

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

**ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS**



**“NANOENCAPSULACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE CHINCHO
(*Tagetes elliptica* Sm.) EN LA ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA DE LA
CARNE DE ALPACA MARINADA”**

Presentada por:

FRANCIS GLADYS CERRÓN MERCADO

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIA DE ALIMENTOS**

Lima - Perú

2024

Tesis PhD

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

7%

PUBLICACIONES

2%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | hdl.handle.net Fuente de Internet | 7% |
| 2 | repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet | 3% |
| 3 | dspace.umh.es Fuente de Internet | 1% |
| 4 | repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet | <1% |
| 5 | Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante | <1% |
| 6 | ri.ues.edu.sv Fuente de Internet | <1% |
| 7 | es.scribd.com Fuente de Internet | <1% |
| 8 | pubmed.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet | <1% |

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIA DE ALIMENTOS

**“NANOENCAPSULACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE
CHINCHO (*Tagetes elliptica* Sm.) EN LA ESTABILIDAD
FISICOQUÍMICA DE LA CARNE DE ALPACA
MARINADA”**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR
DOCTORIS PHILOSOPHIAE**

Presentada por:

FRANCIS GLADYS CERRÓN MERCADO

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Dr. Christian Encina Zelada
PRESIDENTE

Dra. Bettit Salvá Ruiz
ASESORA

Dr. Luis Condezo Hoyos
MIEMBRO

Ph.D. Fernando Vargas Delgado
MIEMBRO

Dr. José Ángel Pérez Álvarez
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

Mi tesis se realizó en medio de la pandemia, que fue una gran barrera para nuestra investigación, pero nos ayudó a comprender cuán importante es nuestra carrera para el futuro de la humanidad.

*A mis queridos padres Ernesto y Gladis,
a mis hermanos José Luis y Galax y mis cuñadas Katy y Rosy.
A mi amado esposo Percy por su gran apoyo incondicional
y a mi amada hija Valery por su comprensión y su valentía.*

*La vida no es fácil para ninguno de nosotros.
Debemos tener perseverancia y,
sobre todo, confianza en nosotros mismos.
Debemos creer que estamos dotados para algo
y que esto debe ser alcanzado.*

(1867 – 1934)

Marie Curie

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas quienes me apoyaron para culminar mi Tesis Doctoral, en este largo camino lleno de retos y nuevos aprendizajes. Esta investigación es el resultado de un sueño y una meta que se cumplió gracias a mi motivación más grande que es mi familia y a las personas con las que he tenido el placer de conocerlas durante mi formación profesional.

A Dios por cuidarme, por guiar mi camino y darme siempre mucha fuerza y fortaleza.

A la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM) – Programa Doctoral de Ciencia de Alimentos - EPG-UNALM por la Beca de estudios financiada por el proyecto CONCYTEC Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCiencia.

Al convenio específico de Cooperación Interinstitucional Doble doctorado internacional entre la Universidad Nacional Agraria la Molina-UNALM y la Universidad Miguel Hernández de Elche-UMH-España. Por darme la oportunidad de obtener el doble doctorado de ambas universidades y cumplir una de mis metas propuestas como profesional.

Agradezco al Proyecto de Investigación Aplicada y Desarrollo Tecnológico 2018- 01 E041-2018-01-BM por el financiamiento de mi tesis y permitirme contribuir con el estudio del aceite esencial de la *Tagetes elliptica* Sm.

Mi eterno agradecimiento a mi asesora de tesis Dra. Bettit Salvá Ruíz por su apoyo incondicional en todo momento, por su confianza en darme la oportunidad de trabajar con su proyecto de investigación, por sus palabras de motivación, por sus enseñanzas, por sus experiencias compartidas y por ser gran ejemplo como mujer y profesional.

Mis más sinceros agradecimientos al Dr. José Ángel Pérez Álvarez por darme la oportunidad de trabajar con su grupo de investigación IPOA (Industrialización de Productos de Origen Animal), en la UMH, que fue la experiencia más gratificante de mi tesis doctoral, por todas sus enseñanzas que me han ayudado en mi formación y a ser una mejor profesional, por sus experiencias compartidas, anécdotas y sus sabios consejos.

Al Dr. Manuel Viuda por todas sus enseñanzas en el laboratorio, por todas sus ideas compartidas, por contribuir en la realización de mi investigación, por esa confianza y alegría durante mi estadía en el IPOA.

A Carmen Botella, por su cariño, por su ánimo, por sus enseñanzas compartidas, por todo su apoyo incondicional, por ser una persona de confianza quien me ayudo desde el primer momento en España.

A la Dra. Juana Fernández por todo su apoyo incondicional, por darme las herramientas para mi investigación en el IPOA, por ser ejemplo y una motivación para mí como persona.

A la Dra. Estrella por todo su apoyo y sus consejos durante mi estadía en España.

A la Dra. Clara Espinoza por todo su apoyo incondicional, por su confianza y la oportunidad brindada durante la realización de la segunda etapa de mi investigación en los laboratorios de la Universidad Nacional del Centro del Perú-UNCP.

A la Mg. Sc. Diana Nolazco y Mg. Lena Tellez por sus enseñanzas, consejos y ayuda para la realización de mi investigación.

A la Dra. Maria de los Ángeles Sánchez Contreras, investigadora del Centro de Investigación CIATEJ-México, por asesorarme en la metodología de mi investigación doctoral.

Agradezco a todo mis familiares suegros, cuñados, tíos, primos y sobrinos quienes me han apoyado siempre dando mucho cariño a mi hijita en los momentos en que no estaba a su lado.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1. PLANTAS AROMÁTICAS | 4 |
| 2.1.1. Género <i>Tagetes</i> | 4 |
| 2.1.1.1. <i>Tagetes elliptica</i> Sm..... | 5 |
| 2.1.2. Aceites esenciales provenientes de plantas aromáticas..... | 6 |
| 2.1.3. Composición química de aceites esenciales..... | 8 |
| 2.1.4. Propiedades antioxidantes de aceites esenciales | 10 |
| 2.1.5. Propiedades antimicrobianas de aceites esenciales..... | 12 |
| 2.2. ENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN ALIMENTOS..... | 14 |
| 2.2.1. Encapsulado de aceites esenciales..... | 14 |
| 2.2.2. Encapsulación por gelificación iónica..... | 15 |
| 2.2.3. Quitosano | 18 |
| 2.3. ACEITES ESENCIALES COMO ADITIVOS EN ENVASES ALIMENTARIOS ACTIVOS | 19 |
| 2.3.1. Incorporación de aceites esenciales en productos cárnicos..... | 20 |
| 2.3.2. Carne de alpaca (<i>Vicugna pacos</i>) | 21 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 25 |
| 3.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Tagetes elliptica</i> Sm (CHINCHO)... | 25 |
| 3.1.1. Lugar de estudio | 25 |
| 3.1.2. Materias primas, insumos y reactivos | 25 |
| 3.1.3. Capacidad antioxidante de <i>T. elliptica</i> Sm..... | 26 |
| 3.1.3.1. Actividad de barrido de radicales libres DPPH..... | 26 |
| 3.1.3.2. Ensayo de barrido de radicales 2, 2'-Azinobis (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS)..... | 27 |

| | |
|--|-----------|
| 3.1.3.3. Poder antioxidante reductor férrico (FRAP) | 28 |
| 3.1.3.4. Capacidad quelante de iones ferrosos (FIC) | 28 |
| 3.1.3.5. Ensayo Rancimat | 29 |
| 3.1.4. Identificación de los componentes del aceite por cromatografía de gases GC-MS | 29 |
| 3.1.5. Actividad antimicrobiana | 30 |
| 3.1.5.1. Método de difusión en pocillos de agar | 30 |
| 3.1.6. Esquema experimental | 30 |
| 3.1.7. Análisis estadístico | 30 |
| 3.2. OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CHINCHO POR DISEÑO BOX-BEHNKEN | 32 |
| 3.2.1. Lugar de estudio | 32 |
| 3.2.2. Materias primas, insumos y reactivos | 32 |
| 3.2.3. Diseño experimental usando Box-Benhken (DBB) | 32 |
| 3.2.4. Preparación de AEC-QSNP por gelificación iónica..... | 34 |
| 3.2.4.1. Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (CC)..... | 35 |
| 3.2.5. Caracterización de formulaciones optimizadas de QS-NP cargada con aceite esencial de Chincho (<i>Tagetes elliptica</i> Sm.) | 36 |
| 3.2.5.1. Tamaño de partícula, potencial Zeta e Índice de polidispersión..... | 36 |
| 3.2.5.2. Identificación de los componentes del nanoencapsulado del aceite esencial de chincho por cromatografía de gases (GC-MS)..... | 36 |
| 3.2.5.3. Morfología de partículas | 36 |
| 3.2.5.4. Análisis de Espectrofotometría Infrarroja Transformada de Fourier (FTIR-ATR) | 37 |
| 3.2.5.5. Estudio de liberación <i>in vitro</i> | 37 |
| 3.2.5.6. Actividad antimicrobiana | 37 |
| 3.2.6. Esquema experimental | 38 |

| | |
|--|----|
| 3.2.7. Análisis estadístico..... | 38 |
| 3.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA, FÍSICA Y FISICOQUÍMICA DEL MÚSCULO <i>SEMIMEMBRANOSUS</i> DE LA CARNE DE ALPACA (<i>Vicugna pacos</i>)..... | 40 |
| 3.3.1. Composición proximal | 40 |
| 3.3.1.1. Color..... | 40 |
| 3.3.1.2. pH..... | 41 |
| 3.3.1.3. Capacidad de retención de agua..... | 41 |
| 3.3.2. Incorporación de las nanopartículas del quitosano cargadas con aceite esencial de <i>T. elliptica</i> Sm. en carne de alpaca..... | 41 |
| 3.3.2.1. Preparación de la solución del recubrimiento para carne de alpaca..... | 41 |
| 3.3.2.2. Preparación e inmersión de filetes de carne de alpaca marinados en la solución de recubrimiento con (AEC-QSNPs)..... | 41 |
| 3.3.2.3. Análisis físicoquímicos en el marinado de carne de alpaca..... | 42 |
| 3.3.2.4. Esquema experimental | 42 |
| 3.3.2.5. Análisis estadístico..... | 42 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 44 |
| 4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Tagetes elliptica</i> Sm. (CHINCHO).. | 44 |
| 4.1.1. Extracción del aceite esencial de las hojas y de la mezcla de hojas y tallos de <i>T. elliptica</i> Sm. | 44 |
| 4.1.2. Capacidad antioxidante del aceite esencial de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm..... | 44 |
| 4.1.2.1. Actividad de barrido de radicales libres (DPPH)..... | 44 |
| 4.1.2.2. Ensayo de eliminación de radicales 2, 2'-Azinobis (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS)..... | 45 |
| 4.1.2.3. Poder antioxidante férrico reductor (FRAP)..... | 46 |
| 4.1.2.4. Capacidad quelante de iones ferrosos (FIC) | 47 |
| 4.1.2.5. Ensayo Rancimat..... | 48 |
| 4.1.3. ...Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallo de <i>T. elliptica</i> Sm. | 49 |

