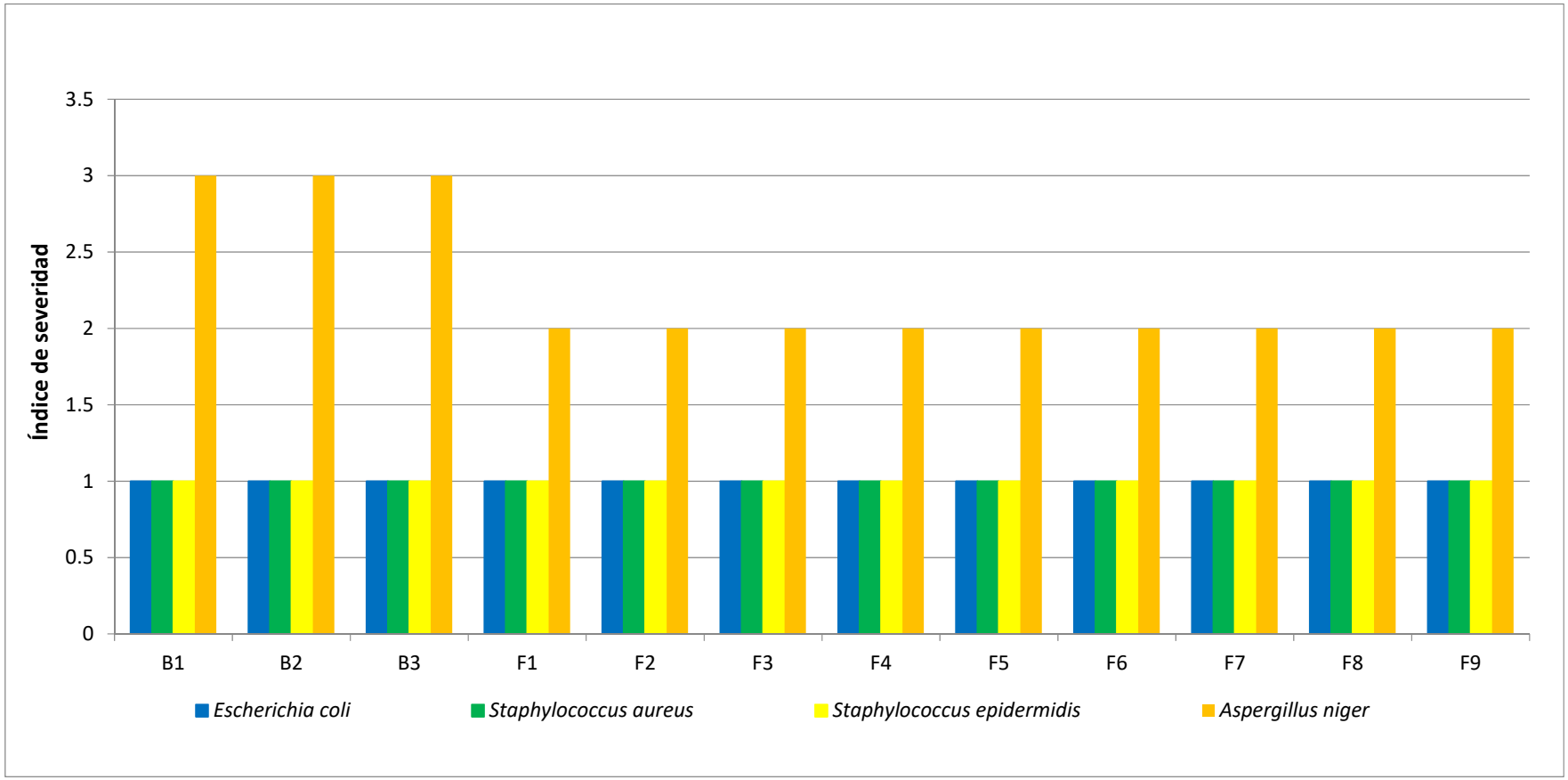


Figura 20. Actividad antimicrobiana de las diferentes biopelículas frente a los diversos patógenos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Aspergillus niger*) mediante el índice de severidad.

5.6. EVALUACIÓN DE PROPIEDAD MECÁNICA

5.6.1.1. Fuerza de tracción

La fuerza de tracción (MPa) se determinó al dividir la carga máxima (N) entre el área inicial de la sección transversal de la biopelícula (el área de la biopelícula fue 75 x 10^{-5} m^2).

Los resultados muestran que el material es más resistente a la tensión cuando no se le agrega AE de *Minthostachys mollis* “Muña”. Como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Fuerza de tracción de las biopelículas sintetizadas.

Sistema	Velocidad de cruceta 50mm/min	Fuerza de tracción (MPa)
B1	13.30 kN	17.73
B2	9.70 kN	12.93
B3	9.40 kN	12.53
F1	-	-
F2	-	-
F3	-	-
F4	-	-
F5	-	-
F6	-	-
F7	-	-
F8	-	-
F9	-	-

VI. DISCUSIÓN

Actividad antioxidante

La captación de radicales libres DPPH es un ensayo común y uno de los más utilizados para determinar el potencial antioxidante de diferentes muestras *in vitro*. El ensayo realizado demuestra que las biopelículas analizadas podrían ser captadoras de radicales libres que actúan como átomos de hidrógeno o donantes de electrones[116].

Para todas las biopelículas probadas, la actividad antioxidante aumentó al incrementar la concentración del AE, alcanzando su máxima actividad antioxidante con las biopelículas que contienen aceite esencial al 5% de concentración. El porcentaje de actividad antioxidante más bajo se detectó para las biopelículas que no contenían aceite esencial, siendo 18,33%, 16.26% y 18.72% para las biopelículas de quitosano al 3%, 2% y 1% respectivamente.

La baja actividad antioxidante de las biopelículas que solo contienen quitosano, en la literatura, se les atribuye principalmente a la grupos amino libres residuales del quitosano, tales grupos aminos reaccionan con los radicales libres formando radicales macromoleculares estables y grupos amonio[116, 118, 126]. Así mismo la actividad antioxidante del quitosano depende de factores como: la concentración de quitosano, peso molecular, grado de desacetilación y duración de la prueba[116].

Cuando se añadió AE de Muña a la biopelícula de quitosano, la actividad antioxidante aumentó ($p < 0,05$). El incremento de actividad antioxidante se mantuvo similar en las biopelículas con aceite esencial al 5% y 2%, en una rango de actividad antioxidante del 61 al 62% ($p > 0,05$). Las biopelículas con aceite esencial al 0,5% mostraron un incremento de la actividad antioxidante menor respecto a las biopelículas con aceite esencial al 5% y 2%, variando en un rango de actividad antioxidante del 39 al 42%.

Nevena Hromiš[116], refiere que el ensayo de actividad antioxidante debe realizarse no solo a 30 minutos sino a las 4-5 horas y 24 horas para medir el progreso de actividad antioxidante debido a que las biopelículas no estarán en contacto por unos minutos con el alimento sino que permanecerán en contacto más de 24

horas. Entre sus resultados a 24 horas las biopelículas funcionalizadas con aceite esencial tienen una actividad antioxidante de hasta 80%.

Para el caso de las biopelículas funcionalizadas con AE de Muña se logró altos porcentajes de actividad antioxidante debido a que el AE tiene una alta capacidad antioxidante. Granados y col[127] y Castañeda y col[7] reportan que el AE de Muña puede llegar hasta un porcentaje de actividad antioxidante del 90%, esto se le atribuye a la pulegona componente del AE. En la tabla N° 6 podemos apreciar que el aceite esencial usado está compuesto por 40.94% de pulegona (compuesto asociado a la capacidad antioxidante) y 32.72% mentona[7].

Actividad Antimicrobiana

La actividad antibacteriana y antifúngica de las biopelículas de quitosano funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña" se investigó utilizando los métodos zona de inhibición en el área de contacto cuantificado mediante la fórmula: índice de severidad[121, 122, 128-130].

Las zonas de inhibición obtenidas por los compuestos de quitosano y quitosano con AE mostrados en la Figura N° 20 no mostraron la formación de halos inhibitorios alrededor de las biopelículas de quitosano control y quitosano con AE de *Minthostachys mollis* "Muña". Se observó zona inhibitoria solo en la zona de contacto para las pruebas con *S. aureus*, *S epidermidis y E. coli*. Para el caso del hongo *Aspergillus niger*, se encontró que es menos susceptible respecto a otros microorganismos, las biopelículas de quitosano control no tuvieron efecto inhibitorio en la zona de contacto, por el contrario tuvo lugar la proliferación completa del hongo *Aspergillus niger*. Las biopelículas funcionalizadas con AE de *Minthostachys mollis* "Muña" solo tuvieron efecto inhibitorio en la zona de contacto con el hongo *Aspergillus niger*.

Informes en la literatura sobre la actividad antimicrobiana de biopelículas de quitosano a través del ensayo: difusión en agar, demuestran crecimiento de halos alrededor de la biopelícula por la capacidad de migración de este[131, 132]. Por el contrario cuando se incorpora aceite esencial a la formulación de una biopelícula

de quitosano se reduce su capacidad de difusión. Por lo que no se logra apreciar la formación de halos alrededor de la biopelícula. Esta reducción de la tasa de difusión es positiva ya que permite mantener mayores concentraciones del compuesto activo (aceite esencial) en contacto con la superficie a la que sea aplicada la biopelícula. Siendo inhibidos los organismos que estén en contacto directo con el sitio activo[116, 133-136].

Nevena Hromiš[116] y col sugieren usar el método ASTM E2149, que es un método de prueba antimicrobiano cuantitativo, que se caracteriza por realizarse en condiciones de contacto dinámico. Esto obedece a la baja tasa de difusión del activo (al formarse una biopelícula entre quitosano y aceite esencial).

Aunque no están claros los mecanismos por los que el quitosano conjuntamente con los aceites esenciales actúa como antimicrobianos y antifúngicos, es importante resaltar que la eficacia del antimicrobiano incorporado a una biopelícula de quitosano depende de la polaridad de la molécula, de su estructura química y de la formación de enlaces cruzados entre moléculas[116, 134, 137]. Se postula que la pared celular de los microorganismos debido a la impermeabilidad mantiene al quitosano en la superficie exterior[138]. Los aceites esenciales pueden alterar la estructura superficial de la pared celular de los microorganismos facilitando el contacto entre el quitosano y membrana celular del mismo.
El quitosano afecta la membrana celular a través de interacciones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente[134, 139]. Una vez que se rompe la membrana celular, el quitosano es capaz de ingresar a la célula[134, 140]. Esto puede conducir a la inhibición de la síntesis de ADN / ARN, la interrupción de la síntesis de proteínas[141] y la reducción de la síntesis de la pared celular[134, 142].

Un estudio de Dos Santos y col[143] revelaron la actividad antimicótica de biopelículas que contienen quitosano (5320 mg/mL) y aceite esencial de *Origanum vulgare* L. 2.5 µL/mL (OVEO), con carvacrol como componente mayoritario, frente a *A. niger*. Las biopelículas provocaron altas tasas de inhibición en la germinación de esporas, así como cambios morfológicos (marchitamiento, rotura, pérdida de material celular y profundización de las crestas) en el micelio.

Propiedades mecánicas

La incorporación del AE de *Minthostachys mollis* “Muña” a la biopelícula de quitosano afectaron considerablemente en sus propiedades mecánicas, como se muestra en la Tabla 8.

Las biopelículas hechas solo con quitosano tuvieron una resistencia de 17.73 MPa, 12.93 MPa y 12.53 MPa para las concentraciones de quitosano de 1%, 2% y 3% respectivamente.