| | |
|---|----|
| 4.1.3.1.Capacidad antioxidante de radicales libres de (DPPH)..... | 50 |
| 4.1.3.2.Ensayo de eliminación de radicales 2, 2'-Azinobis (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS)..... | 51 |
| 4.1.3.3.Poder antioxidante férrico reductor (FRAP)..... | 52 |
| 4.1.3.4.Capacidad quelante de iones ferrosos (FIC) | 53 |
| 4.1.3.5.Ensayo Rancimat..... | 54 |
| 4.1.4. Análisis cromatográfico por (GC-MS) del aceite esencial de <i>T. elliptica</i> Sm. | 55 |
| 4.1.5. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. | 57 |
| 4.2. OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CHINCHO POR DISEÑO BOX-BEHNKEN (DBB) | 59 |
| 4.2.1. Resumen del diseño experimental..... | 59 |
| 4.2.1.1.Modelo apropiado | 59 |
| 4.2.1.2.Análisis estadístico..... | 60 |
| 4.2.1.3.Efecto de las variables independientes en la eficiencia de encapsulación (Y ₁) | 61 |
| 4.2.1.4.Efecto de las variables independientes sobre la capacidad de carga (Y ₂)..... | 64 |
| 4.2.1.5.Optimización del proceso de encapsulación | 67 |
| 4.2.1.6.Caracterización de formulaciones optimizadas..... | 68 |
| 4.2.1.6.1.Tamaño de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidad (PDI)..... | 68 |
| 4.2.1.6.2.Análisis cromatográfico por (GC-MS) del nanoencapsulado del aceite esencial de <i>T. elliptica</i> Sm. | 70 |
| 4.2.1.6.3.Morfología de la superficie del nanoencapsulado de aceite esencial de <i>T. elliptica</i> Sm. con quitosano | 71 |
| 4.2.1.6.4.Análisis de Espectrofotometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)..... | 73 |
| 4.2.1.6.5.Liberación del aceite esencial de chincho en condiciones <i>in vitro</i> | 74 |
| 4.2.1.6.6.Actividad antimicrobiana del nanoencapsulado de aceite esencial de <i>T. elliptica</i> Sm. con quitosano | 75 |
| 4.2.2. Caracterización química, física y físico-química del músculo <i>Semimembranosus</i> de la carne de alpaca (<i>Vicugna pacos</i>). | 77 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.2.1.Composición química de la carne de alpaca | 77 |
| 4.2.2.2.Característica física y fisicoquímica de la carne de alpaca..... | 78 |
| 4.2.3. Incorporación libre y nanoencapsulada del aceite esencial de <i>T. elliptica</i> Sm. en filetes de carne de alpaca..... | 79 |
| 4.2.3.1.Características fisicoquímicas del recubrimiento en filetes de carne de alpaca.... | 79 |
| V. CONCLUSIONES | 84 |
| VI .RECOMENDACIONES..... | 85 |
| VII.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 86 |
| VIII.ANEXOS | 109 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Estructura química de los principales compuestos encontrados en plantas aromáticas de la familia Tagetes..... | 10 |
| Tabla 2: Actividad antioxidante del aceite esencial de hierbas aromáticas de otras especies..... | 11 |
| Tabla 3: Efecto antimicrobiano del extracto y aceite esencial de <i>T. elliptica</i> Sm..... | 14 |
| Tabla 4: Estudio de parámetros de encapsulado por gelificación iónica..... | 17 |
| Tabla 5: Composición química del músculo de la llama, bovino, llama, alpaca y ternero | 23 |
| Tabla 6: Variables independientes y dependientes del diseño Box-Behnken de 3 niveles y 3 factores..... | 33 |
| Tabla 7: Condiciones del diseño experimental para optimización de nanopartículas del (AEC) mediante el método de gelificación iónica | 34 |
| Tabla 8: Rendimiento de aceite de hojas y de la mezcla de hojas con tallo del (AEC) | 44 |
| Tabla 9: Capacidad antioxidante de los (AE) de las hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. medida por el método (DPPH). | 45 |
| Tabla 10: Capacidad antioxidante de los (AE) de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. medida por el método (ABTS). | 46 |
| Tabla 11: Capacidad antioxidante del (AE) de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. medida por el método (FRAP)..... | 47 |
| Tabla 12: Capacidad antioxidante del (AE) de las hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. medida mediante el ensayo de quelación del hierro ferroso. | 48 |
| Tabla 13: Capacidad antioxidante del (AE) de las hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. a diferentes concentraciones medida por el método Rancimat. | 49 |
| Tabla 14: Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallos de la <i>T. elliptica</i> Sm. mediante el ensayo (DPPH). | 50 |
| Tabla 15: Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallo de la <i>T. elliptica</i> Sm. mediante el ensayo (ABTS). | 51 |
| Tabla 16: Capacidad antioxidante del aceite esencial de las hojas y tallo de <i>T. elliptica</i> Sm. mediante el ensayo (FRAP)..... | 53 |
| Tabla 17:Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallos de <i>T. elliptica</i> Sm. mediante ensayo (FIC)..... | 54 |
| Tabla 18:Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallos de <i>T. elliptica</i> Sm. utilizando el ensayo RANCIMAT. | 55 |

| | |
|--|----|
| Tabla 19: Composición química del aceite esencial de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. | 56 |
| Tabla 20: Resultados de la actividad antibacteriana del (AEC) de las hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. | 58 |
| Tabla 21: Matriz de Box-Benhken y respuestas para las diferentes formulaciones en estudio... | 59 |
| Tabla 22: Adecuación del modelo y estadísticas de resumen del modelo para la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga | 60 |
| Tabla 23: La respuesta de los valores predichos y experimentales de las condiciones optimizadas. | 68 |
| Tabla 24: Caracterización de los (QSNP) cargados con (AEC) optimizados en términos de eficiencia de encapsulación, capacidad de carga, tamaño medio de partículas hidrodinámicas, potencial Zeta e índice de polidispersidad (PDI). | 69 |
| Tabla 25: Composición química del nanoencapsulado del aceite esencial de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. | 71 |
| Tabla 26: Actividad antimicrobiana de (QSNP) y (AEC-QSNP), expresada como concentración inhibitoria mínima (MIC) contra <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>S. infantis</i> | 76 |
| Tabla 27: Composición química del músculo <i>Semimembranosus</i> de la carne de alpaca..... | 77 |
| Tabla 28: Caracterización física y fisicoquímica del musculo <i>Semimembranosus</i> de la carne de alpaca..... | 78 |
| Tabla 29: Efecto del tratamiento y tiempo de almacenamiento sobre los cambios de color en diferentes grupos del músculo de carne de alpaca..... | 81 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Propiedades de <i>Tagetes elliptica</i> Sm. | 6 |
| Figura 2: Técnicas y equipos de destilación de aceite esencial: (a) Destilador al vapor, b) Hidrodestilación..... | 7 |
| Figura 3: Estructuras químicas de los principales componentes de los aceites esenciales derivados de las plantas aromáticas..... | 9 |
| Figura 4: Mecanismos de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales | 13 |
| Figura 5: Ilustración esquemática de las estructuras de diferentes tipos de sistemas de encapsulación que se usan comúnmente para atrapar aceites esenciales. | 15 |
| Figura 6:Ventajas de la nanoencapsulación de aceites esenciales (AEs). | 16 |
| Figura 7: Etapas en la extracción del aceite esencial de <i>Tagetes elliptica</i> Sm. | 26 |
| Figura 8: Esquema experimental de la ETAPA I – Caracterización del aceite esencial de <i>Tagetes elliptica</i> Sm. | 31 |
| Figura 9: Esquema experimental de la ETAPA II – Optimización del aceite de hojas de <i>Tagetes elliptica</i> Sm. y su incorporación en filetes de carne de alpaca..... | 39 |
| Figura 10: Esquema experimental de la ETAPA II – Optimización del aceite de hojas de <i>Tagetes elliptica</i> Sm. y su incorporación en filetes de carne de alpaca..... | 43 |
| Figura 11: Gráficos del modelo. Optimización de la eficiencia de encapsulación..... | 62 |
| Figura 12: Gráfica de correlación lineal entre los valores actual y predicho para la respuesta de eficiencia de encapsulación (Y_1). | 63 |
| Figura 13:Gráficos del modelo. Optimización de la capacidad de carga | 65 |
| Figura 14:Gráfica de correlación lineal entre los valores actual y predicho para la respuesta de la capacidad de carga (Y_2). | 66 |
| Figura 15: Fotografía de (a) Nanopartículas de quitosano (QSNP) (b) Nanopartículas de quitosano cargadas con aceite esencial de chincho (AEC-QSNP). | 68 |
| Figura 16:(a) Distribución de tamaño de partícula promedio y (b) gráficos de potencial zeta de AEC-QSNP optimizados. | 70 |
| Figura 17: Micrografías de microscopio electrónico de barrido (SEM) de (QSNP) con (a) aumento de 10000X y (b) aumento de 20000X, y los (AEC-QSNP) optimizados con (c) aumento de 10000X y (d) aumento de 20000X..... | 72 |
| Figura 18: Espectros FTIR de (a) Nanopartículas de quitosano (QSNP), (b) Nanopartículas de quitosano cargadas con aceite de chincho (AEC-QSNP), (c) Aceite esencial de chincho-AEC | 73 |
| Figura 19: Aceite esencial de chincho liberado (por ciento) del sistema de organogel de | |

| | |
|--|----|
| nanopartículas de quitosano obtenido del proceso de optimización en tampones de acetato y fosfato (pH 3 y pH 7)..... | 75 |
| Figura 20: Cambios de pH en diferentes grupos durante 13 días de almacenamiento en refrigeración..... | 80 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|---|-----|
| Anexo 1: Identificación de planta <i>Tagetes elliptica</i> Sm..... | 110 |
| Anexo 2: Diseño experimental de Box-Behnken de 3 factores y 2 niveles para optimizar las cápsulas de quitosano cargadas de aceite esencial de chincho | 111 |
| Anexo 3: Curva de calibración para concentración de AEC | 112 |
| Anexo 4: Cálculo de IC ₅₀ | 113 |
| Anexo 5: Resultados de análisis estadístico | 115 |
| Anexo 6: Actividad antimicrobiana..... | 142 |
| Anexo 7: Artículos científicos publicados de <i>Tagetes elliptica</i> Sm. | 143 |
| Anexo 8: Comunicación a congresos internacionales | 145 |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|----------|---|
| A | Absorbancia |
| AA | Ácido ascórbico |
| ABTS | 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfónico); persulfato potásico; ferrozina; cloruro de hierro (II); |
| Ae | Aceite esencial |
| AEC | Aceite esencial de chincho (inglés: Chincho essential oil-CEO) |
| AEC-QSNP | Nanopartículas de quitosano con aceite esencial de chincho |
| ATC | Ácido tricloroacético |
| ATCC | United States Institute of Culture |
| BHT | Butilhidroxitolueno |
| CC | Capacidad de carga |
| DBB | Diseño de Box-Behnken |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DPPH | 2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacetato |
| EC | Efecto quelante (inglés: Efect Chelating) |
| EE | Eficiencia de encapsulación |
| FIC | Capacidad quelante de iones ferrosos (inglés: Ferrous Ion Chelating) |
| FRAP | Poder antioxidante reductor férrico (inglés: Ferric Reducing Antioxidant Power) |
| FTIR | Infrarrojo transformada de Fourier (inglés: Fourier-transform infrared). |
| GC-MS | Cromatografía de gases-espectrometría de masas (ingles: gas chromatography/mass spectrometry) |
| IAA | Índice de actividad antioxidante |
| IPD | Índice de polidispersidad (inglés: Polydispersity Index-PDI) |
| MHA | Agar Mueller Hinton (inglés: Mueller-Hilton agar) |
| MHB | Caldo Mueller Hinton |
| MIC | Concentración mínima inhibitoria (inglés: minimum inhibitory concentration- |

| | |
|------------------|---|
| | MIC) |
| MSR | Metodología de superficie de respuesta |
| NaOH | Hidróxido de sodio |
| NP | Nanopartículas |
| PI | Porcentaje de inhibición |
| IC ₅₀ | Concentración inhibitoria media máxima (inglés: Inhibition Concentration-IC ₅₀) |
| PZ | Potencial zeta (inglés: Zeta potencial-ZP) |
| QS | Quitosano |
| QSNP | Nanopartículas de quitosano |
| SEM | Microscopía electrónica de barrido (inglés: Scanning Electron Microscopy) |
| T | Tagetes |
| TPP | Tripolifosfato de sodio (inglés: Sodium Tripolyphosphate) |
| Trolox | 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid |

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue caracterizar y nanoencapsular el aceite esencial de *Tagetes elliptica* Sm. (chincho) – AEC y evaluar su estabilidad del marinado en los filetes de carne de alpaca. Se extrajo el AEC de las hojas y de la mezcla de las hojas con tallo del chincho y se analizó su composición química, actividad antioxidante y la actividad antimicrobiana. Se optimizó el nanoencapsulado del AEC utilizando el método de gelificación iónica con un diseño Box-Behnken (DBB). El aceite de las hojas y la mezcla de las hojas con tallos del chincho presentó actividad antioxidante para los ensayos (ABTS, DPPH, FRAP, FIC y Rancimat) y evidenció actividad antibacteriana contra: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella infantis* y *Escherichia coli*. Se identificaron 27 compuestos en el AEC, siendo el componente mayoritario la *cis*-tagetenona 37.27 por ciento. El DBB determinó que las condiciones óptimas para las nanopartículas del AEC son: pH= 4.4, la relación de masa Quitosano: AEC de 1:0.7 y la relación de masa Quitosano: Tripolifosfato de Sodio de 1:0.46. Las nanopartículas de AEC tenían formas uniformes, mostraron una eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de 52.64 por ciento y 11.56 por ciento con un diámetro de 458.5 nm. Los estudios de liberación del AEC *in vitro* alcanzaron niveles de 18.80 por ciento (pH = 7) y 20.87 por ciento (pH = 3) durante 6 h, las nanopartículas de AEC mostraron actividad antimicrobiana y la incorporación del recubrimiento mantuvo la estabilidad del pH y color de la carne de alpaca durante 13 días en refrigeración. En conclusión, el AEC mostró una actividad antioxidante y antimicrobiana, fue encapsulado con éxito con nanopartículas de quitosano y mantuvo la estabilidad fisicoquímica de la carne de alpaca. Por lo tanto, estos resultados podrían ser una alternativa tecnológicamente viable a los antioxidantes sintéticos y agentes antimicrobianos utilizados en la industria alimentaria y gastronómica.

Palabras claves: Aceite esencial; *Tagetes elíptica* Sm.; actividad antioxidante; actividad antimicrobiana; nanoencapsulado; productos cárnicos

ABSTRACT

The objective of this research was to characterize and nanoencapsulate the *Tagetes elliptica* Sm. Chincho essential oil - CEO and evaluate its marinade stability in alpaca meat fillets. The CEO was extracted from the leaves and the mixture of leaves and stem of chincho and analyzed for its chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity. The nanoencapsulation of CEO was optimized using the ionic gelation method with a Box-Behnken design (BBD). The oil from the leaves and the mixture of leaves with stems of chincho presented antioxidant activity for the assays (ABTS, DPPH, FRAP, FIC and Rancimat) and evidenced antimicrobial activity against: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella infantis* and *Escherichia coli*. Twenty-seven compounds were identified in the CEO, with the major component being cis-tagetenone 37.27 percent. BBD determined that the optimal conditions for CEO nanoparticles are: pH= 4.4, Chitosan: CEO mass ratio of 1:0.7 and Chitosan: Sodium Tripolyphosphate mass ratio of 1:0.46. The CEO nanoparticles had uniform shapes, showed an encapsulation efficiency and loading capacity of 52.64 percent and 11.56 percent with a diameter of 458.5 nm. *In vitro* CEO release studies reached levels of 18.80 percent (pH = 7) and 22.54 percent (pH = 3) for 6 h, the CEO nanoparticles showed antimicrobial activity and the incorporation of the coating maintained the pH and color stability of alpaca meat for 13 days under refrigeration. In conclusion, CEO showed antioxidant and antimicrobial activity, was successfully encapsulated with chitosan nanoparticles and maintained the physicochemical stability of alpaca meat. Therefore, these results could be a technologically viable alternative to synthetic antioxidants and antimicrobial agents used in the food and gastronomic industry.

Keywords: Essential oil; *Tagetes elliptica* Sm.; antioxidant activity; antimicrobial activity; nanoencapsulation; meat products

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los consumidores se han preocupado más por una dieta saludable en la que se tiende a reducir o eliminar los aditivos artificiales en la elaboración de alimentos (Huang *et al.* 2022). Por ello, el estudio y consumo de alimentos "etiqueta limpia" elaborados con ingredientes naturales se ha incrementado como desafío en la industria agroalimentaria (Lucas *et al.* 2023; Kaderides *et al.* 2021), debido a que un estilo de vida más saludable mejora la salud y reduce el riesgo de enfermedades (Huang *et al.* 2022; Roobab *et al.* 2021).

Los estudios han demostrado que los aceites esenciales de las plantas aromáticas son usados como conservantes naturales (Al-Maqtari *et al.* 2022) por el contenido de compuestos bioactivos, incluidos terpenos, terpenoides, derivados de fenoles y compuestos alifáticos (Varghese *et al.* 2020; Bakkali *et al.* 2008). Por tal motivo se han utilizado en la industria alimentaria en el desarrollo de aditivos alimentarios naturales, debido a la actividad antioxidante y actividad antimicrobiana, además de proporcionar sabores exóticos (Wintola *et al.* 2021; Sharma *et al.* 2020; Abdelaziz *et al.* 2020; Bhavaniramya *et al.* 2019; Petrović, *et al.* 2017).

La investigación y la aplicación de los aceites esenciales en la incorporación de alimentos se ha incrementado en los últimos años (Al-Maqtari *et al.* 2022; Giannenas *et al.* 2022). Además, vienen siendo utilizados como materiales de envasado (Sharma *et al.* 2021; Salehi *et al.* 2018) y por ello está ganando mayor importancia en el mercado global (Bhowmik *et al.* 2022; Weisany *et al.* 2022). Pero presentan algunas limitaciones como la baja solubilidad en agua, su alta volatilidad, el fuerte olor que poseen y al aplicar directamente en la matriz alimentaria comienzan a degradarse rápidamente debido a la interacción entre su composición volátil e inestable. Por otro lado, los factores externos como el calentamiento, la luz y la oxidación (Bhowmik *et al.* 2022; Sharma *et al.* 2021). Por tal motivo es necesario aplicarlos como materiales de envasado, películas recubiertas o como emulsiones gelificadas, nanoemulsiones y recubrimientos (Sharma *et al.* 2021; Fernández and Viuda, 2018).

La incorporación de los aceites esenciales en productos cárnicos es muy importante debido a que hoy en día son uno de los productos más demandados. Por otro lado, la investigación sobre la creciente industria peruana en productos cárnicos como la alpaca ha demostrado ser un alimento sano, nutritivo y beneficioso para la salud, que posee un cociente de ácidos grasos omega 6/omega 3 menor a 4, que es entendido como mucho más nutritivo y saludable que la de otros animales de abasto (Salvá *et al.* 2009). Pero se ha identificado limitaciones en la capacidad de entregar un producto consistente a los consumidores debido a la oxidación de lípidos y proteínas de la carne que son los responsables del deterioro del sabor, el color y la textura de los productos cárnicos (Soladoye *et al.* 2015).

Una alternativa para incorporar los aceites esenciales en alimentos es la tecnología de la nanoencapsulación, que podría mejorar la estabilidad física, la solubilidad, la retención de las propiedades bioactivas, propiedades sensoriales y su vida útil (Zabot *et al.* 2022; Zanetti *et al.* 2018). Además, un aspecto importante que debe ser considerado en la nanoencapsulación es la selección de la matriz polimérica, que debe ser adecuada para formar las nanopartículas. Una alternativa es el quitosano, que es atóxico, biocompatible y biodegradable con buenas propiedades de barrera (Abere *et al.* 2022). Por otro lado, la aplicación de aceites esenciales en la elaboración de productos cárnicos es tecnológicamente viable, debido a que podría aplicarse como recubrimiento elaborado con nanopartículas cargadas con aceites esenciales para evitar las reacciones oxidativas de productos cárnicos, pérdida de agua, evitando la volatilización de aromas, contaminación microbiana y además de incorporar varios compuestos con propiedades bioactivas (Dutra da Silva *et al.* 2022).

La especie *Tagetes elliptica* Sm. conocida como chincho, es una de las hierbas más consumidas en el Perú. Esta hierba aromática se utiliza por su calidad culinaria (gourmet) debido a los principios activos de sus aceites esenciales, que le dan su aroma característico y se incorpora en guisos y aderezos con carnes, entre otros alimentos (De la Cruz *et al.* 2014). Por sus aceites esenciales, el género *Tagetes* (Walia *et al.* 2020, De Oliveira *et al.* 2018; Singh *et al.* 2015) y en particular la *T. elíptica* Sm. podrían utilizarse como aditivo natural para la industria alimentaria (Giarratana *et al.* 2017; Mogoşanu *et al.* 2017; Singh *et al.* 2015); además se ha evidenciado que el aceite esencial de chincho tiene actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Ruiz *et al.* 2021; Segovia *et al.* 2010).