La disminución de la fuerza de tensión se atribuye a una fuerte interacción que se da entre el quitosano y el AE de *Minthostachys mollis* “Muña”. Se produce un efecto de reticulación, la cual da una mayor rigidez a la estructura. Así mismo las discontinuidades generadas en la matriz provocan una pérdida de la cohesión de la biopelícula y resistencia mecánica. A nivel molecular disminuye el volumen libre y la movilidad del quitosano[124, 144].

En estudios previos se ha encontrado que la interrupción de las agregaciones de la cadena de quitosano facilita el desplazamiento de la cadena durante el estiramiento, lo que le da a la biopelícula una mayor capacidad de deformarse sin romperse[124, 145, 146].

La fuerza de tensión obtenida para las biopelículas a base de quitosano exento del AE fueron inferiores a la fuerza de tensión de materiales plásticos cotidianamente usados como: PVC, PE, PP, PC entre otros [147, 148].

Así mismo la fuerza de tensión de las biopelículas de quitosano puro fue inferior a lo reportado en la literatura. Siendo considerado la fuerza de tensión en biopelículas de quitosano puro el rango de 30-100 MPa[149-151]. El descenso de la fuerza de tensión es pobremente atribuible al uso de propilenglicol, el cual se usó como emulsificante para poder facilitar la incorporación del aceite esencial a la estructura del quitosano.

Por todo la información recopilada respecto a biopelículas funcionalizadas con AE y la información obtenida al formular las biopelículas con AE de muña, determinar

la actividad antioxidante, actividad antimicrobiana y actividad antifúngica; se constituye la base para futuras investigaciones, ya que no se han reportado estudios que utilicen al aceite esencial de Muña como funcionalizador de biopelículas y recubrimientos.

VII. CONCLUSIONES

1. Se caracterizó los componentes del aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” mediante CG/-MS; se lograron identificar 29 componentes; siendo dos componentes los principales: mentona (32,72%) y pulegona (40,94%).
2. Se formularon y elaboraron 12 biopelículas a base de quitosano sin aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” y otras funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” con distintas concentraciones de aceite esencial de Muña (AE) y quitosano(Q_0) a las cuales se les asignó una codificación interna de la siguiente manera: F1 (Q_0 3% y AE 5%), F2 (Q_0 2% y AE 0.5%), F3 (Q_0 1% y AE 2%), F4 (Q_0 1% y AE 0.5%), F5 (Q_0 3% y AE 0.5%), F6 (Q_0 3% y AE 2%), F7 (Q_0 1% y AE 5%), F8 (Q_0 2% y AE 5%), F9 (Q_0 2% y AE 2%), B1 (Q_0 1%), B2 (Q_0 2%), B3 (Q_0 3%).
3. Las biopelículas formuladas a base de quitosano y funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” mostraron una alta actividad antioxidante siendo el rango más alto de 61 a 62% ($p < 0.05$) (como captador de los radicales DPPH) en comparación a las biopelículas que no fueron funcionalizada con el aceite”.
4. Las biopelículas formuladas a base de quitosano y funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” y las biopelículas formuladas a base de quitosano sin aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” presentaron actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis y Escherichia coli* cuando están en contacto.
5. Las biopelículas formuladas a base de quitosano y funcionalizadas con aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” mostraron actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger* cuando están en contacto. Y las biopelículas formuladas a base de quitosano sin aceite esencial de *Minthostachys mollis* “Muña” no presentaron actividad antifúngica frente a *Aspergillus niger* cuando están en contacto.

VIII. RECOMENDACIONES

Se recomienda el empleo del método ASTM E2149, para la evaluación de actividad antimicrobiana de las biopelículas ya que por características de la biopelícula el método por difusión en agar no permite una adecuada visualización de la inhibición de crecimiento de microorganismos.

Se sugiere profundizar la investigación en el uso de diferentes aceites esenciales con capacidad antioxidante y antimicrobiana para obtener biopelículas con mejores características mecánicas.

En base a los resultados obtenidos, de biopelículas formadas por quitosano y AE de *Minthostachys mollis* “Muña”, se recomienda utilizar quitosano a una única concentración del 1% y AE de *Minthostachys mollis* “Muña” a una concentración menor del 0.5% para la formación de las biopelículas.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Martelli M, Barros T, De Moura M, Maltoso L, Assis O. Effect of chitosan nanoparticles and pectin content on mechanical properties and water vapor permeability of banana puree films. J Food Sci. 2013; 78(1): 98–104. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.03006.x.

2. Cháfer M, Sánchez-González L, González- Martínez Ch, Chiralt A. Fungal decay and shelf life of oranges coated with chitosan and bergamot, thyme, and tea tree essential oils. J Food Sci. 2012; 77(8): 182–187. doi:10.1111/j.1750-3841.2012.02827.x.

3. Krkic N, Lazi V, Savatic S, Sojuc B, Petrovi L, Šuput D. Application of chitosan coating with oregano essential oil on dry fermented sausage. J Food Nutr Res. 2012; 51(1): 60–68.

4. "Peng Y, Yin L y Li Y. Combined effects of lemon essential oil and surfactants on physical and structural properties of chitosan films. Int J Food Sci. 2013; 48: 44–50. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.03155.x".

5. López A, Ruiz S, Silva P, Ornelas J, Zamudio P, Burrue S. Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. Molecules. 2013; 18: 13735-13753. doi:10.3390/molecules181113735.

6. Inga B, Guerra M, Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* contra algunas bacterias, hongos de interés en la Salud. [Tesis de Grado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2000.

7. Granados C, Yáñez R, Santafé P. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 2012; 10 (1):12-23.

8. Kalemba D, Kunicka A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Curr Med Chem. 2003; 10: 813-829. doi:10.2174/0929867033457719.

9. "Rojas O. Evaluación fitoquímica y actividad anti-*helicobacter pylori* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña" en pacientes con gastritis del Hospital Militar Central. [Tesis Doctoral] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2017".

10. Vázquez B, Guerrero B. Recubrimientos de frutas con biopelículas. TSIA. 2013; 7(2): 5-14.

11. “Ali A, Maqbool M, Ramachandran S, Alderson P. Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. Postharvest Biol Technol. 2010; 58(1): 42–47. doi:10.1016/j.postharvbio.2010.05.005”.

12. “Vásquez M, Guerrero J, Ochoa C, Mata M. Recubrimientos y películas comestibles a base de quitosano con aceite esencial de *Cymbopogon citratus* aplicados en guayava (*Psidium guajava* L.). Rev Csc Nat & Agrop. 2015; 2(2): 120-135”.

13. “Ruiz M. Aplicación de Quitosano con Aceites Esenciales contra *Botrytis cinerea* Pers. “Moho Gris” en *Lycopersicon esculentum* P. Mill “Tomate”. [Tesis de grado]. Lima: Universidad Ricardo Palma. 2018”.

14. “Cazarez D. Efecto del aceite esencial de *Tagetes lucida* en una biopelícula de quitosano sobre *Botrytis cinérea* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi). [Tesis de Maestría]. Michoacana: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 2017”.

15. Yanapa L. Elaboración de Biopelículas para envasado de alimentos a partir de Quitosano y Cañihua (*Chenopodium pallidicaule*). [Tesis de Grado]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2019.

16. Gonzales R, Urbina N, Alcazar L. Caracterización Viscoelástica de Biopelículas Obtenidas a Base de Mezclas Binarias. Inf tecnol. 2015; 26(3): 71-76. doi:10.4067/S0718-07642015000300011.

17. Escobar J. Elaboración y caracterización de biopelículas elaboradas con quitosano y adicionadas con partículas de almidón. [Tesis de Grado]. México: Universidad Autónoma del Estado de México; 2020.

18. Pojanavaraphan T, Magaraphan R, Chiou B-S, Schiraldi D. Development of Biodegradable Foam like Materials Based on Casein and Sodium Montmorillonite Clay. Biomacromolecules. 2010; 11(10): 2640-2646. doi:10.1021/bm100615a.

19. Matos C. Revisión de literatura: Biopelículas a base de quitosano como potencial aplicación en empaque de alimentos. [Tesis de Grado]. San Antonio de Oriente: Universidad Zamorano; 2020.

20. Wihodo M, Moraru C. Physical and chemical methods used to enhance the structure and mechanical properties of protein films: a review. J Food Eng. 2013; 114(3): 292–302. 302. doi:10.1016/j.jfoodeng.2012.08.021.

21. “Zaritzky N. Edible Coatings to Improve Food Quality and Safety. En: Aguilera M, editor. Food Engineering Interfaces. New York: Springer; 2011. p 631–659. doi:10.1007/978-1-4419-7475-4_27”.

22. García M, Pinotti A, Martino M, Zaritzky N. Characterization of Starch and Composite Edible Films and Coatings. En: Huber K, Embuscado M, editors. Edible Films and Coatings for Food Applications. New York: Springer; 2009. p 169-209. doi:10.1007/978-0-387-92824-1_6.

23. Donhowe I, Fennema O. Edible Films and Coatings: Characteristics, Formation, Definitions, and testing methods. En: Krochta J, Baldwin E, Nisperos-Carriedo M, Editores. Edible Coating and films to improve food quality. Lancaster: Technomic Publishing Co; 1994. p 1–24.

24. “Cerqueira M, Lima Á, Teixeira J, Moreira R, Vicente A. Suitability of novel galactomannans as edible coatings for tropical fruits. J Food Eng. 2009; 94(3-4): 372–378. doi:10.1016/j.jfoodeng.2009.04.003”.

25. McHugh T, Avena-Bustillos R, Krochta J. Hydrophilic Edible Films: Modified Procedure for Water Vapor Permeability and Explanation of thickness Effects. J Food Sci. 1993; 58(4): 899-903. doi:10.1111/j.1365-2621.1993.tb09387.x.

26. ASTM INTERNATIONAL [Internet]. ASTM E96 / E96M-10 - Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials. Philadelphia: ASTM international. [Revisado en diciembre del 2018]. Disponible en: http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E96E96M.

27. McHugh T, Krochta J. Dispersed phase particle size effects on water vapor permeability of whey protein-beeswax edible emulsion films. J Food Process. 1994; 18(3): 173-188. doi:10.1111/j.1745-4549.1994.tb00842.x.

28. Baldwin E, Hagenmaier R, Bai J. Edible Coatings and Films to Improve Food Quality. 2da Ed. Boca Raton: CRC Press; 2011. doi:10.1201/b11082.

29. Dhall R. Advances in Edible Coatings for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2013; 53(5): 435–450. doi:10.1080/10408398.2010.541568.

30. Falguera V, Quintero J, Jiménez A, Muñoz J, Ibarz A. Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. Trends Food Sci Technol. 2011; 22(6): 292–303. doi:10.1016/j.tifs.2011.02.004.

31. Han J. Innovations in Food Packaging. 2da Ed. San Diego: Elsevier; 2014.

32. Altenhofen M, Krause A, Guenter T. Alginate and pectin composite films crosslinked with Ca+2 ions: effect of the plasticizer concentration. Carbohydr. 2009; 77: 736–742. doi:10.1016/j.carbpol.2009.02.014.

33. Aguirre J, De Leon M, Alvarez O, Torres C, Nieto D et al. Basic and Applied Concepts of Edible Packaging for Foods. En: Grumezescu A, Editor. Food packaging and preservation. London: Elsevier; 2018. 1-62.