Por otro lado, existen estudios sobre otras especies de la Tagetes como la *T. minuta*, *T. erecta*, *T. palula*, en el cual han evidenciado actividad antioxidante y antibacteriana y la importancia de su aplicación en la industria alimentaria (Walia *et al.* 2020; De Oliveira *et al.* 2018; Singh *et al.* 2015). De esta manera, el aceite esencial de la *T. elliptica* Sm. se podría utilizar como conservante en los alimentos, debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas y compuestos aromáticos (Ruiz *et al.* 2021; Salehi *et al.* 2018). Hasta el momento, no existen informes relevantes sobre la composición del aceite esencial de la especie *T. elliptica* Sm., su actividad antioxidante y antibacteriana. Además, cuenta con pocos reportes bibliográficos y no es muy conocida por la comunidad científica y los consumidores (Stefanaki *et al.* 2021; Marotti *et al.* 2004; Salehi *et al.* 2018).

Por lo tanto, el objetivo general de la presente investigación fue elaborar nanopartículas de aceite esencial de la *T. elliptica* Sm. (chincho) y evaluar su efecto en la estabilidad de la carne de alpaca marinada. Para lograr dicho objetivo, la presente investigación se realizó en 3 etapas: (1) Extraer el aceite esencial de las hojas y de la mezcla de las hojas con tallo del chincho e identificar la composición química, actividad antioxidante y antimicrobiana presente en el aceite esencial de chincho; (2) Optimizar la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga del aceite esencial de chincho, caracterizar las nanopartículas optimizadas y determinar estudios de liberación *in vitro* y actividad antimicrobiana del chincho; y (3) Caracterizar la carne de alpaca del músculo *Semimembranosus* y evaluar su estabilidad en los filetes de carne de alpaca marinada con la aplicación de las nanopartículas del aceite esencial de chincho.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. PLANTAS AROMÁTICAS

Las plantas aromáticas son plantas que contienen aceites esenciales que son muy importantes en las industrias de repelente de insectos, perfumería, cosméticos y procesamiento de alimentos. El estudio y la investigación de las plantas aromáticas hoy en día se han incrementado y existe un gran interés debido al contenido de compuestos fenólicos para su uso en la industria alimentaria (Skendi *et al.* 2022). Estos compuestos fenólicos, que son principalmente metabolitos secundarios, se valoran con mayor frecuencia por su carácter antioxidante general y la creciente conciencia de sus características que promueven la salud. La concentración de un determinado compuesto fenólico puede variar de un órgano a otro dentro de la misma planta (Rawat *et al.* 2023).

Las principales plantas aromáticas se utilizan como aditivos alimentarios y condimentos. Entre los más conocidos tenemos a las familias Geraniaceae, Poaceae, Lamiaceae Orégano (*Origanum vulgare* L.), tomillo (*Thymus vulgaris* L.), salvia (*Salvia officinalis* L.), romero (*Rosmarinus officinalis* L.) y Asteraceae (*Tagetes* spp.) (Mishra *et al.* 2022; Bakkali *et al.* 2008). El uso de las especies provenientes de las plantas en la alimentación es muy importante, debido a que se utilizan como colorantes y conservantes por contener compuestos bioactivos como terpenos, flavonoides y antocianinas; por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. Debido a eso estas especies son una alternativa natural de los aditivos naturales por aditivos sintéticos (De La Torre *et al.* 2017).

2.1.1. Género *Tagetes*

El género *Tagetes* es generalmente conocido como caléndulas, plantas silvestres que pertenece a la familia Astereceae cultivadas como plantas ornamentales que comprende la familia más grande con más de 23000 de plantas vasculares (Mishra *et al.* 2022; Cornelio y Wcliffe, 2016). Está representada por más de 30 especies distribuidas en las regiones central y sur de América (Lokerman *et al.* 2003), las cuales están adaptadas a vivir desde el nivel del mar hasta las mayores altitudes (Beltrán, 2016). Éstas contienen compuestos naturales

de tiofeno (metabolitos secundarios) que poseen propiedades biológicas como actividades antibacterianas, antioxidantes, antivirales y anticancerígenas (De la Cruz *et al.* 2022; Huaraca *et al.* 2022; De Oliveira *et al.* 2019; Saani *et al.* 2018; Ibrahim *et al.* 2017; Ibrahim *et al.* 2016).

Este género ha incrementado su demanda masiva en el mercado actual, debido a la rápida utilización de sus aceites esenciales en las industrias de perfumería y saborizantes (Mishra *et al.* 2022). Además, se ha utilizado en medicina popular, como hojas y partes florales en infusión por sus propiedades antiinflamatorias y digestivas (Hammond *et al.* 1998). De igual forma podría ser utilizado como colorante natural por el contenido de carotenoides (Mishra *et al.* 2022; Šivel *et al.* 2014; Khali *et al.* 2012). Por otro lado, sirve como analgésico para tratar diversas dolencias y aliviar el dolor (González *et al.* 2014). Las especies más conocidas y estudiadas del género *Tagetes* son *T. erecta*, *T. minuta*, *T. pusilla*, *T. lucida*, *T. patula* y *T. terniflora*; entre ellas la especie botánica en estudio, *Tagetes elliptica* Sm. (De Oliveira *et al.* 2019).

2.1.1.1. *Tagetes elliptica* Sm

Es una planta ornamental y cultivada que crece en todo el Perú entre los 1000 a 4500 msnm, en las regiones andinas de Ayacucho, Junín, Ancash y en los climas templados de las regiones Amazónica y Lima; además, es muy conocida en Centro y Sudamérica (Beltrán 2016). Conocida como "chincho", "chinchu" o "chikchimpa", siendo utilizada por su aroma característico, consumida desde hace muchos años por su especial aditivo culinario (Natividad *et al.* 2009). Debido a sus propiedades son utilizadas tradicionalmente en el Perú en la preparación de diversos potajes, asados, y en platos típicos peruanos como la "pachamanca" (plato típico peruano, cuyo proceso de cocción es por contacto con piedras calientes enterradas a 30-50 cm de profundidad) (Díaz 2014).

Las hojas de *T. elliptica* Sm. son fuente de metabolitos secundarios monoterpenos 61 por ciento y antioxidantes que pueden ser utilizados como conservantes de alimentos (Huaraca *et al.* 2022). Además, han sido utilizadas como medicina natural en infusión contra dolores estomacales, dolores intestinales y como digestivo (De La Cruz *et al.* 2007). Por otro lado, sus aceites esenciales son reconocidos por ser ricos en componentes aromáticos que a menudo contienen tagetonas, dihidrotagetona y tagetenonas (Salehi *et al.* 2018), β -mirceno,

cis/trans-epoximirceno y trans-tagetenona (Ruiz *et al.* 2021; Huaraca *et al.* 2022; Carhuapoma 2017). La tagetona y la ocimenona fueron las más abundantes respectivamente (Pichette *et al.* 2005, Marotti *et al.* 2004) y β -ocimeno, dihidrotagetona, tagetona, tagetenona exactamente en *T. minuta* ha sido la más estudiada (Walia *et al.* 2020; De Oliveira *et al.* 2018). Debido a su composición química, concentración y condiciones ambientales la *T. elliptica* Sm. desempeña un papel importante en la industria y presenta diversas aplicaciones debido a sus propiedades (Figura 1).



Figura 1: Propiedades de *Tagetes elliptica* Sm

Fuente: Ruiz *et al.* (2021); Yalta *et al.* (2019); Pimentel *et al.* (2015); Diaz *et al.* (2014); De La Cruz *et al.* (2007)

2.1.2. Aceites esenciales provenientes de plantas aromáticas

Los aceites esenciales son extractos naturales y volátiles productos de metabolitos secundarios que contienen compuestos bioactivos extraídos de diversas partes de las plantas aromáticas (flores, hojas, tallos y frutos), como los terpenos, lípidos, aldehídos y otros compuestos. Los terpenos son el compuesto principal de los aceites esenciales Aqeel *et al.* (2023).

Los aceites esenciales son extraídos por diversos métodos como la destilación al vapor, la extracción con solventes, la extracción con CO₂, extracción de fluidos supercríticos,

extracción asistida por microondas, la maceración, la extracción por presión en frío y la hidrodestilación (Ortiz *et al.* 2022; Dutra da Silva *et al.* 2021; Sharma *et al.* 2021). El alambique es el equipo de destilación más utilizado en extracciones caseras por destilación al vapor, en el cual el agua y el material vegetal se colocan en recipientes separados (Figura 2a). La extracción por hidrodestilación consiste en el cual la planta se sumerge completamente en agua y se transfiere el aparato de destilación seguido del calentamiento, esta es la más utilizada a escala de laboratorio (Figura 2b) (Sundar *et al.* 2023; Ortiz *et al.* 2022).

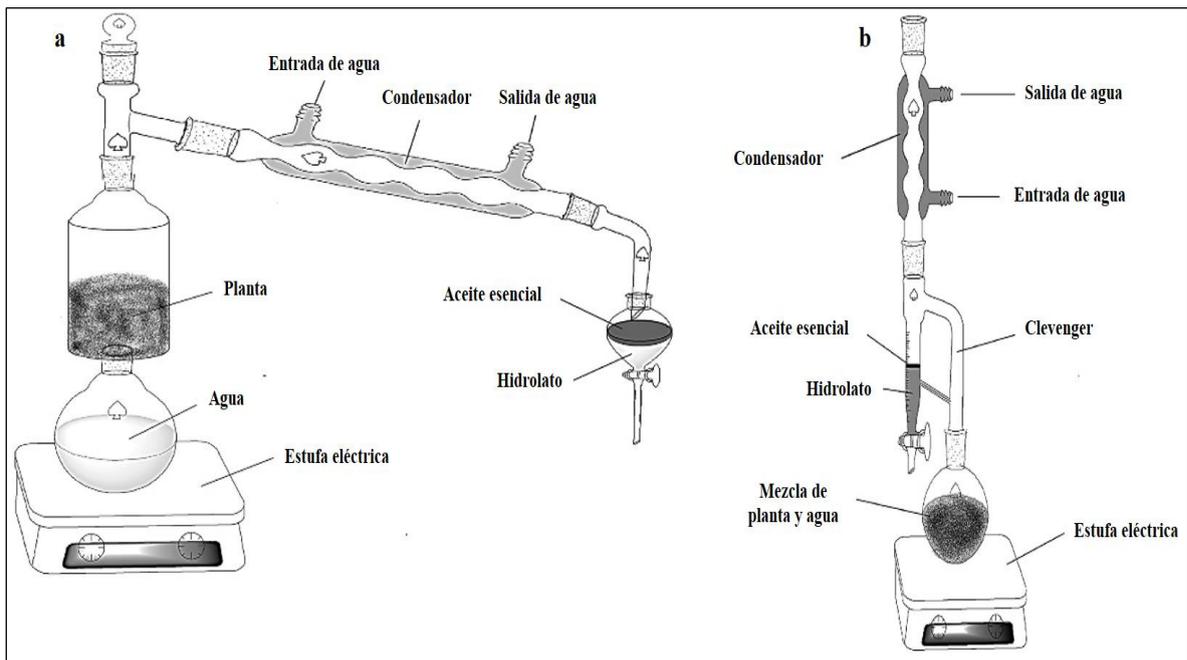


Figura 2: Técnicas y equipos de destilación de aceite esencial: (a) Destilador al vapor, b) Hidrodestilación

Fuente: Adaptado por Ortiz *et al.* (2020)

Los principales países productores de aceites esenciales son: Brasil, India, China e Indonesia, mientras los principales países consumidores son Estados Unidos 40 por ciento, la Unión Europea 30 por ciento y Japón 7 por ciento (Aqeel *et al.* 2023). Los aceites esenciales han recibido una atención considerable por su uso en la agricultura, cuidado personal, en las industrias de salud y alimentación (Aqeel *et al.* 2023). En la industria alimentaria se utiliza como conservantes naturales por su actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica (Bravaniramy *et al.* 2019; Khorshidian *et al.* 2018), aumentando la calidad, seguridad alimentaria; además de dar sabor a los alimentos (Li *et al.* 2022) tiene gran influencia en el aumento de la vida útil de los alimentos (Rout *et al.* 2022).