34. Badui S. Química de los Alimentos. 4ta Ed. Naucalpan de Juárez: Pearson Educación; 2006.

35. "AINIA [Internet]. Tendencias de envasado en elaborados cárnicos. Parque Tecnológico de Valencia: Eurocarne. [Revisado en diciembre del 2018]. Disponible en: http://www.eurocarne.com/ daal?a1=informes&a2=tendencias_envasa.pdf".

36. Erginkaya Z, Kalkan S, Unal E. Use of antimicrobial edible films and coatings as packaging materials for food safety. En: Malik A, Erginkaya Z, Ahmad S, Erten H, editores. Food Processing: Strategies for Quality Assessment. New York: Springer; 2014. p 261-295. doi:10.1007/978-1-4939-1378-7_10.

37. Romero A, Pereira J. Review: Chitosan, a versátil biomaterial. State of the art from its obtaining to its multiple applications. Revista Ingeniería UC. 2020; 27(2): 118-135.

38. "Campos C, Gerschenson L, Flores S. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. Food Bioproc Technol. 2011; 4: 849–875. doi:10.1007/s11947-010-0434-1".

39. "Ferreira C, Nunes C, Delgadillo I. Lopes-Da-Silva J. Characterization of chitosan whey protein films at acid pH. Food Res Int. 2009; 42: 807–813. doi:10.1016/j.foodres.2009.03.005".

40. "Moreira R, Pereda M, Marcovich N, Roura S. Antimicrobial effectiveness of bioactive packaging materials from edible chitosan and casein polymers: assessment on carrot, cheese, and salami. J Food Sci. 2011; 76: 54–63. doi:10.1111/j.1750-3841.2010.01910.x".

41. "Alvarez M, Ponce A, Moreire M. Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. Food Sci Technol. 2013; 50: 78–87. doi:10.1016/j.lwt.2012.06.021".

42. Çağrı A, Ustunol Z, Ryser E. Inhibition of three pathogens on bologna and summer sausage using antimicrobial edible films. J Food Sci. 2002; 67(6): 2317–2324. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb09547.x.

43. Almasi H, Ghanbarzadeh B, Entezami A. Physicochemical properties of starch–CMC–nanoclay biodegradable films. Int J Biol. 2010; 46(1): 1–5. doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.10.001.

44. Bourtoom T. Edible films and coatings: characteristics and properties. Food Res. 2008; 15 (3): 1–12.

45. “Skurtys O, Velásquez P, Henriquez O, Matiacevich S, Enrione J, Osorio F. Wetting behavior of chitosan solutions on blueberry epicarp with or without epicuticular waxes. LWT. 2011; 44 (6): 1449–1457. doi:10.1016/j.lwt.2011.02.007”.

46. Dhanapal A, Sasikala P, Rajamani L, Kavitha V, Yazhini G et al. Edible films from polysaccharides. Food Sci Qual Manag. 2012; 3: 9–18.

47. “Espitia P, Du W, Avena-Bustillos J, Soares N, McHugh T. Edible films from pectin: physical-mechanical and antimicrobial properties - A review. Food Hydrocolloids. 2014; 35: 287–296. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.06.005”.

48. “Espitia P, Avena-Bustillos J, Du W, Teófilo R, Soares N, McHugh T. Optimal antimicrobial formulation and physical–mechanical properties of edible films based on açaí and pectin for food preservation. Food Packag Shelf Life. 2014; 2(1), 38-49. doi:10.1016/j.fpsl.2014.06.002”.

49. Ali A, Maqbool M, Alderson P, Zahid N. Effect of gum Arabic as an edible coating on antioxidant capacity of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit during storage. Postharvest Biol Technol. 2013; 76: 119–124. doi:10.1016/j.postharvbio.2012.09.011.

50. Anderson D, Millar J, Wang W. Gum arabic (*Acacia senegal*): unambiguous identification by 13C-NMR spectroscopy as an adjunct to the revised JECFA specification and the application of 13C-NMR spectra for regulatory legislative purposes. Food Addit Contam. 1991; 8: 405–421.

51. “Maqbool M, Ali A, Alderson P, Mohamed M, Siddiqui Y, Zahid N. Posthabest application of gum Arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. Postharvest Biol. Technol. 2011; 62: 71–76. doi:10.1016/j.postharvbio.2011.04.002”.

52. Maqbool M, Ali A, Ramachandran S, Smith D, Alderson P. Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating. Crop Protection. 2010; 29: 1136–1141. doi:10.1016/j.cropro.2010.06.005.

53. “Albert A, Guardeno L, Salvador A, Fiszman S. Alginate as edible coatings for microwaveable food. International Conference on Food Innovations. Valencia: Elsevier; 2010. October 25-29”.

54. Song Y. Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama*

amblycephala). Food Control. 2011; 22 (3–4): 608–615. doi:10.1016/j.foodcont.2010.10.012.

55. Seol K, Lim D, Jang A, Jo C, Lee M. Antimicrobial effect of k-carrageenan-based edible film containing ovotransferrin in fresh chicken breast stored at 5˚C. Meat Sci. 2009; 83(3): 479–483. doi:10.1016/j.meatsci.2009.06.029.

56. Fabra M, Hambleton A, Talens P, Debeaufort F, Chiralt A, Voilley A. Aroma barrier properties of sodium caseinate based films. Biomacromolecules. 2008; 9 (5): 1406–1410. doi:10.1021/bm701363p.

57. Karbowiak T, Debeaufort F, Champion D, Voilley A. Wetting properties at the surface of iotacarrageenan- based edible films. J Colloid Interface Sci. 2006; 294: 400–410. doi:10.1016/j.jcis.2005.07.030.

58. "Moreira M, Cassani L, Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R. Effects of polysaccharide-based edible coatings enriched with dietary fiber on quality attributes of fresh-cut apples. J Food Sci Technol. 2015; 52(12): 7795–7805. doi:10.1007/s13197-015-1907-z".

59. "Rojas-Graü M, Tapia M, Martín-Belloso O. Using polysaccharide based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apple. LWT. 2008; 41: 139–147. doi:10.1016/j.lwt.2007.01.009".

60. Oliu G, Martín-Belloso O, Soliva-Fortuny R. Pulsed light treatments for food preservation: a review. Food Bioproc Tech. 2010; 3: 13–23. doi:10.1007/s11947-008-0147-x.

61. "Robles-Sanchez R, Rojas-Graü A, Odriozola-Serrano I, Gonzalez-Aguilar G, Martín-Belloso O. Influence of alginate-based edible coating as carrier of antibrowning agents on bioactive compounds and antioxidant activity in fresh-cut Kent mangoes. LWT. 2013; 50: 240–246. doi:10.1016/j.lwt.2012.05.021".

62. "Dalanche F, Carvalho C, Alves V, Moldao-Mrtins M, Mata P. Optimisation of gellan gum edible coating for ready-to-eat mango (*Mangifera indica L.*). Int J Biol. 2016; 84: 43–53. doi:10.1016/j.ijbiomac.2015.11.079".

63. Code of Federal Regulations [Internet]. Title 21 Food and Drugs Section 172. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption. Washington: Food and Drug Administration (FDA). [Revisado en diciembre del 2018]. Disponible en: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?CFRPart=172&showFR=1.

64. Sharma S, Rao R. Xantan gum based edible coating enriched with cinnamic acid prevents browning and extends shelf-life of fresh-cut pears. LWT. 2015; 62: 791–800. doi:10.1016/j.lwt.2014.11.050.

65. "Zambrano M, Mercado E, Del Real L, Gutirrez E, Cornejo M, Quintanar D. The effect of nano-coatings with alpha-tocopherol and xanthan gum on shelflife and browning index of fresh-cut "red Delicious" apples. Innov Food Sci Emerg Technol. 2014; 22: 188–196. doi:10.1016/j.ifset.2013.09.008".

66. Mohamed A, Aboul-Anean H, Hassan A. Utilization of edible coating in extending the shelf life of minimally processed prickly pear. Jou J Appl Sci Res. 2013; 9: 1202–1208.

67. Freitas I, Cortez-Vega W, Pizato S, Prentice-Hernandez C, Borges C. Xanthan gum as a Carrier of preservative agents and calcium chloride applied on fresh-cut apple. J Food Saf. 2013; 33: 229–238. doi:10.1111/jfs.12044.

68. "Belitz H, Grosch W, Schieberle P. Food Chemistry. 4ta Ed. Heidelberg: Springer; 2009".

69. Akoh C, Min D. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. 3era Ed. Boca Raton: CRC Press; 2008.

70. Huber K, Embuscado M. Edible Films and Coatings for Food Applications. New York: Springer; 2009.

71. Igoe R. Dictionary of Food Ingredients. 5ta Ed. New York: Spinger; 2011.

72. Chow C. Fatty Acids in Foods and their Health Implications. 3era Ed. Boca Raton: CRC Press; 2008.

73. "Rodrigues D, Cunha A, Brito E, Azeredo H, Gallão M. Mesquite seed gum and palm fruit oil emulsion edible films: influence of oil content and sonication. Food Hydrocoll. 2016; 56: 227–235. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.12.018".

74. Vargas M, Albors A, Chiralt A. Application of chitosan-sunflower oil edible films to pork meat hamburgers. Procedia Food Sci. 2011; 1: 39–43. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.007.

75. Han J. Innovations in Food Packaging. 2da Ed. Elsevier Ltd: San Diego; 2014.

76. Chiumarelli M, Hubinger M. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. Food Hydrocoll. 2014; 38: 20–27. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.11.013.

77. Chauhan O, Nanjappa C, Ashok N, Ravi N, Roopa N et al. Shellac and Aloe vera gel based surface coating for shelf life extension of tomatoes. J Food Sci Technol. 2015; 52: 1200–1205. doi:10.1007/s13197-013-1035-6.

78. Han J, Scanlon M. Mass transfer of gas and solute through packaging materials. En: Han J, Editor. Innovations in Food Packaging. 2da Ed. San Diego: Elsevier; 2014. p 37–49. doi:10.1016/b978-0-12-394601-0.00003-5.

79. Mohammad S, Mohammad A, Zahedi Y. Characterisation of a new biodegradable edible film based on sage seed gum: Influence of plasticiser type and concentration. Food Hydrocoll. 2015; 43: 290–298. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.05.028.

80. "Whitehurst R. Emulsifiers in Food Technology. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2004".

81. Fadini A. Mechanical properties and water vapour permeability of hydrolysed collagen: cocoa butter edible films plasticised with sucrose. Food Hydrocoll. 2013; 30 (2): 625–631. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.08.011.

82. Han J, Gennadios A. Edible films and coatings: review. En: Han J, Editor. Innovations in Food Packaging. 2da Ed. San Diego: Elsevier; 2014. p 213–255. doi:10.1016/b978-012311632-1/50047-4.

83. "García M, Martino M, Zaritzky N. Lipid Addition to Improve Barrier Properties of Economic Botany. 2014; 48: 60-64".

84. Lacroix M, Vu K. Edible Coating and Film Materials: Proteins. Innovations in Food Packaging. 2da Ed. San Diego: Elsevier; 2014. p 277–304. doi:10.1016/b978-0-12-394601-0.00011-4.

85. "Lebuhn A. Using amplified fragment length polymorphism (AFLP) to unravel species relationships and delimitations in *Minthostachys* (Labiatae). Bot J Linn Soc. 2007; 153: 9-19. doi:10.1111/j.1095-8339.2007.00588.x".

86. "Sotta N. Plantas aromáticas y medicinales de la región Arequipa. Arequipa: Editorial Akuarella; 2000".

87. Brako L, Zarucchi J. Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. Vol 45. Missouri: Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard; 1993.

88. "Cano C. Actividad antimicótica *in vitrio* y elucidación estructural del aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña" [Tesis de Maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007".