Las investigaciones han señalado que los aceites esenciales de diversas plantas aromáticas contienen antioxidantes naturales, que pueden sustituir los antioxidantes sintéticos como el Butilhidroxianisol (BHA), Butilhidroxitolueno (BHT) y Ácido ascórbico (AA) (Tagnaout *et al.* 2022; Viuda *et al.* 2010).

Además, los aceites de la familia Tagetes pueden utilizarse en sustitución de los antioxidantes sintéticos para la conservación de alimentos (Singh *et al.* 2015), debido a su actividad antiinflamatoria y analgésica que tienen efectos paliativos contra diversas enfermedades (Riaz *et al.* 2020; Panmei, *et al.* 2019; Salehi *et al.* 2018). Debido a estas cualidades el aceite esencial de estas plantas aromáticas es utilizado como aditivo natural en alimentos (Salehi *et al.* 2018; Giarratana *et al.* 2017) y es una alternativa para la conservación de alimentos debido a su actividad antimicrobiana (Bhavaniramya *et al.* 2019).

2.1.3. Composición química de aceites esenciales

La composición química de los aceites esenciales comprenden principalmente cuatro grupos principales: Terpenos (son los compuestos más abundantes entre ellos el monoterpeno y sesquiterpenos son los terpenos dominantes que se encuentra en los aceites esenciales de las plantas); Fenilpropanoides (el eugenol y el cinamaldehído, son quienes le dan sabor y olor a las plantas); Compuestos de cadena lineal (el alcohol de hoja (3(Z)-hexen-1-ol) representa un ejemplo de esta clase) y Grupos misceláneos (entre ellos el disulfuro de dialilo y el indol) (Lammari *et al.* 2021).

Los terpenos están formados por moléculas de isopreno y pueden ser monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, tetraterpenos y politerpenos; los monoterpenos pueden modificar su estructura para formar otros compuestos como los terpenoides que son los responsables de la actividad antibacteriana (Dutra da Silva *et al.* 2021). Los principales componentes de los aceites esenciales en plantas aromáticas se pueden ver en la Figura 3.

La identificación y cuantificación de los compuestos de cada aceite esencial es muy importante debido a que permite estudiar la actividad antimicrobiana de los constituyentes individuales, uno de los métodos más utilizados es la cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas (Bakkali *et al.* 2008).

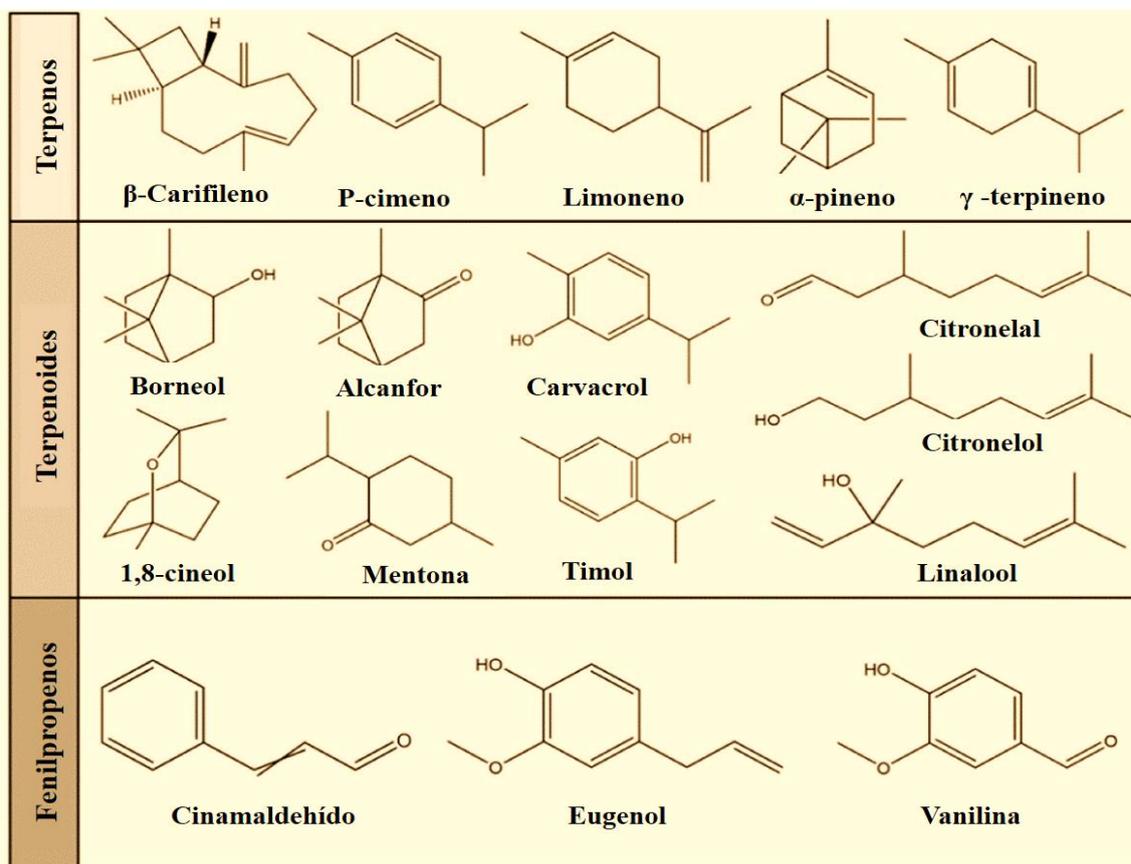


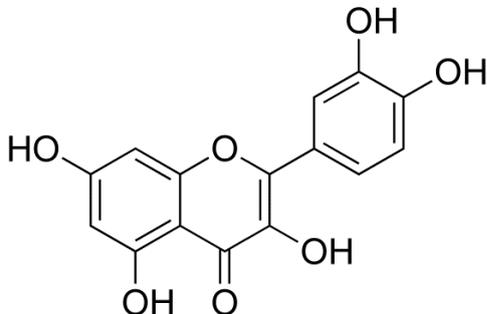
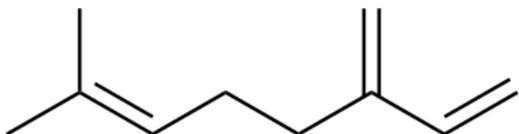
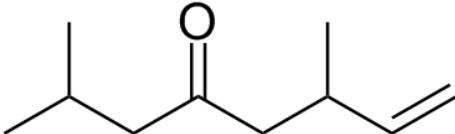
Figura 3: Estructuras químicas de los principales componentes de los aceites esenciales derivados de las plantas aromáticas

Fuente: Adaptado de Zhang *et al.* (2022)

Los aceites del género *Tagetes*, en concreto, son ricos en quercetina, ocimeno, limoneno, terpineno, mirceno, tagetonas, dihidrotagetona y tagetenonas (Kashyap *et al.* 2022; Salehi *et al.* 2018) (Tabla 1). Además, otros estudios informan de que los principales constituyentes del aceite de tagetes son las ocimeno (*Z*) y (*E*), junto con la piperitona, la piperitenona, el limoneno, la tagetona y el cariofileno (Cornelio y Wcliffe 2016).

Se han estudiado los aceites esenciales de algunas especies de *Tagetes* entre ellas *T. minuta*, *T. patula* y *T. erecta* han evidenciado tener actividad química y antimicrobiana, la cual es utilizada como en los alimentos y como colorante, siendo su principal compuesto los monoterpenos de la clase terpenoide (Singh *et al.* 2015).

Tabla 1: Estructura química de los principales compuestos encontrados en plantas aromáticas de la familia Tagetes

| Número | Estructura | Nombre del compuesto |
|--------|--|----------------------|
| 1 |  | Quercetina |
| 2 |  | Mirceno |
| 3 |  | Dihidrotagetona |

Fuente: Kashyap *et al.* (2022); Ruiz *et al.* (2021); Salehi *et al.* (2018)

2.1.4. Propiedades antioxidantes de aceites esenciales

Los aceites esenciales provenientes de las plantas aromáticas han evidenciado actividad antioxidante debido a su composición química entre ellos el carvacrol, timol, citronelal y eugenol (Teixeira *et al.* 2012). Estos contienen compuestos orgánicos que tienen dobles enlaces de carbono conjugados, donde las especies funcionales son radicales hidroxilo, que pueden transferir hidrógeno e inhibir los radicales libres. Además, los constituyentes químicos aislados tienen la propiedad de prevenir la oxidación de lípidos (da Trindade *et al.* 2021).