89. Yapuchura R. Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de Muña (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) e Inca Muña (*Clinopodium bolivianum* (Benth.) Kuntze) [Tesis de Maestría]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2010.

90. López G. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis* "ruyac Muña" [Tesis de Grado]. Huamanga: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2006.

91. Mostacero J, Mejía F, Gamarra O. Taxonomía de las fanerógamas útiles del Perú. Trujillo: Editorial Normas Legales; 2002.

92. Mora F, Araque M, Rojas L, Ramirez R, Silva B et al. Chemical composition and *in vitro* antibacetrail activity of the essential oil *Minthostachys mollis* from Venezuela Andes. Nat Prod Commun. 2009; 4(7): 997-1000. doi:10.1177/1934578x0900400726.

93. "Oblitas E. Plantas medicinales en Bolivia: Farmacopea Callawaya. 2da Ed. La Paz: Editorial los amigos del libro; 1998".

94. "Carhuapoma M, Angulo P. Plantas medicinales en atención primaria de salud, agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: Perspectivas de desarrollo en la región Los Libertadores Wari. Ayacucho: Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura; 1999".

95. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* "Muña". Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2008; 25(3): 298-301.

96. Ferreira N. Chitosan properties and application. En: Long Y, editor. Biodegradable Polymer Blends and Composites from Renewable Resources. New York: Wiley; 2009. p 107-127. doi:10.1002/9780470391501.

97. "Crini G, Badot P. Application of chitosan, a natural aminopolysaccharide, for dye removal from aqueous solutions by adsorption processes using batch studies: a review of recent literature. Prog Polym Sci. 2008; 33: 399–447. doi:10.1016/j.progpolymsci.2007.11.001".

98. Rabea E, Badawy M, Stevens C, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules. 2003; 4: 1457–1465. doi:10.1021/bm034130m.

99. Moradi M, Tajik H, Razavi S, Oromiehie A, Malekinejad H et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with Zataria multiflora Boiss essential oil and grape seed extract. LWT. 2012; 46: 477–484. doi:10.1016/j.lwt.2011.11.020.

100. "Entsar S, Nagy K, Elsabee M. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. Biores Technol. 2008; 99: 1359–1367. doi:10.1016/j.biortech.2007.01.051".

101. Dutta P, Shipra T, Mehrotra G, Dutta J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food Chem. 2009; 114: 1173–1182. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.047.

102. Broek L, Knoop R, Kappen F, Boeriu C. Chitosan films and blends for packaging material. Carbohy Polym. 2015; 116: 237–242. doi:10.1016/j.carbpol.2014.07.039.

103. Villamán M. Elaboración y caracterización de films comestibles basados en mezclas entre proteínas de quinua y quitosano [Tesis de Grado]. Santiago: Universidad de Chile; 2007.

104. "Elsabee M, Abdou E. Chitosan based edible films and coatings: a review. Mater. Sci. Eng. 2013; 33: 1819–1841. doi:10.1016/j.msec.2013.01.010".

105. Cruz R, Alves V, Khmelinskii I, Vieira M. New Food Packaging Systems. En: Grumezescu A, Editor. Food packaging and preservation. London: Elsevier; 2018. p 63-86.

106. Sebti I, Martial-Gros A, Carnet-Pantiez A, Grelier S. Coma V. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus Niger* contamination. Int J Food Sci. 2005; 70(2):100-104. doi:10.1111/j.1365-2621.2005.tb07098.x.

107. Puma R. Extracción y caracterización de aceite esencial de paico (*chenopodium ambrosioides*) mediante arrastre de vapor [Tesis de Grado]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2019.

108. "Coronado M, Vega S, Gutiérrez R, Vásquez M, Radilla C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. Rev Chil Nutr. 2015; 42(2): 206-212".

109. Scientific Committees [Internet]. Definición: Antimicrobiano. [Revisado el 24 de Mayo del 2020]. Disponible en: https://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/triclosan/es/glosario/abc/antimicrobiano.htm

110. Federación de enseñanza de Andalucía [Internet]. Tipos de esfuerzos físicos: Temas para educación. [Revisado el 20 de Mayo del 2020]. Disponible en: https://www.feandalucia.ccoo.es/docu/p5sd8567.pdf

111. Real Academia Española [Internet]. Definición: Potencialización: RAE. [Revisado el 23 de Abril del 2020]. Disponible en: https://dle.rae.es/potenciaci%C3%B3n

112. Cronquist A. The evolution and classification of flowering plants. 2da Ed. New York: Botanical Garden; 1988.

113. Torrenegra M, Granados C, Duran M, León G, Yáñez X, Martínez C. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Minthostachys mollis*. Orinoquía. 2016; 20(1): 69-74.

114. Arham R, Mulyati M, Metusalach M, Salengke S. Physical and mechanical properties of agar based edible film with glicerol plasticizer. Int Food Res J. 2016; 23(4): 1669-1675. doi:10.31227/osf.io/tq2pf.

115. "Yuan G, Hua L, Yan B, Chen X, Sun H. Physical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chitosan Films Containing Carvacrol and Pomegranate Peel Extract. Molecules. 2015; 20(6): 34-45. doi:10.3390/molecules200611034".

116. Hromiš N, Lazić V, Markov S, Vaštag U, Popović S, Šuput D et al. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. J Food Eng. 2015(158): 86-93. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.01.001.

117. Tovar del Rio J. Determinación de la actividad antioxidante por DPPH y ABTS de 30 plantas recolectadas en la ecoregion cafetera [Tesis de Grado]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira; 2013.

118. "Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Sendra E, Perez-Alvarez J, Fernández-López J. *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. Food Control. 2013; 30(2): 386-392. doi:10.1016/j.foodcont.2012.07.052".

119. Pérez L, Balagué C, Rubiolo A, Verdini R. Evaluation of the biocide properties of whey-protein edible films with potassium sorbate to control non-O157 Shiga Toxin producing *Escherichia coli*. Procedia Food Sci. 2011; 1: 203-209. doi:10.1016/j.profoo.2011.09.032.

120. "Kuorwel K, Cran M, Sonneveld K, Miltz J, Bigger S. Antimicrobial Activity of Biodegradable Polysaccharide and Protein-Based Films Containing Active Agents. J Food Sci. 2011: 76(3): 90-102. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02102.x".

121. "Perez N, Flore N, Garcia V, Lozano V. Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades del frijol (*phaseolus vulgaris*). Revista mexicana de fitoterapia. 1995; 13: 1-9".

122. Acosta A. Diseño, caracterización y evaluación de películas comestibles con actividad antifúngica elaborados con mucílago de nopal y quitosano [Tesis de Grado]. Mexico: Instituto politecnico Nacional; 2013.

123. Rhim J, Wang L, Hong S. Preparation and characterization of agar/silver nanoparticles composite films with antimicrobial activity. Food Hydrocoll. 2013; 33(2): 327-335. doi:10.1016/j.foodhyd.2013.04.002.

124. Bonilla J, Atarés L, Vargas M, Chiralt A. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. Food Hydrocoll. 2012; 26(1): 9-16. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.03.015.

125. ASTM INTERNATIONAL. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In Standard D882 Annual book of American standard testing methods. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 2001. p 162-170.

126. "Yen M, Yang J, Mau J. Antioxidant properties of chitosan from crab shells. Carbohydr Polym. 2008; 74(4): 840–844. doi:10.1016/j.carbpol.2008.05.003".

127. Castañeda C, Ramos LL, Ibáñez V. Evaluación de la capacidad antioxidante de siete plantas medicinales peruanas. Revista Horizonte Médico. 2008; 8: 56-72. doi:10.24265/horizmed.

128. Woods G, Washington J. Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Methods. En: Murray P, Baron E, Pfaller M, Editor. Manual of Clinical Microbiology. 6ta Ed. Washingtong: American Society of Microbiology; 1995.

129. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda S. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Analysis J Pharm. 2016; 6: 71–79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005.

130. Dafale N, Semwal U, Rajput R, Singh G. Selection of appropriate analytical tools to determine the potency and bioactivity of antibiotics and antibiotic resistance. Analysis J Pharm. 2016; 6(4): 207–213. doi:10.1016/j.jpha.2016.05.006.

131. Paulraj K, Jong-Whan R. Physicochemical properties of gelatin/silver nanoparticle antimicrobial composite films. Food Chemistry. 2014; 148: 162–169. doi:10.1016/j.foodchem.2013.10.047.

132. Arkoun M, Ardila N, Heuzey M, Ajji A. Chitosan-Based Structures/ Coatings with Antibacterial Properties. En: Tiwari A, Editor. Handbook of Antimicrobial Coatings. Oxford: Elsevier Inc; 2017. p 357-389. doi:10.1016/b978-0-12-811982-2.00017-2.

133. "Sánchez-González L, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M. Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. J Food Eng. 2010; 98(4): 443–452. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.01.026".

134. Tovar C, Chaves-Lopez C, Serio A, Rossi C, Paparella A. Chitosan coatings enriched with essential oils: Effects on fungal decay of fruits and mechanisms of action. Trends Food Sci Technol. 2018: 78: 61-71. doi:10.1016/j.tifs.2018.05.019.

135. Pranoto Y, Rakshit S, Salokhe V. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. LWT. 2005; 38(8): 859–865. doi:10.1016/j.lwt.2004.09.014.

136. Coma V, Martial-Gros A, Garreau S, Copinet A, Salin F, Deschamps A. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. Journal of Food Science, 2006; 67(3): 1162–1169. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb09470.x.

137. Valencia-Chamorro S, Palou A, Del Río M, Pérez-Gago M. Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by hidroxypropyl methylcellulose-lipid edible composite films containing food additives with antifungal properties. J Agric Food Chem. 2008; 56(23): 11270–11278. doi:10.1021/jf802384m.

138. Palma-Guerrero J, Lopez-Jimenez J, Perez-Berna A, Huang I, Jansson H, Salinas J et al. Membrane fluidity determines sensitivity offilamentous fungi to chitosan. Mol Microbiol. 2010; 75: 1021–1032. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x.

139. "Palma-Guerrero J, Jansson H, Salinas J, Lopez-Llorca L. Effect of chitosan on hyphal growth and spore germination of plant pathogenic and biocontrol fungi. J Appl Microbiol. 2008; 104: 541-553. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03567.x".

140. Park Y, Kim M, Park S, Cheong H, Jang M et al. Investigation of the antifungal activity and mechanism of action of LMWS-Chitosan. J Microbiol Biotechnol. 2008; 18(10): 1729–1734. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.07039.x.

141. "Verlee A, Mincke S, Stevens Ch. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. Carbohydr Polym. 2017; 164: 268–283. doi:10.1016/j.carbpol.2017.02.001".

142. "Mohammadi A, Hashemi M, Hosseini S. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling Botrytis cinerea, the causal agent of gray mould disease. Innov Food Sci Emerg Technol. 2015; 28: 73-80. doi:10.1016/j.ifset.2014.12.011".

143. "Timóteo N, Athayde A, Vasconcelos C, Veríssimo C, Silva S et al. Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis*

labrusca L.). Food Microbiol. 2012; 32(2): 345-353. doi:10.1016/j.fm.2012.07.014".

144. Alfonso C. Caracterización de películas comestibles de quitosano y la afectación de las propiedades por aplicación de aceites esenciales [Tesis de Grado]. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia; 2011.

145. Fabra M. Recubrimientos comestibles a base de caseinato sódico [Tesis Doctoral]. Valencia: Universidad Poalitécnica de Valencia: 2010.

146. "Vargas M, Albors A, Chiralt A, González-Martínez C. Characterization of chitosan-oleic acid composite films. Food Hydrocoll. 2009; 23: 536-547. doi:10.1016/j.foodhyd.2008.02.009".

147. Engineering Materials [Internet]. Tensile Tests of Various Plastic Materials. Kyoto: Shimadzu Corporation. [Revisado el 15 de Junio del 2020]. Disponible en: https://www.shimadzu.com/an/industry/petrochemicalchemical/i215.html.

148. Material Property Data [Internet]. Tensile Property Testing of Plastics. Blacksburg: Matweb. [Revisado el 23 de Mayo del 2020]. Disponible en: http://www.matweb.com/reference/tensilestrength.aspx.

149. Chi S. Development and characterization of antimicrobial food coatings based on chitosan and essential oils [Thesis: Master of Science]. Tennessee: The University of Tennessee; 2004.

150. Souza V, Monte M, Pinto L. Preparation of biopolymer film from chitosan modified with lipid fraction. Int J Food Sci. 2011; 46(9): 1856–1862. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02692.x.

151. Zivanovic S, Li J, Davidson P, Kit K. Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. Biomacromolecules. 2007; 8(5): 1505-1510. doi:10.1021/bm061140p.

X. ANEXOS

ANEXO 1: Lista *de Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación – Año 2018.*

ANEXO 2: Resolución Directoral que aprueba: *los Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación (CONFIGI), ganadores del Concurso 2018*

ANEXO 3: Constancia de Ficha Taxonómica

ANEXO 4: Informe de resultados de la composición química del AE de *Minthostachys mollis* "Muña"

ANEXO 5: Análisis Estadístico: Sofware SPSS

ANEXO 1

Fecha: 24/04/2018
Hora: 09:31:48

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Vicerrectorado de Investigación y Posgrado

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

© RAIS
Usuario: RORTEGA

Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación
Año - 2018

Área: A Ciencias de la Salud — Facultad: Farmacia y Bioquímica

11 A18040761 ***BIOPELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO Y GOMA NATURAL FUNCIONALIZADAS CON ACEITES ESENCIALES DE MINTHOSTACHYS MOLLIS "MUÑA" Y PIPER CARPUNYA "PINKU", CON ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA*** — **28,500.00**

Condición en proyecto	Apellidos y nombres	Tipo	Facultad	Condición en GI
Responsable				
027154	FUERTES RUITON CESAR MAXIMO	Docente Permanente	Farmacia y Bioquímica	Coordinador
Co Responsable				
0A1906	VILLAFUERTE MONTES ÚRSULA	Docente Permanente	Farmacia y Bioquímica	Titular
Miembro Docente				
0A0459	CALIXTO COTOS MARIA ROSARIO	Docente Permanente	Química e Ingeniería Química	Adjunto
0A1904	RAMOS LLICA EVA	Docente Permanente	Farmacia y Bioquímica	Titular
080519	RETUERTO PRIETO FERNANDO OCTAVIO	Docente Permanente	Ciencias Biológicas	Titular
0A2039	RIVAS ALTEZ WALTER	Docente Permanente	Farmacia y Bioquímica	Titular
Tesista				
16047087	GONZALES DÁVILA KARY VIOLETA	Estudiante Post Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
13040126	VILLAR CALERO KAYSSER ALBERTO	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
Colaborador				
16040044	CADILLO BARRUETO KELLET SHAKED	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
16040036	CARRUITERO MORÁN GRECIA ALESSANDRA	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
15040085	GUERRA URIBE MISAEL STEVEN	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
15040026	HERNÁNDEZ TORRES CRISTIAN ANTHONY	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
14040083	MALPARTIDA CHAPOÑAN EDUARDO JOEL	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
	RUIZ PACCO GUSTAVO ADOLFO	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
15040079	VALENTIN SOTO LILIAN SILVANA	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
16040083	ZARZOZA ESPINOZA OSMAR	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente

Nombre del Grupo **PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS Y ALIMENTARIOS (PROBIOAL)**

12 A18040061 ***DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE ESTRATEGIAS PARA LA PRODUCCIÓN DE JARABES DE ISOMALTOOLIGOSACÁRIDOS DE COMPOSICIÓN DEFINIDA A PARTIR DEL ALMIDÓN DE CEBADA FORRAJERA (HORDEUM VULGARE L.) UTILIZANDO PREPARACIONES ENZIMÁTICAS COMERCIALES DE GRADO ALIMENTARIO*** — **29,600.00**

Condición en proyecto	Apellidos y nombres	Tipo	Facultad	Condición en GI
Responsable				
0A1913	VEGA PAULINO ROBERTO JHALVER	Docente Permanente	Farmacia y Bioquímica	Coordinador
Co Responsable				
0A1905	CONTRERAS LOPEZ ELIANA GABRIELA	Docente Permanente	Farmacia y Bioquímica	Titular
Miembro Docente				
0A1908	CORDOVA RAMOS JAVIER SAUL	Docente Permanente	Farmacia y Bioquímica	Titular
Tesista				
11040167	HUAMAN QUILLAY SOFIA VANESSA	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
17047047	MORALES ORCCOTTOMA ALDO FRANCISCO	Estudiante Post Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
13040146	REYES JUAREZ LIGIA ELIZABETH	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
Colaborador				
11040138	BERROCAL ROJAS CORINA ESTEFANIA	Estudiante Pre Grado	Farmacia y Bioquímica	Adherente
Colaborador Externo				
	CASTRO ALVARADO ÁNGEL PABLO	Externo		Adjunto Externo
	CHICO LEÓN HENRY GERMÁN	Externo		Adjunto Externo

ANEXO 2

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
RECTORADO

Lima, 04 de junio del 2018
Se ha expedido:

RESOLUCION RECTORAL Nº 03202-R-18

Lima, 04 de junio del 2018

Visto el expediente, con registro de Mesa de Partes General Nº 03933-SG-18 del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado, sobre aprobación de Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación (CONFIGI), ganadores del Concurso 2018.

CONSIDERANDO:

Que el artículo 17º del Estatuto de la Universidad establece que: "El Vicerrectorado de Investigación y Posgrado dirige las actividades de investigación y los estudios de posgrado de la universidad a través del Consejo Superior de Investigación y Posgrado y está a cargo del Vicerrectorado de Investigación y Posgrado; está encargado de normar, orientar coordinar, organizar e integrar los estudios de posgrado con las actividades de investigación que se desarrollan a través de las unidades de investigación, institutos y centros de investigación de la universidad. Incentiva la investigación formativa del pregrado y la que corresponde a los programas de posgrado";

Que con Resolución Rectoral Nº 00897-R-17 del 21 de febrero del 2017, se aprobó el documento "Lineamientos de Política de Grupos de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos" que tiene por objetivo establecer, regular y orientar el proceso de creación, funcionamiento, desarrollo y disolución de los grupos de investigación de la Universidad;

Que mediante Resolución Rectoral Nº 00896-R-17 del 21 de febrero de 2017, se aprobó el documento "Política de Financiamiento de la Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos";

Que con Oficio Nº 176-VRIP-2018, el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado remite para su aprobación los Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación (CONFIGI), ganadores del Concurso 2018, realizado en el marco de lo aprobado mediante Resoluciones Rectorales N.ºs 00896 y 00897-R-17;

Que la Oficina General de Planificación mediante Oficio Nº 01216-OGPL-2018 y la Dirección General de Administración con Proveído s/n de fecha 17 de mayo de 2018, emiten opinión favorable;

Que cuenta con los Proveídos s/n de fechas 07 y 23 de mayo de 2018, del Despacho Rectoral; y,

Estando dentro de las atribuciones conferidas al señor Rector por la Ley Universitaria Nº 30220 y el Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos;

SE RESUELVE:

1º *Aprobar* ***los Proyectos de Investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación (CONFIGI), ganadores del Concurso 2018****, realizado en el marco de lo aprobado mediante las Resoluciones Rectorales N.ºs 00896 y 00897-R-17, según anexo que en fojas ciento trece (113) forma parte de la presente resolución:*

Área		*Facultad del GI*	*Nº de Proyectos*
Ciencias de la Salud	*1*	*Medicina*	*38*
	2	*Farmacia y Bioquímica*	*15*
	3	*Medicina Veterinaria*	*28*
	4	*Odontología*	*04*
	5	*Psicología*	*12*
Ciencias Básicas	*6*	*Ciencias Físicas*	*13*
	7	*Ciencias Biológicas*	*35*
	8	*Ciencias Matemáticas*	*08*
Ingenierías	*9*	*Ing. Geológica, Minera, Metalúrgica y Geográfica*	*03*
	10	*Ingeniería Industrial*	*01*
	11	*Ingeniería de Sistemas e Informática*	*02*
	12	*Ingeniería Electrónica y Eléctrica*	*02*
	13	*Química e Ingeniería Química*	*13*
Ciencias Económicas y de la Gestión	*14*	*Ciencias Administrativas*	*01*
	15	*Ciencias Contables*	*01*
	16	*Ciencias Económicas*	*03*
Humanidades y Ciencias Jurídicas y Sociales	*17*	*Ciencias Sociales*	*15*
	18	*Derecho y Ciencia Política*	*01*
	19	*Letras y Ciencias Humanas*	*22*
	20	*Educación*	*03*
		TOTAL	***220***

2º *Encargar a la Dirección General de Administración, Vicerrectorado de Investigación y Posgrado y a las Facultades respectivas, el cumplimiento de la presente resolución rectoral.*

Regístrese, comuníquese, publíquese y archívese (fdo) Orestes Cachay Boza, Rector (fdo) Martha Carolina Linares Barrantes, Secretaria General. Lo que transcribo a usted para conocimiento y demás fines.

Atentamente,

ALBERTO RONALD CÁCERES TAPIA
Jefe de la Secretaría Administrativa

cvr

ANEXO 3

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA Nº297-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

*La muestra vegetal (planta completa) recibida de **César Máximo FUERTES RUITON,** de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, ha sido estudiada y clasificada como: **Minthostachys mollis,** (Kunth) Griseb. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).*

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: Minthostachys

***ESPECIE**: **Minthostachys mollis** (Kunth) Griseb.*

Nombre vulgar : "muña"
Determinado por: Mg. Asunción Cano Echevarría y Biólogo José Campos

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 23 de agosto de 2018

MUSEO DE HISTORIA NATURAL — Herbario San Marcos - USM — JEFE

Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

ANEXO 4

UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN PRODUCTOS NATURALES

Informe de resultados

Solicitante:	Sr. Heden Vega, UNMSM
Muestra:	1 Aceite esencial de muña y 1 aceite esencial de Corpunya.
Análisis:	Composición química de 2 aceites esenciales por Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
Fecha de entrega de Resultados:	27 agosto 2018

RESULTADOS

En las páginas 2 a 6 del presente informe.