Bouزيد *et al.* (2023) demostraron que los aceites esenciales provenientes de plantas aromáticas de las familias Asteraceae y Lamiaceae tenían un alto contenido de fenoles totales (hasta 35.01 mg GAE/g MS), flavonoides (hasta 54.38 mg GAE/g MS) y valores de

Tabla 2: Actividad antioxidante del aceite esencial de hierbas aromáticas de otras especies

| Nombre científico | *Parte de la planta | | Ensayo | Concentración | Valor | Ref. |
|--|---------------------|--------|----------------------|----------------|--|-----------------------------|
| | la | planta | | | | |
| <i>Tagetes minuta</i> | Flores | | DPPH | 10-3000 µg/mL | PI ₅₀ : 1272.00 ± 107.30 µg/mL. | De |
| | | | ABTS | 1-200 µg/mL | PI ₅₀ : 102.70 ± 15.28 µg/mL. | Oliveira <i>et al.</i> 2019 |
| <i>Mentha suaveolens</i> , <i>Salvia officinalis</i> , <i>Origanum majorana</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> | Hojas | | DPPH | 0.04 g/L | PI ₅₀ : 0.78 ± 0.05 mg/mL PI ₅₀ : 2.12 ± 0.03 mg/mL PI ₅₀ : 3.67 ± 0.07 mg/mL PI ₅₀ : 4.82 ± 0.12 mg/mL | Ed-Dra <i>et al.</i> 2020 |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | Hojas | | DPPH | 2.5 - 200 µL | PI ₅₀ : 28.08 ± 1.97 µL/mL | Mikre <i>et al.</i> 2007 |
| <i>Pelargonium graveolens</i> | Hojas | | DPPH | 75 µg/mL | PI ₅₀ : 20 µg/mL | Mnif <i>et al.</i> 2011 |
| <i>Nyctanthes arbortristis</i> | Hojas | | DPPH | 2 - 50 µg/mL | PI ₅₀ : 26.74 µg/mL | Kaur and Kaushal, 2020 |
| <i>Ruta chalepensis</i> L. | Flores | | DPPH FIC | 5-100 µg/mL | PI ₅₀ : 35.27 µg/mL EC ₅₀ : 20110 µg/mL) | Althaher <i>et al.</i> 2020 |
| <i>Thymus vulgaris</i> L. | H, T, F | | FIC | 5-50 g/L | EC ₅₀ : 17.32 g/L | Viuda <i>et al.</i> 2010 |
| <i>Origanum vulgare</i> L. | F | | | | EC ₅₀ : 59.35 g/L | |
| <i>Salvia officinalis</i> L. | H y F | | | | EC ₅₀ : 7.16 g/L | |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | PE | | | | EC ₅₀ : 4.76 g/L | |
| <i>Thymus vulgaris</i> L. | H, T, F | | Rancimat | 5-50 g/L | IAA: 1.59 | Viuda <i>et al.</i> 2010 |
| <i>Origanum vulgare</i> L. | F | | | | IAA: 1.67 | |
| <i>Rosmarinus officinalis</i> L. | H y F | | | | IAA: 1.07 | |
| | PE | | | | IAA: 1.05 | |
| <i>Coreopsis tinctoria</i> Nutt | Flores | | DPPH ABTS FRAP | 0.03-0.5 mg/mL | PI ₅₀ : 0.45 ± 0.05 mg/mL PI ₅₀ : 9.51 ± 0.91 mg/mL TEAC: 0.097 ± 0.001 mmol/g | An <i>et al.</i> 2018 |

*Parte de la planta: Hojas (H), Tallos (T), Flores (F) y Planta entera (PE); PI₅₀: Concentración (g/L) para una inhibición del 50 por ciento; TEAC: Capacidad antioxidante equivalente a Trolox; EC₅₀: concentración (g/L) para un efecto quelante del 50 por ciento; IAA: Índice de actividad antioxidante.

capacidad antioxidante por DPPH (hasta 35.02 ± 0.17 mg AAE/g MS) y FRAP (hasta 774.85 ± 0.88 µmol TE/g MS), los cuales son fuentes de antioxidantes naturales.

Existe evidencia de que otras plantas conocidas del género *Tagetes*, incluida la *T. minuta*, contienen compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes (Walia *et al.* 2020; Ibrahim *et al.* 2017). *T. multiflora* tiene varias sustancias volátiles, como los terpenos entre los principales, el β -ocimeno, la dihidrotagetenona, la (Z) tagetona y el limoleno (Walia *et al.* 2020; Kumar *et al.* 2014; Pichette *et al.* 2005), que contribuyen a sus características especiales de sabor y olor, *T. erecta* se ha utilizado como agente colorante y suplemento nutricional (Kashyap *et al.* 2022) y también se utiliza como antioxidante natural en los alimentos (Huang *et al.* 2022). Los ensayos de actividad antioxidante tienen variabilidad de acuerdo a la composición de metabolitos secundarios en las diferentes partes de las plantas aromáticas (Tabla 2).

2.1.5. Propiedades antimicrobianas de aceites esenciales

Los aceites esenciales de las plantas ocupan el quinto lugar entre los agentes antimicrobianos más estudiados en comparación con compuestos puros como los extractos de plantas, terpenos, flavonoides y alcaloides. Los terpenos son los compuestos con mayor actividad antimicrobiana con un 56.8 por ciento seguido de los polifenoles con un 32.4 por ciento (Salehi *et al.* 2018). Estos mecanismos de acción están basados en el aumento de la permeabilidad y en la ruptura de la membrana plasmática bacteriana, los monoterpenos como el timol, el carvacrol, el eugenol, la carvona, el cinamaldehído y el limoneno son considerados significativamente activos con alta actividad antimicrobiana (Álvarez *et al.* 2021; Khorshidian *et al.* 2018).

Debido a su composición los aceites esenciales se están convirtiendo en posibles alternativas de antibióticos por su origen natural, baja toxicidad y ausencia de residuos (Al-Maqtari *et al.* 2022). Las lamiláceas son una de las familias más importantes con efecto antimicrobiano, entre ellos se encuentran el tomillo, el orégano y el romero que han sido muy utilizados en la industria alimentaria (Viuda *et al.* 2010). La mayoría de estudios indican que la mayor característica del aceite esencial del romero, es su la actividad antibacteriana (Zhong *et al.* 2021). Además, los aceites esenciales presentan diversos mecanismos de actividad antimicrobiana (Figura 4).

La estructura celular de las bacterias Gram negativas es más compleja, por eso son más resistentes a la actividad antibacteriana de los aceites esenciales que las bacterias Gram

positivas (Khorshidian *et al.* 2018). En todas las bacterias, los aceites esenciales se mueven a través de las membranas celulares, ocasionando cambios en la estructura de la pared celular, debido a su actividad antimicrobiana que modifica su permeabilidad y resulta en la liberación de constituyentes, provocando la muerte celular (Behbahani *et al.* 2019).

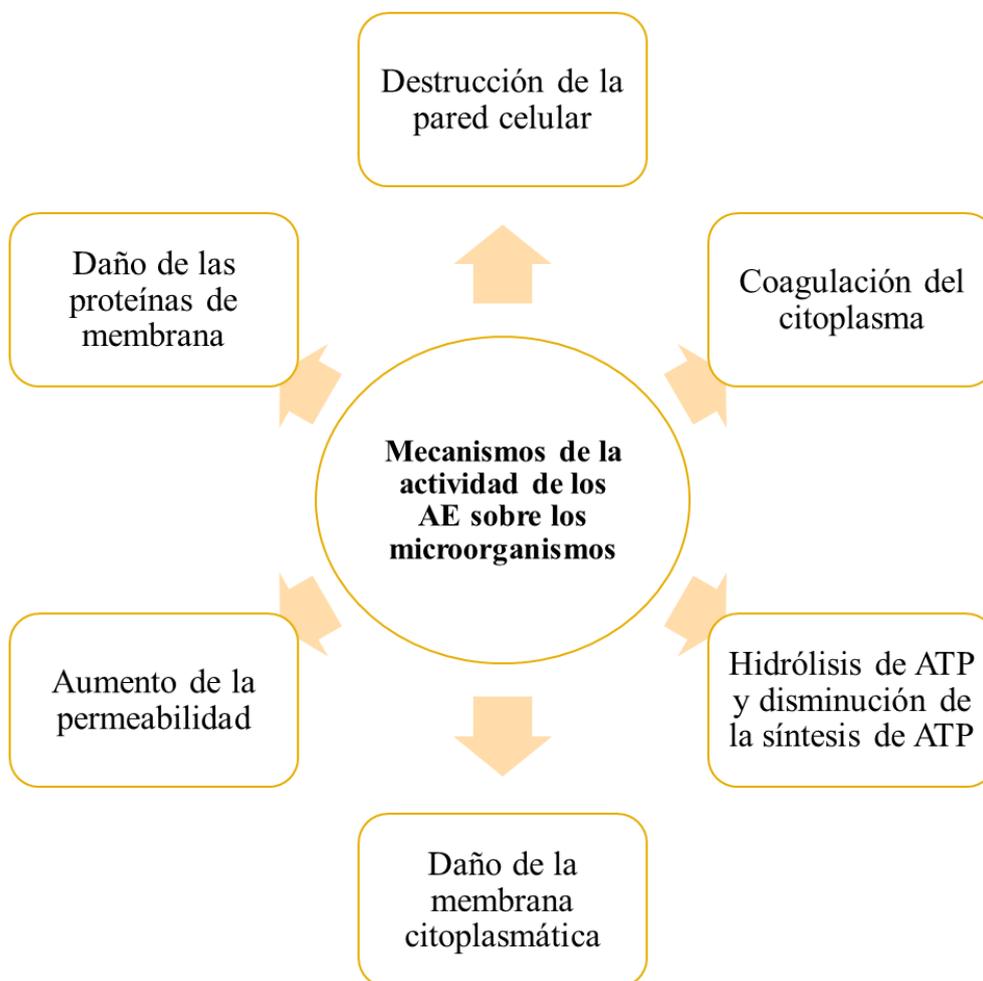


Figura 4: Mecanismos de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

Fuente: Adaptado por Khorshidian *et al.* (2018)

La pared celular de las bacterias Gram positivas consta de peptidoglicano 90-95 por ciento junto con ácido teicoico y proteínas unidas a él, además la mayor parte de los aceites esenciales son hidrófobos, interactúan con la membrana celular y la atraviesan fácilmente hasta el citoplasma (Khorshidian *et al.* 2018). Por otro lado, la estructura de la pared celular en las bacterias Gram-negativas es más compleja y consta de una monocapa de peptidoglicano rodeada por una membrana externa que consta de proteínas y lipopolisacáridos (LPS) (Álvarez *et al.* 2021; Khorshidian *et al.* 2018).

Las plantas de la familia Astereaceae han sido relacionadas con efectos antimicrobiano (Tereschuk *et al.* 1997). Asimismo, otros estudios del género Tagetes han informado (Saani *et al.* 2018) que la actividad antibacteriana del extracto metanólico de la flor de la *T. erecta* es significativo también contra la bacteria Gram-positivo (*Staphylococcus aureus*) y contra otras bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*). La *T. elliptica* ha demostrado tener actividad antibacteriana que depende de sus componentes principales en sus extractos para inhibir algunos microorganismos (Tabla 3).

Tabla 3: Efecto antimicrobiano del extracto y aceite esencial de *T. elliptica* Sm

| Bacteria de inhibición | Solvente/aceite con máxima inhibición | Concentración mínima inhibitoria (MIC) | Referencias |
|---|--|---|----------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Aceite esencial | $< 9.76 \times 10^{-4}$, 0.125, 0.5, $< 9.76 \times 10^{-4}$, $< 9.76 \times 10^{-4}$ ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | Segovia <i>et al.</i> 2010 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Extracto etanólico | - | Díaz 2014 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> , y <i>Staphylococcus epidermidis</i> | Aceite esencial | 0.3125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | Ruiz <i>et al.</i> 2021 |

2.2. ENCAPSULACIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN ALIMENTOS

2.2.1. Encapsulado de aceites esenciales

El encapsulado es un método para atrapar un agente activo dentro de otro material biocompatible para preservar su funcionalidad (Sundar *et al.* 2023). Además, permite la liberación controlada de moléculas bioactivas de manera que su eficacia se realice al máximo. En el cual se produce partículas de diferentes tamaños que van de milímetros a nanómetros (Sundar *et al.* 2023).