Atentamente,

Dra. Rosario Rojas Durán

Unidad de Investigación en Productos Naturales
LID-Laboratorio 209
e-mail: rosario.rojas@upch.pe
página web: www.uipn-upch.pe
Teléfono: 51-1-3190000 Anexo 233227

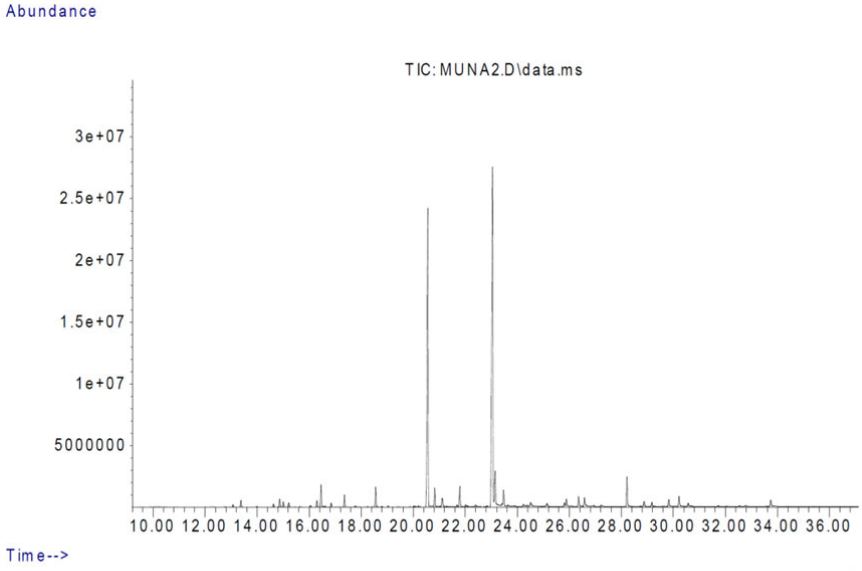
ACEITE ESENCIAL DE MUÑA

Se identificaron 22 compuestos que comprenden el 100% de la composición total del aceite esencial.

Número	**Nombre del compuesto** (NIST08.L)	t_R (min)	**% en la muestra** (áreas relativas)
1	α-Pineno	13.38	0.56
2	Sabineno	14.63	0.25
3	β-Pineno	14.87	0.73
4	β-Mirceno	15.01	0.42
5	3-Octanol	15.22	0.35
6	*p*-Cimeno	16.30	0.54
7	D-Limoneno	16.46	1.92
8	*cis*-Ocimeno	16.85	0.33
9	γ-Terpineno	17.36	1.04
10	β-Linalool	18.55	1.66
11	Mentona	20.56	32.72
12	Isopulegona	21.11	1.09
13	*trans*-Dihidrocarvona	21.79	1.85
14	Pulegona	23.05	40.94
15	D-Carvona	23.15	3.67
16	Piperitona	23.47	1.42
17	Isotimol	24.51	0.53
18	Metileugenol	25.14	0.39
19	Acetato de Timol	25.81	0.32

20	Eucarvona	25.88	0.74
21	Carvacrol	26.35	0.99
22	Acetato de Geraniol	26.58	0.97
23	β-Cariofileno	28.22	2.77
24	Metilisoeugenol	28.87	0.55
25	α-Cariofileno	29.17	0.40
26	Germacreno D	29.82	0.71
27	Biciclogermacreno	30.22	1.07
28	Elemicino	30.57	0.34
29	Isoelemicino	33.74	0.73

Cromatograma GC-MS del aceite esencial de Muña



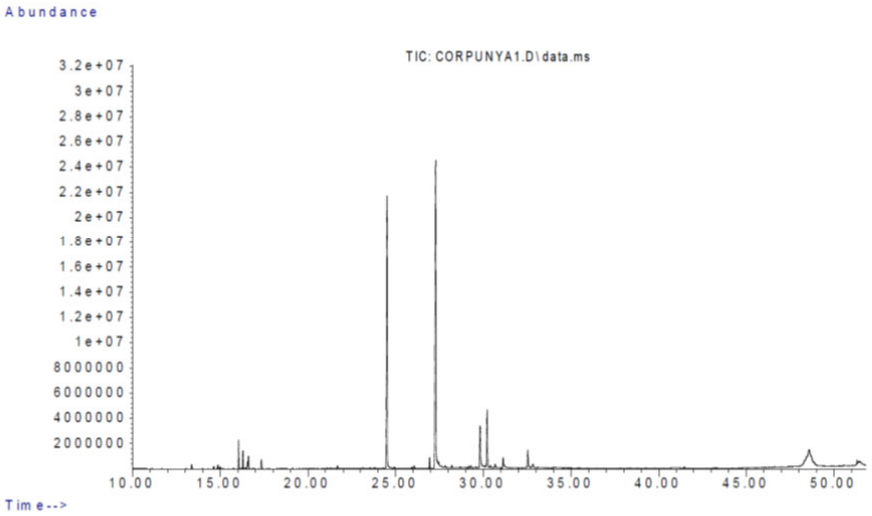
ACEITE ESENCIAL DE CORPUNYA

Se identificaron 24 compuestos que comprenden el 100% de la composición total del aceite esencial.

Número	**Nombre del compuesto** (NIST08.L)	t_R (min)	**% en la muestra** (áreas relativas)
1	α-Pineno	13.38	0.34
2	Sabineno	14.63	0.18
3	β-Pineno	14.87	0.31
4	β-Mirceno	15.00	0.17
5	4-Careno	16.05	2.47
6	*o*-Cimeno	16.30	1.54
7	β-Felandreno	16.55	0.60
8	Eucaliptol	16.61	1.11
9	γ-Terpineno	17.35	0.79
10	Terpineol	21.68	0.29
11	Safrol	24.51	31.24
12	α-Cubebeno	26.06	0.28
13	Copaeno	26.94	0.96
14	Metileugenol	27.28	40.49
15	β-Cariofileno	28.21	0.23
16	L-alloaromadendreno	29.30	0.22
17	Isohomogenol	29.81	7.50
18	Germacreno B	30.22	6.23

19	δ-Cadineno	30.68	0.50
20	Elemicino	31.13	1.60
21	Spathulenol	32.54	2.35
22	Globulol	32.83	0.60

Cromatograma GC-MS del aceite esencial de Corpunya



Condiciones cromatográficas para los 2 aceites esenciales:

Equipo: Cromátografo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C.

Columna: J&W 122-1545.67659 DB-5ms, 325 °C: 60 m x 250 µm x 0.25 µm

Rampa de temperatura: Empieza en 40 °C y sube a 5 °C/min hasta 180 °C; 2.5 °C/min hasta 200 °C por 5 min y finalmente 10 °C/min hasta 300 °C manteniéndose por 3 minutos.

Tiempo de corrida: 54 min

Volumen de Inyección: 1 µL

Split: 100:1

Gas portador: He, 1 mL/min

Muestra: Se diluyó 20 µL de muestra en 1 mL de diclorometano

ANEXO 5

```
EXAMINE VARIABLES=AA BY FILM
  /PLOT BOXPLOT
  /COMPARE GROUPS
  /STATISTICS DESCRIPTIVES
  /CINTERVAL 95
  /MISSING LISTWISE
  /NOTOTAL.
```

Explorar

FILM

Resumen de procesamiento de casos

		Casos					
		Válido		Perdidos		Total	
	FILM	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
%AA	FILM B1	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	FILM B2	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	FILM B3	3	100,0%	0	0,0%	3	100,0%
	FILM F1	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
	FILM F2	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
	FILM F3	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
	FILM F4	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
	FILM F5	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
	FILM F6	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
	FILM F7	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
	FILM F8	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%
	FILM F9	9	100,0%	0	0,0%	9	100,0%

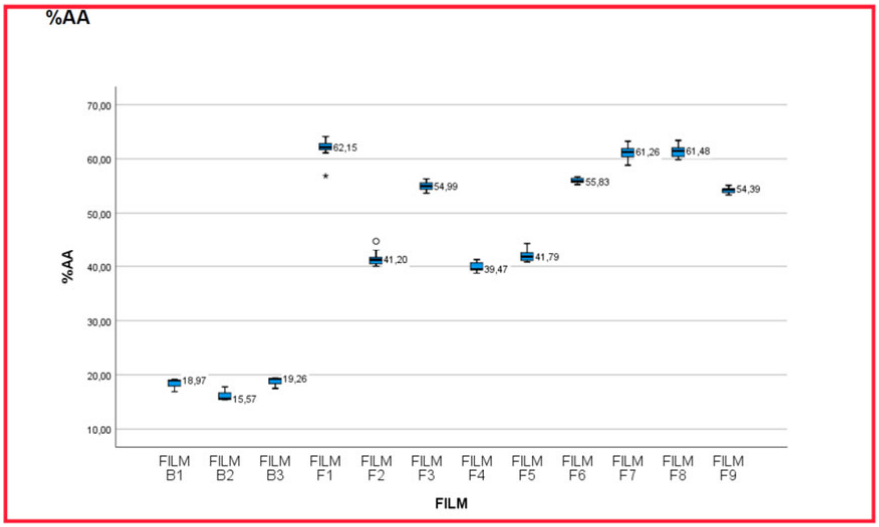
Descriptivos

	FILM			Estadístico	Error estándar
%AA	FILM B1	Media		18,327183271832713	,714678427863905
		95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	15,252170183291025	
		la media	Límite superior	21,402196360374400	
		Media recortada al 5%		.	
		Mediana		18,966789667896666	
		Varianza		1,532	
		Desviación estándar		1,237859348133733	
		Mínimo		16,900369003690040	
		Máximo		19,114391143911437	
		Rango		2,214022140221395	
		Rango intercuartil		.	
		Asimetría		-1,704	1,225
		Curtosis		.	.
	FILM B2	Media		16,260762607626077	,763797033026319
		95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	12,974409218500842	
		la media	Límite superior	19,547115996751312	
		Media recortada al 5%		.	
		Mediana		15,571955719557206	
		Varianza		1,750	
		Desviación estándar		1,322935267871949	
		Mínimo		15,424354243542439	
		Máximo		17,785977859778590	
		Rango		2,361623616236154	
		Rango intercuartil		.	
		Asimetría		1,708	1,225
		Curtosis		.	.
	FILM B3	Media		18,720787207872075	,616480397842148
		95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	16,068286141259520	

	la media	Límite superior	21,373288274484630	
	Media recortada al 5%		.	
	Mediana		19,261992619926193	
	Varianza		1,140	
	Desviación estándar		1,067775370932875	
	Mínimo		17,490774907749074	
	Máximo		19,409594095940953	
	Rango		1,918819188191879	
	Rango intercuartil		.	
	Asimetría		-1,695	1,225
	Curtosis		.	.
FILM F1	Media		61,885614113641495	,704507426600278
	95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	60,261017074622750	
	la media	Límite superior	63,510211152660240	
	Media recortada al 5%		62,041486074975880	
	Mediana		62,150220913107510	
	Varianza		4,467	
	Desviación estándar		2,113522279800834	
	Mínimo		56,848306332842420	
	Máximo		64,117226590421720	
	Rango		7,268920257579310	
	Rango intercuartil		1,897315671513731	
	Asimetría		-1,864	,717
	Curtosis		4,590	1,400
FILM F2	Media		41,511834897663480	,510232168987359
	95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	40,335237406067000	
	la media	Límite superior	42,688432389259950	
	Media recortada al 5%		41,410535860680746	
	Mediana		41,202346041055710	
	Varianza		2,343	
	Desviación estándar		1,530696506962077	
	Mínimo		40,029325513196490	
	Máximo		44,817726947819870	
	Rango		4,788401434623381	
	Rango intercuartil		1,903014092596507	
	Asimetría		1,523	,717
	Curtosis		1,945	1,400
FILM F3	Media		55,001629195177586	,282302434851149
	95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	54,350638613034050	
	la media	Límite superior	55,652619777321120	
	Media recortada al 5%		55,003439412041566	
	Mediana		54,985337243401766	
	Varianza		,717	
	Desviación estándar		,846907304553448	
	Mínimo		53,665689149560110	
	Máximo		56,304985337243410	
	Rango		2,639296187683293	
	Rango intercuartil		1,466275659824056	
	Asimetría		-,073	,717
	Curtosis		-,661	1,400
FILM F4	Media		39,927998690885290	,301069702061431
	95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	39,233730712948460	
	la media	Límite superior	40,622266668822120	
	Media recortada al 5%		39,921634938817070	
	Mediana		39,469808541973500	