Se considera diámetros que oscilan entre 1 y 1000 nm y las micropartículas que tienen diámetros que oscilan entre 1 y 1000 μm (Joye 2021; Sanguansri y Agustín 2006). Además, hay evidencia científica del crecimiento de investigación, desarrollo y aplicación del

encapsulado de aceites en los últimos 12 años (Weisany *et al.* 2022).

La nanotecnología es el diseño, caracterización producción y aplicación intencional de estructuras, aplicados en la encapsulación de ingredientes activos dentro de micropartículas y nanopartículas para mejorar su desempeño funcional, estabilidad en almacenamiento y la biodisponibilidad oral de los componentes alimentarios (Weisany *et al.* 2022).

2.2.2. Encapsulación por gelificación iónica

La encapsulación por gelificación iónica es un método adecuado para encapsular aceites esenciales con diferentes tipos de principios activos (Odjo *et al.* 2022; Cáceres *et al.* 2020), para protegerlos, retenerlos y liberarlos (Weisany *et al.* 2022). Esta técnica aumenta la actividad antioxidante y antimicrobiana (Zhang *et al.* 2019), también ha demostrado su eficacia para mantener la estabilidad térmica del contenido fenólico en los aceites esenciales de menta y té verde (Brito *et al.* 2022). Además, la región interna del material que encapsula la molécula activa es el núcleo y está cubierta por un material de pared o soporte (Weisany *et al.* (2022) (Figura 5) y presenta diversas ventajas (Figura 6).

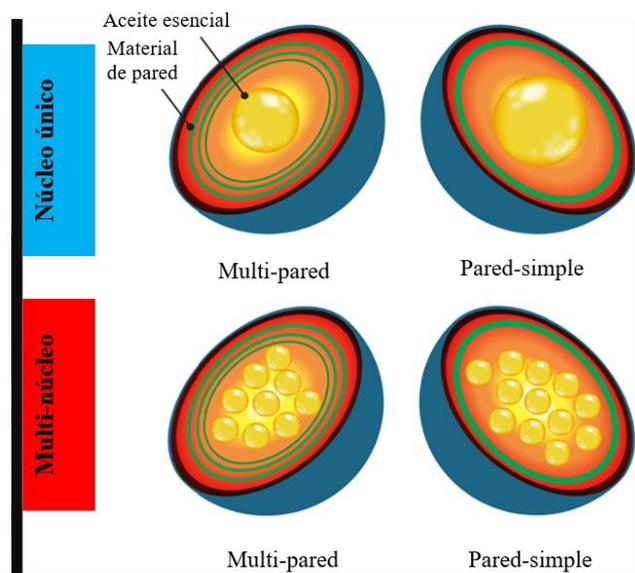


Figura 5: Ilustración esquemática de las estructuras de diferentes tipos de sistemas de encapsulación que se usan comúnmente para atrapar aceites esenciales

Fuente: Weisany *et al.* (2022)



Figura 6: Ventajas de la nanoencapsulación de aceites esenciales (AEs)

Fuente: Weisany *et al.* (2022); Rao *et al.* (2017)

La preparación de películas activas a base de quitosano por el método de gelificación iónica se ha utilizado para formar nanopartículas de quitosano cargadas con aceite esencial, en los cuáles se incorporan a los alimentos tipo un recubrimiento y por inmersión (Zhang *et al.* 2019). En la película activa se utiliza ácido acético al 2 por ciento para disolver el quitosano, el glicerol como plastificante y el Tween 80 como emulsionante (Pabast *et al.* 2018). Para formar un recubrimiento se agrega el tripolifosfato de sodio (TPP), el método de recubrimiento es comercial y de bajo costo para desarrollar recubrimientos de gran superficie y películas delgadas (Arabpoor *et al.* 2021; Keawchaon y Yoksan 2011). Además, el método de inmersión está ganando más atención en el sector industrial debido a que es fácil, rentable y no requiere grandes equipos (Weisany *et al.* 2022).

Por otro lado, luego de la encapsulación, resulta en algunos casos beneficioso convertir los aceites esenciales encapsulados en polvo para mejorar su manipulación, almacenamiento y transporte (Shetta *et al.* 2019). Uno de los métodos es el secado en frío como la liofilización que permite la deshidratación de sistemas de administración coloidal, que contienen agentes bioactivos térmicamente sensibles como los aceites esenciales, pero es relativamente costoso

y requiere mucho tiempo, lo que puede no ser adecuado para muchas aplicaciones comerciales (Pooja *et al.* 2017). Otra desventaja de los polvos producidos por liofilización es que las partículas sólidas formadas pueden contener grietas, a través de las cuales se pierden los aceites esenciales (Weisany *et al.* 2022; Zhang *et al.* 2019).

Debido a su tamaño nanométrico, estas nanopartículas (NP) en el uso de microencapsulación de gelificación iónica pueden mejorar su bioeficiencia (biodisponibilidad y solubilidad en medios acuosos); sin embargo, la influencia de las variables/factores dependientes e independientes involucrados en o durante el proceso podría afectar las propiedades fisicoquímicas de la formación de nanopartículas (Mora *et al.* 2011).

Aunque la encapsulación de aceites esenciales se realiza para evitar la degradación oxidativa, enmascarar el olor, evitar la evaporación de compuestos volátiles y mejorar la vida útil (Ghaderi *et al.* 2016). Después del encapsulado el producto deberá ser caracterizado para diseñar adecuadamente el sistema de encapsulación en el cual se reportan los siguientes estudios para la optimización de nanopartículas por el método de gelificación iónica (Tabla 4).

Tabla 4: Estudio de parámetros de encapsulado por gelificación iónica

| Variables Independientes* | Tamaño de partícula (nm) | Potencial Z (mV) | Índice de polidispersidad (PDI) | Porcentaje de Eficiencia de Encapsulación EE | Referencia |
|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|--|---|-------------------------------------|
| pH, QS/TPP y QS /aceite | 121.03±4.45 | +23±0.1 | 0.388±0.018 | 30.67±1.62 | (Ghaderi <i>et al.</i> 2016) |
| pH y QS /TPP | 76.2± 0.5 | +32.6±1.4 | 0.28±0.004 | - | (de Pinho Neves <i>et al.</i> 2014) |
| pH, QS /TPP y QS /aceite | 185±18 | 41.3±5.3 | 0.67 | 40.6±4.8 | (Zhang <i>et al.</i> 2019) |
| QS /TPP, QS/tween y QS/aceite | 256.3±6.5 | 29.0 ± 0.2 | - | 78-81 | (Shetta <i>et al.</i> 2019) |

*QS: Quitosano, TPP: Tripolifosfato de sodio

Para los análisis de algunas variables de respuesta como eficiencia de encapsulación y capacidad de carga se prepara una curva de calibración estándar y una línea de regresión con $R^2=0.99$, midiendo la absorbancia en varias diluciones del aceite esencial a una longitud de

onda a la que se observa la máxima absorbancia del aceite en un equipo como el espectrofotómetro; otros estudios informan sobre las características del potencial Z cuyos valores superior a 30mV o inferior a -30mV que indica buena estabilidad y valores fuera de ese rango causa aglomeración de partículas durante el almacenamiento (Zhang *et al.* 2019; de Pinho Neves *et al.* 2014).

Por otro lado, se hacen estudios de liberación *in vitro* de liberación sostenida, donde la tasa de liberación es constante con los atributos del sabor, aroma, antioxidantes, etc (Keawchaon *et al.* 2011). Estos estudios se llevan a cabo para determinar la seguridad y la eficacia de los sistemas de encapsulación basados en la nanotecnología, al mismo tiempo de poder usarse para predecir comportamientos *in vivo* a través de modelos matemáticos (Sundar *et al.* 2023).

Además, el estudio de la morfología de las nanopartículas por SEM (Microscopía electrónica de barrido), donde se puede observar la microestructura del material de envasado de alimentos, incorporado con los compuestos activos como los aceites esenciales. En el cuál, se utiliza un haz de electrones para escanear la estructura de las películas comestibles o recubrimientos con aceites esenciales y compararla con las películas o recubrimientos que no contienen componentes activos (Mondéjar *et al.* 2022). La disposición estructural de los componentes tiene un impacto en la microestructura final del material de envasado (Sharma *et al.* 2021). Recientemente, el uso de la espectroscopia FTIR es una de las técnicas utilizadas en las últimas décadas. Este método analítico altamente confiable sirve para determinar la composición, la estructura y las interacciones entre los diferentes grupos funcionales presentes en los aceites, además es una técnica rápida, no destructiva y no necesita la preparación de las muestras (Jamwal *et al.* 2021).

2.2.3. Quitosano

El quitosano es el derivado N-desacetilado de la quitina y se obtiene después de la desacetilación alcalina de la quitina (de Pinho Neves *et al.* 2014). Además, se encuentra entre los polímeros más importantes para desarrollar nuevos materiales de envasado, debido a sus características como: estabilidad química, no toxicidad, excelente capacidad de formación de películas, biocompatibilidad; así como propiedades antioxidantes y antimicrobiana (Hadidi *et al.* 2020; Mujtaba *et al.* 2019).

Por otro lado, la adición de aceites esenciales bioactivos con quitosano, mejora las

propiedades de estabilidad térmica y mecánica del quitosano para ser útiles como materiales activos de envasado con propiedades antioxidantes y antimicrobianas de alimentos prolongando la vida útil de los alimentos perecederos (Bhowmik *et al.* 2022).

Además, se ha utilizado como un encapsulante con propiedades formadoras de emulsiones que pueden generar constituyentes de envoltura central (Shahab *et al.* 2020) y también es interesante por su actividad antibacteriana contra varias cepas bacterianas, incluidas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Brito *et al.* 2022). Por todas estas características, el quitosano es un candidato prometedor para elaborar recubrimientos comestibles y estructurar organogeles. Sin embargo, es importante resaltar que el quitosano mostró una baja solubilidad en aceite, este hecho debe ser compensado para permitir la formación de una red tridimensional adecuada para retener el aceite, formando así un gel (Brito *et al.* 2022).

Por otro lado, para optimizar todos los factores y variables que pueden afectar la microencapsulación de gelificación iónica, los diseños experimentales aplicados se pueden programar utilizando la metodología de superficie de respuesta (MSR) y el diseño de Box-Behnken (DBB) (Almeida *et al.* 2019). MSR es una excelente herramienta muy útil para detectar la influencia de diferentes factores de formulación en las variables de respuesta (Medina *et al.* 2019; Tefas *et al.* 2015), mientras que DBB se aplica para establecer las condiciones experimentales óptimas, con ecuaciones polinómicas óptimas para las variables de respuesta evaluadas (AIMotwaa *et al.* 2022; Almeida *et al.* 2019).