	Varianza		,816	
	Desviación estándar		,903209106184292	
	Mínimo		38,733431516936680	
	Máximo		41,237113402061850	
	Rango		2,503681885125175	
	Rango intercuartil		1,620029455080996	
	Asimetría		,550	,717
	Curtosis		-1,136	1,400
FILM F5	Media		42,044939235328680	,429055871311947
	95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	41,055534621851860	
	la media	Límite superior	43,034343848805506	
	Media recortada al 5%		41,983059320327880	
	Mediana		41,788856304985330	
	Varianza		1,657	
	Desviación estándar		1,287167613935840	
	Mínimo		40,814867762687630	
	Máximo		44,388849177984270	
	Rango		3,573981415296636	
	Rango intercuartil		2,091250767724752	
	Asimetría		1,056	,717
	Curtosis		-,186	1,400
FILM F6	Media		56,000317687236915	,155836842747586
	95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	55,640957283444600	
	la media	Límite superior	56,359678091029230	
	Media recortada al 5%		56,003847545424875	
	Mediana		55,825589706933520	
	Varianza		,219	
	Desviación estándar		,467510528242759	
	Mínimo		55,253752680486066	
	Máximo		56,683345246604720	
	Rango		1,429592566118657	
	Rango intercuartil		,786275911365259	
	Asimetría		,077	,717
	Curtosis		-,867	1,400
FILM F7	Media		61,031475361215370	,513876560332466
	95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	59,846473888106790	
	la media	Límite superior	62,216476834323950	
	Media recortada al 5%		61,030127893209690	
	Mediana		61,258041458184410	
	Varianza		2,377	
	Desviación estándar		1,541629680997398	
	Mínimo		58,827734095782700	
	Máximo		63,259471050750534	
	Rango		4,431736954967832	
	Rango intercuartil		2,673812871080820	
	Asimetría		-,243	,717
	Curtosis		-,793	1,400
FILM F8	Media		61,394013940139400	,391376779459836
	95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	60,491497468284095	
	la media	Límite superior	62,296530411994710	
	Media recortada al 5%		61,368502573914640	
	Mediana		61,476014760147600	
	Varianza		1,379	
	Desviación estándar		1,174130338379509	
	Mínimo		59,852398523985230	

		Máximo		63,394833948339490	
		Rango		3,542435424354260	
		Rango intercuartil		1,992619926199261	
		Asimetría		,207	,717
		Curtosis		-,704	1,400
	FILM F9	Media		54,210742107421070	,182071367865310
		95% de intervalo de confianza para	Límite inferior	53,790884780222300	
		la media	Límite superior	54,630599434619840	
		Media recortada al 5%		54,207097626531830	
		Mediana		54,391143911439110	
		Varianza		,298	
		Desviación estándar		,546214103595929	
		Mínimo		53,357933579335790	
		Máximo		55,129151291512926	
		Rango		1,771217712177133	
		Rango intercuartil		,811808118081174	
		Asimetría		,035	,717
		Curtosis		-,299	1,400




```
UNIANOVA AA BY FILM
  /METHOD=SSTYPE(3)
  /INTERCEPT=INCLUDE
  /POSTHOC=FILM(TUKEY)
  /PLOT=PROFILE(FILM) TYPE=LINE ERRORBAR=NO MEANREFERENCE=NO YAXIS=AUTO
  /EMMEANS=TABLES(FILM)
  /PRINT ETASQ DESCRIPTIVE HOMOGENEITY
  /CRITERIA=ALPHA(.05)
  /DESIGN=FILM.
```

Análisis univariado de varianza

Factores inter-sujetos

		N
FILM	FILM B1	3
	FILM B2	3
	FILM B3	3
	FILM F1	9
	FILM F2	9

	FILM F3	9
	FILM F4	9
	FILM F5	9
	FILM F6	9
	FILM F7	9
	FILM F8	9
	FILM F9	9

Estadísticos descriptivos

Variable dependiente: %AA

FILM	Media	Desv. Desviación	N
FILM B1	18,327183271832716	1,237859348133732	3
FILM B2	16,260762607626077	1,322935267871948	3
FILM B3	18,720787207872075	1,067775370932876	3
FILM F1	61,885614113641495	2,113522279800833	9
FILM F2	41,511834897663480	1,530696506962076	9
FILM F3	55,001629195177586	,846907304553450	9
FILM F4	39,927998690885296	,903209106184293	9
FILM F5	42,044939235328690	1,287167613935841	9
FILM F6	56,000317687236915	,467510528242760	9
FILM F7	61,031475361215370	1,541629680997397	9
FILM F8	61,394013940139395	1,174130338379506	9
FILM F9	54,210742107421070	,546214103595929	9
Total	49,077814292448630	13,315941388230941	90

Prueba de igualdad de Levene de varianzas de error[a,b]

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
%AA	Se basa en la media	1,308	11	78	,236
	Se basa en la mediana	,817	11	78	,623
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	,817	11	41,370	,623
	Se basa en la media recortada	1,143	11	78	,341

Prueba la hipótesis nula de que la varianza de error de la variable dependiente es igual entre grupos.

a. Variable dependiente: %AA

b. Diseño : Intersección + FILM

Pruebas de efectos inter-sujetos

Variable dependiente: %AA

Origen	Tipo III de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.	Eta parcial al cuadrado
Modelo corregido	15657,951[a]	11	1423,450	902,522	,000	,992
Intersección	138504,949	1	138504,949	87817,460	,000	,999
FILM	15657,951	11	1423,450	902,522	,000	,992
Error	123,021	78	1,577			
Total	232557,839	90				
Total corregido	15780,972	89				

a. R al cuadrado = .992 (R al cuadrado ajustada = .991)

Medias marginales estimadas

FILM

Variable dependiente: %AA

FILM	Media	Desv. Error	Intervalo de confianza al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
FILM B1	18,327	,725	16,884	19,771
FILM B2	16,261	,725	14,817	17,704
FILM B3	18,721	,725	17,277	20,164
FILM F1	61,886	,419	61,052	62,719
FILM F2	41,512	,419	40,678	42,345
FILM F3	55,002	,419	54,168	55,835
FILM F4	39,928	,419	39,095	40,761
FILM F5	42,045	,419	41,212	42,878
FILM F6	56,000	,419	55,167	56,834
FILM F7	61,031	,419	60,198	61,865
FILM F8	61,394	,419	60,561	62,227
FILM F9	54,211	,419	53,377	55,044

Pruebas post hoc

FILM

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: %AA

HSD Tukey

(I) FILM	(J) FILM	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
FILM B1	FILM B2	2,066420664206639	1,025407714974144	,682	-1,388468798123886	5,521310126537164
	FILM B3	-,393603936039359	1,025407714974144	1,000	-3,848493398369883	3,061285526291167
	FILM F1	-43,558430841808780*	,837241893333301	,000	-46,379336275284885	-40,737525408332670
	FILM F2	-23,184651625830767*	,837241893333301	,000	-26,005557059306874	-20,363746192354665
	FILM F3	-36,674445923344870*	,837241893333301	,000	-39,495351356820976	-33,853540489868760
	FILM F4	-21,600815419052580*	,837241893333301	,000	-24,421720852528683	-18,779909985576477
	FILM F5	-23,717755963495975*	,837241893333301	,000	-26,538661396972078	-20,896850530019872
	FILM F6	-37,673134415404190*	,837241893333301	,000	-40,494039848880300	-34,852228981928086
	FILM F7	-42,704292089382655*	,837241893333301	,000	-45,525197522858760	-39,883386655906556
	FILM F8	-43,066830668306680*	,837241893333301	,000	-45,887736101782785	-40,245925234830570
	FILM F9	-35,883558835588350*	,837241893333301	,000	-38,704464269064460	-33,062653402112250
FILM B2	FILM B1	-2,066420664206639	1,025407714974144	,682	-5,521310126537164	1,388468798123886
	FILM B3	-2,460024600245997	1,025407714974144	,419	-5,914914062576523	,994864862084528
	FILM F1	-45,624851506015420*	,837241893333301	,000	-48,445756939491520	-42,803946072539310
	FILM F2	-25,251072290037406*	,837241893333301	,000	-28,071977723513510	-22,430166856561303
	FILM F3	-38,740866587551515*	,837241893333301	,000	-41,561772021027615	-35,919961154075400

	FILM F4	-23,66723608325922 0*	,837241893333301	,000	-26,48814151673532 0	-20,84633064978311 6
	FILM F5	-25,78417662770261 0*	,837241893333301	,000	-28,60508206117871 7	-22,96327119422651 0
	FILM F6	-39,73955507961083 0*	,837241893333301	,000	-42,56046051308694 0	-36,91864964613472 5
	FILM F7	-44,77071275358929 4*	,837241893333301	,000	-47,59161818706540 0	-41,94980732011319 0
	FILM F8	-45,13325133251332 0*	,837241893333301	,000	-47,95415676598942 4	-42,31234589903721 0
	FILM F9	-37,94997949979499 0*	,837241893333301	,000	-40,77088493327110 0	-35,12907406631888 6
FILM B3	FILM B1	,393603936039359	1,025407714974144	1,000	-3,061285526291166	3,848493398369884
	FILM B2	2,460024600245998	1,025407714974144	,419	-,994864862084527	5,914914062576523
	FILM F1	-43,16482690576942 0*	,837241893333301	,000	-45,98573233924552 0	-40,34392147229331 0
	FILM F2	-22,79104768979141 0*	,837241893333301	,000	-25,61195312326751 0	-19,97014225631530 2
	FILM F3	-36,28084198730551 0*	,837241893333301	,000	-39,10174742078161 4	-33,45993655382940 0
	FILM F4	-21,20721148301322 0*	,837241893333301	,000	-24,02811691648932 4	-18,38630604953712 0
	FILM F5	-23,32415202745661 6*	,837241893333301	,000	-26,14505746093272 0	-20,50324659398051 4
	FILM F6	-37,27953047936484 0*	,837241893333301	,000	-40,10043591284094 0	-34,45862504588873 0
	FILM F7	-42,31068815334329 0*	,837241893333301	,000	-45,13159358681940 0	-39,48978271986718 6
	FILM F8	-42,67322673226732 0*	,837241893333301	,000	-45,49413216574343 0	-39,85232129879122 0
	FILM F9	-35,48995489954899 0*	,837241893333301	,000	-38,31086033302510 0	-32,66904946607288 5
FILM F1	FILM B1	43,55843084180878 0*	,837241893333301	,000	40,73752540833267 0	46,37933627528488 5
	FILM B2	45,62485150601542 0*	,837241893333301	,000	42,80394607253931 0	48,44575693949152 0
	FILM B3	43,16482690576942 0*	,837241893333301	,000	40,34392147229331 0	45,98573233924552 0
	FILM F2	20,37377921597801 0*	,592019420269441	,000	18,37909785488108 0	22,36846057707494 0
	FILM F3	6,883984918463909*	,592019420269441	,000	4,889303557366979	8,878666279560840
	FILM F4	21,95761542275620 0*	,592019420269441	,000	19,96293406165927 0	23,95229678385313 0
	FILM F5	19,84067487831280 4*	,592019420269441	,000	17,84599351721587 4	21,83535623940973 0
	FILM F6	5,885296426404587*	,592019420269441	,000	3,890615065307657	7,879977787501517
	FILM F7	,854138752426124	,592019420269441	,951	-1,140542608670806	2,848820113523054
	FILM F8	,491600173502100	,592019420269441	1,000	-1,503081187594830	2,486281534599030
	FILM F9	7,674872006220426*	,592019420269441	,000	5,680190645123496	9,669553367317356
FILM F2	FILM B1	23,18465162583076 7*	,837241893333301	,000	20,36374619235466 5	26,00555705930687 4
	FILM B2	25,25107229003740 6*	,837241893333301	,000	22,43016685656130 3	28,07197772351351 0
	FILM B3	22,79104768979141 0*	,837241893333301	,000	19,97014225631530 2	25,61195312326751 0
	FILM F1	-20,37377921597801 0*	,592019420269441	,000	-22,36846057707494 0	-18,37909785488108 0

	FILM F3	-13,48979429751410 2*	,592019420269441	,000	-15,48447565861103 2	-11,49511293641717 2
	FILM F4	1,583836206778187	,592019420269441	,258	-,410845154318743	3,578517567875118
	FILM F5	-,533104337665208	,592019420269441	,999	-2,527785698762137	1,461577023431723
	FILM F6	-14,48848278957342 5*	,592019420269441	,000	-16,48316415067035 5	-12,49380142847649 5
	FILM F7	-19,51964046355188 7*	,592019420269441	,000	-21,51432182464881 7	-17,52495910245495 7
	FILM F8	-19,88217904247591 0*	,592019420269441	,000	-21,87686040357284 0	-17,88749768137898 0
	FILM F9	-12,69890720975758 6*	,592019420269441	,000	-14,69358857085451 6	-10,70422584866065 6
FILM F3	FILM B1	36,67444592334487 0*	,837241893333301	,000	33,85354048986876 0	39,49535135682097 6
	FILM B2	38,74086658755151 5*	,837241893333301	,000	35,91996115407540 0	41,56177202102761 5
	FILM B3	36,28084198730551 0*	,837241893333301	,000	33,45993655382940 0	39,10174742078161 4
	FILM F1	-6,883984918463909 *	,592019420269441	,000	-8,878666279560840	-4,889303557366979
	FILM F2	13,48979429751410 2*	,592019420269441	,000	11,49511293641717 2	15,48447565861103 2
	FILM F4	15,07363050429229 0*	,592019420269441	,000	13,07894914319536 0	17,06831186538922 0
	FILM F5	12,95668995984889 4*	,592019420269441	,000	10,96200859875196 4	14,95137132094582 5
	FILM F6	-,998688492059323	,592019420269441	,869	-2,993369853156252	,995992869037607
	FILM F7	-6,029846166037785 *	,592019420269441	,000	-8,024527527134715	-4,035164804940855
	FILM F8	-6,392384744961809 *	,592019420269441	,000	-8,387066106058740	-4,397703383864879
	FILM F9	,790887087756516	,592019420269441	,972	-1,203794273340414	2,785568448853447
FILM F4	FILM B1	21,60081541905258 0*	,837241893333301	,000	18,77990998557647 7	24,42172085252868 3
	FILM B2	23,66723608325922 0*	,837241893333301	,000	20,84633064978311 6	26,48814151673532 0
	FILM B3	21,20721148301322 0*	,837241893333301	,000	18,38630604953712 0	24,02811691648932 4
	FILM F1	-21,95761542275620 0*	,592019420269441	,000	-23,95229678385313 0	-19,96293406165927 0
	FILM F2	-1,583836206778187	,592019420269441	,258	-3,578517567875117	,410845154318743
	FILM F3	-15,07363050429229 0*	,592019420269441	,000	-17,06831186538922 0	-13,07894914319536 0
	FILM F5	-2,116940544443395 *	,592019420269441	,028	-4,111621905540325	-,122259183346465
	FILM F6	-16,07231899635161 2*	,592019420269441	,000	-18,06700035744854 6	-14,07763763525468 2
	FILM F7	-21,10347667033007 5*	,592019420269441	,000	-23,09815803142700 5	-19,10879530923314 5
	FILM F8	-21,46601524925410 0*	,592019420269441	,000	-23,46069661035103 0	-19,47133388815717 0
	FILM F9	-14,28274341653577 1*	,592019420269441	,000	-16,27742477763270 3	-12,28806205543884 1
FILM F5	FILM B1	23,71775596349597 5*	,837241893333301	,000	20,89685053001987 2	26,53866139697207 8
	FILM B2	25,78417662770261 0*	,837241893333301	,000	22,96327119422651 0	28,60508206117871 7

	FILM B3	23,32415202745661 6*	,837241893333301	,000	20,50324659398051 4	26,14505746093272 0
	FILM F1	-19,84067487831280 4*	,592019420269441	,000	-21,83535623940973 0	-17,84599351721587 4
	FILM F2	,533104337665208	,592019420269441	,999	-1,461577023431722	2,527785698762138
	FILM F3	-12,95668995984889 4*	,592019420269441	,000	-14,95137132094582 5	-10,96200859875196 4
	FILM F4	2,116940544443395*	,592019420269441	,028	,122259183346465	4,111621905540325
	FILM F6	-13,95537845190821 7*	,592019420269441	,000	-15,95005981300514 7	-11,96069709081128 9
	FILM F7	-18,98653612588668 0*	,592019420269441	,000	-20,98121748698360 6	-16,99185476478975 0
	FILM F8	-19,34907470481070 4*	,592019420269441	,000	-21,34375606590763 0	-17,35439334371377 4
	FILM F9	-12,16580287209237 8*	,592019420269441	,000	-14,16048423318930 8	-10,17112151099544 8
FILM F6	FILM B1	37,67313441540419 0*	,837241893333301	,000	34,85222898192808 6	40,49403984888030 0
	FILM B2	39,73955507961083 0*	,837241893333301	,000	36,91864964613472 5	42,56046051308694 0
	FILM B3	37,27953047936484 0*	,837241893333301	,000	34,45862504588873 0	40,10043591284094 0
	FILM F1	-5,885296426404587 *	,592019420269441	,000	-7,879977787501517	-3,890615065307656
	FILM F2	14,48848278957342 5*	,592019420269441	,000	12,49380142847649 5	16,48316415067035 5
	FILM F3	,998688492059323	,592019420269441	,869	-,995992869037607	2,993369853156253
	FILM F4	16,07231899635161 2*	,592019420269441	,000	14,07763763525468 2	18,06700035744854 6
	FILM F5	13,95537845190821 7*	,592019420269441	,000	11,96069709081128 9	15,95005981300514 7
	FILM F7	-5,031157673978463 *	,592019420269441	,000	-7,025839035075393	-3,036476312881532
	FILM F8	-5,393696252902487 *	,592019420269441	,000	-7,388377613999417	-3,399014891805556
	FILM F9	1,789575579815839	,592019420269441	,122	-,205105781281091	3,784256940912769
FILM F7	FILM B1	42,70429208938265 5*	,837241893333301	,000	39,88338665590655 6	45,52519752285876 0
	FILM B2	44,77071275358929 4*	,837241893333301	,000	41,94980732011319 0	47,59161818706540 0
	FILM B3	42,31068815334329 0*	,837241893333301	,000	39,48978271986718 6	45,13159358681940 0
	FILM F1	-,854138752426124	,592019420269441	,951	-2,848820113523054	1,140542608670806
	FILM F2	19,51964046355188 7*	,592019420269441	,000	17,52495910245495 7	21,51432182464881 7
	FILM F3	6,029846166037785*	,592019420269441	,000	4,035164804940856	8,024527527134715
	FILM F4	21,10347667033007 5*	,592019420269441	,000	19,10879530923314 5	23,09815803142700 5
	FILM F5	18,98653612588668 0*	,592019420269441	,000	16,99185476478975 0	20,98121748698360 6
	FILM F6	5,031157673978463*	,592019420269441	,000	3,036476312881533	7,025839035075393
	FILM F8	-,362538578924024	,592019420269441	1,000	-2,357219940020954	1,632142782172906
	FILM F9	6,820733253794302*	,592019420269441	,000	4,826051892697372	8,815414614891232
FILM F8	FILM B1	43,06683066830668 0*	,837241893333301	,000	40,24592523483057 0	45,88773610178278 5
	FILM B2	45,13325133251332 0*	,837241893333301	,000	42,31234589903721 0	47,95415676598942 4

	FILM B3	42,67322673226732 0*	,837241893333301	,000	39,85232129879122 0	45,49413216574343 0
	FILM F1	-,491600173502100	,592019420269441	1,000	-2,486281534599030	1,503081187594830
	FILM F2	19,88217904247591 0*	,592019420269441	,000	17,88749768137898 0	21,87686040357284 0
	FILM F3	6,392384744961809*	,592019420269441	,000	4,397703383864880	8,387066106058740
	FILM F4	21,46601524925410 0*	,592019420269441	,000	19,47133388815717 0	23,46069661035103 0
	FILM F5	19,34907470481070 4*	,592019420269441	,000	17,35439334371377 4	21,34375606590763 0
	FILM F6	5,393696252902487*	,592019420269441	,000	3,399014891805557	7,388377613999417
	FILM F7	,362538578924024	,592019420269441	1,000	-1,632142782172906	2,357219940020954
	FILM F9	7,183271832718326*	,592019420269441	,000	5,188590471621396	9,177953193815256
FILM F9	FILM B1	35,88355883558835 0*	,837241893333301	,000	33,06265340211225 0	38,70446426906446 0
	FILM B2	37,94997949979499 0*	,837241893333301	,000	35,12907406631888 6	40,77088493327110 0
	FILM B3	35,48995489954899 0*	,837241893333301	,000	32,66904946607288 5	38,31086033302510 0
	FILM F1	-7,674872006220426 *	,592019420269441	,000	-9,669553367317356	-5,680190645123496
	FILM F2	12,69890720975758 6*	,592019420269441	,000	10,70422584866065 6	14,69358857085451 6
	FILM F3	-,790887087756516	,592019420269441	,972	-2,785568448853446	1,203794273340414
	FILM F4	14,28274341653577 1*	,592019420269441	,000	12,28806205543884 1	16,27742477763270 3
	FILM F5	12,16580287209237 8*	,592019420269441	,000	10,17112151099544 8	14,16048423318930 8
	FILM F6	-1,789575579815839	,592019420269441	,122	-3,784256940912769	,205105781281091
	FILM F7	-6,820733253794302 *	,592019420269441	,000	-8,815414614891232	-4,826051892697372
	FILM F8	-7,183271832718326 *	,592019420269441	,000	-9,177953193815256	-5,188590471621396

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 1.577.

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel .05.

Subconjuntos homogéneos

%AA

HSD Tukey[a,b,c]

FILM	N	Subconjunto 1	2	3	4	5
FILM B2	3	16,26076260762607 7				
FILM B1	3	18,32718327183271 6	18,32718327183271 6			
FILM B3	3		18,72078720787207 5			
FILM F4	9			39,92799869088529 6		
FILM F2	9			41,51183489766348 0		
FILM F5	9			42,04493923532869 0		
FILM F9	9				54,21074210742107 0	

FILM F3	9				55,00162919517758 6	
FILM F6	9				56,00031768723691 5	
FILM F7	9					61,03147536121537 0
FILM F8	9					61,39401394013939 5
FILM F1	9					61,88561411364149 5
Sig.		,180	1,000	,154	,375	,989

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Se basa en las medias observadas.

El término de error es la media cuadrática(Error) = 1.577.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6.000.

b. Los tamaños de grupo no son iguales. Se utiliza la media armónica de los tamaños de grupo. Los niveles de error de tipo I no están garantizados.

c. Alfa = .05.