2.3. ACEITES ESENCIALES COMO ADITIVOS EN ENVASES ALIMENTARIOS ACTIVOS

Los aceites esenciales ha sido una gran alternativa para mejorar la calidad de la carne y potenciar sus propiedades sensoriales, se ha incorporado diversos aceites esenciales como aceite de tomillo, orégano, romero, comino, te, canela, etc, en carne de pollo, cerdo, pescado y en todos los casos demostraron prolongar la vida útil a través de sus propiedades antibacterianas, antioxidantes y sensoriales (Bhowmik *et al.* 2022).

Otra alternativa, dado que los aceites esenciales son lipofílicos y suponen un gran reto para las aplicaciones en la industria alimentaria, la elaboración de dispersiones coloidales podría

tener interesantes ventajas para la disponibilidad de aceites esenciales en una matriz acuosa alimentaria, al evitar su incompatibilidad en estos sistemas alimentarios (Alves *et al.* 2013). Los organogeles son sistemas semisólidos en los que una red tridimensional está compuesta por gelificantes reticulados y fibras inmovilizadas en un líquido orgánico (aceite esencial).

Según (Carrancá *et al.* 2018) y (Esposito *et al.* 2018), las dispersiones de emulsiones de organogel a partir de hidrocoloides tienen propiedades de estabilidad prometedoras, son de fácil formulación y se pueden producir con organogelificantes naturales, como el quitosano, y podrían darles una gran aplicación para la industria alimentaria como sustitutos de grasas (Zeng *et al.* 2021). La tecnología de organogeles y nanopartículas son sistemas que buscan el aumento de la biodisponibilidad de sustancias lipofílicas, como los aceites esenciales, en sistemas acuosos (Martin *et al.* 2020; Martin *et al.* 2017).

Los organogeles son sistemas semisólidos compuestos por solventes orgánicos, sirven como rellenos de líquidos dentro de redes compuestas por organogelificantes de bajo peso molecular (Li *et al.* 2022). Estas pueden lograr propiedades fisicoquímicas semisólidas, nano/micro estructuras fibrosas entrelazadas, que atrapan una gran variedad de compuestos bioactivos (Główka *et al.* 2014). Además, tienen gran potencial para aplicaciones de suministro de fármacos y procesamiento de alimentos como recubrimientos comestibles anticongelantes y antiincrustantes, debido a la propiedad de preservar el bajo rendimiento de adhesión, incluso en un entorno exterior durante meses Zeng *et al.* (2021).

2.3.1. Incorporación de aceites esenciales en productos cárnicos

Los aceites esenciales son una alternativa para incorporarlos en sistemas alimentarios complejos con el fin de minimizar los cambios sensoriales, mejorar su acción antimicrobiana y contribuir a la mejora de la calidad de los alimentos; a través de la encapsulación con liberación controlada de aceite esencial, incorporación a envases activos, recubrimientos comestibles, combinaciones sinérgicas de diferentes aceites esenciales y la combinación de diferentes métodos de conservación bajo diferentes condiciones (Dutra da Silva *et al.* 2021; Pabast *et al.* 2018).

El marinado se refiere al proceso mediante el cual se incorpora una solución acuosa u oleosa, que puede contener diferentes ingredientes y/o aditivos, con el objetivo de mejorar el sabor, dar suavidad u otro tipo de atributos como color y jugosidad (Dey y Dora 2011).

Permite la conservación de la carne por más tiempo, se mejora ciertos atributos de calidad importantes como mayor blandura, más jugosidad, sabor característico y mayor vida de anaquel (Pabast *et al.* 2018; González *et al.* 2004). Bazargani *et al.* (2015) estudiaron la influencia del jugo de granada y el recubrimiento de quitosano incorporado con el aceite esencial de *Zataria multiflora* en la calidad química y sensorial de la pechuga de pollo, se evaluó el almacenamiento a 18°C y congelado en 18 meses con intervalos de 2 meses, demostrando que los aditivos naturales no solo otorgan atributos sensoriales deseables (color, sabor y textura) a la carne de pollo, sino que también prolonga su vida.

2.3.2. Carne de alpaca (*Vicugna pacos*)

Los camélidos son una importante especie de ganado en América del Sur donde se crían para obtener fibra, carne, piel y se utilizan como animales de carga. Entre las especies de camélidos sudamericanos se encuentra la alpaca (*Vicugna pacos*) (Biffin *et al.* 2019). Según la (FAO 2005) en América del Sur hay 4.5 millones de alpacas. Los camélidos domésticos se limitan principalmente a altitudes más altas de la región andina central, donde su producción se basa casi exclusivamente en la agricultura de subsistencia a pequeña escala y bajo insumo (Mamani y Gallo 2014). Además, son fuente importante de ingresos económicos para el sector pecuario de las poblaciones andinas de Sudamérica, ya que cumplen un rol multipropósito utilizando su carne, fibra, energía de transporte, guano entre otros (Avilés *et al.* 2018, Quispe *et al.* 2009).

Actualmente también se viene desarrollando la crianza de camélidos en Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda, Canadá y otros países (MINIAGRI 2019). En el Perú se puede encontrar dos razas de alpaca, la Huacaya y la Suri con diferencias fenotípicas, pero similitudes por su peso de las crías al nacer y el peso vivo adulto (Fernández 2005).

a. Calidad

La calidad es un concepto complejo ya que existen diferentes ideas sobre la importancia y contenido del término. En el caso de la carne, en un sentido clásico, se ha definido como: “La totalidad de propiedades y características de la misma que afectan su valor nutritivo, su aceptabilidad (propiedades sensoriales), sus características higiénico-sanitarias y las aptitudes para el procesado industrial o preparación culinaria” (Hoffman 1993). Estas vertientes de la calidad vienen dadas por diversos factores: genéticos, fisiológicos, de manejo, los relacionados con el transporte y sacrificio de los animales, así como las

condiciones de transformación de músculo en carne y almacenamiento. Además de la definición clásica, cada vez se da más importancia a la calidad de tipo afectiva o emocional que comprende aspectos como el bienestar animal, la ecología en la producción, el nivel de estatus asociado al consumo, etc. (Cristofanelli *et al.* 2004).

Para productos cárnicos, las alteraciones inducidas por la oxidación de sus propiedades sensoriales incluyen:

- a. La aparición de sabores y olores desagradables (por ejemplo, rancio, olor atípico).
- b. Aumento de la dureza debido a la oxidación de proteínas.
- c. Decoloración causada por la co-oxidación de pigmentos (Bekhit *et al.* 2013).

La oxidación de las proteínas musculares también puede afectar sus funcionalidades, lo que reduce la capacidad de retención de agua, la emulsificación de grasas y la formación de geles (Banović *et al.* 2009). Como resultado, el valor nutricional de la carne impacta negativamente debido a la pérdida de vitaminas antioxidantes, ácidos grasos esenciales (especialmente ácidos grasos poliinsaturados) y aminoácidos esenciales (es decir, lisina, triptófano, etc.) (Ripoll *et al.* 2019).

Smith *et al.* (2015) evidenciaron un estudio de 50 alpacas Huacaya del cual hicieron cuatro tipos de cortes minorista y determinaron que la combinación que contiene más rendimiento de carne vendible es la que considera tapa de cremallera enroscada y tope de pierna es en alpacas machos 24 y 36 meses de edad. Smith *et al.* (2017) estudiaron los parámetros de calidad de 50 alpacas Huacaya de Australia entre 18, 24 y 36 meses, en el cual mencionan que no existe una relación de contenido de grasa intramuscular cuyo contenido oscila 0.56-0.91 por ciento, entre el género y el día de sacrificio y el musculo, pero si con la edad del animal. Además, la carne de alpaca tiene la propiedad de no aumentar el color marrón o disminuir la ligereza cuando está expuesto a la exhibición de minorista, el cual favorece porque este es un indicador de frescura. En general los animales de 24 meses son los más deseables debido al contenido de ácidos grasos y minerales importantes (Salvá *et al.* 2009).

El sacrificio de la alpaca presenta cierta estacionalidad y se realiza en los meses de abril y mayo, la carne de alpaca debido a sus características fisicoquímicas es considerada una carne apta para el consumo humano (Popova *et al.* 2021). Salvá *et al.* (2009) reportaron que el

músculo contiene baja grasa intramuscular 2 por ciento, lo cual es un indicador de calidad en la carne y su relación de PUFA/SFA (n-6/n-3) es mayor en comparación con la carne de res y oveja; lo cual está relacionado con efectos beneficiosos para la salud, además el contenido de vitamina E es bajo. Y dentro de la composición y características tecnológicas de la carne Salvá *et al.* (2009) hicieron el estudio en los músculos de *Longissimus thoracis* y *lumborum* en 20 alpacas de raza Huacaya, en el cual consideran que el rango óptimo de sacrificio es de los 18-24 meses de edad. Se sabe además por estudios realizados por Wood *et al.* (2003), que el perfil lipídico está implicado en la calidad de la carne que puede afectar en su textura, color y valor nutritivo.

b. Composición química de la carne de alpaca

Por otro lado, la carne de alpaca tiene un alto valor proteico en comparación con otros rumiantes, bajo contenido de grasa y colesterol y es considerada una carne ecológica por proceder de animales que pastan en las praderas alto andinas donde se consumen pastos naturales y beben agua limpia filtrada de los deshielos (Madrid 2014; Sánchez 2004). En el cuadro 5 se muestra la composición fisicoquímica del músculo de diferentes rumiantes.

Tabla 5: Composición química del músculo de la llama, bovino, llama, alpaca y ternero

| Características (Porcentaje) | 1 | | 2 | | 3 |
|---------------------------------|-----------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------|
| | Llama (n=31) | Bovino (n=31) | Llama (n=20) | Alpaca (n=40) | Ternero (n=50) |
| Humedad | 73.34±0.75 | 72.72±0.84 | 73.94±1.87 | 73.64±1.66 | 76.0-76.6 |
| Grasa | 1.56±0.67 | 2.27±0.10 | 0.51±0.01 | 0.49±0.01 | 0.60-0.76 |
| Proteína | 23.88±0.77 | 22.46±0.61 | 23.12±0.88 | 23.33±0.69 | 20.1-20.5 |
| Ceniza | 1.21±0.11 | 1.19±0.02 | 2.43±0.25 | 2.54±0.20 | 1.06 |

n=número de muestras

Fuente: ¹ Mamani y Gallo, (2011); ² Cristofanelli *et al.* (2004); ³ Bessong *et al.* (2017)

Po otro lado, las características de fisicoquímicas de la carne de alpaca están relacionadas con su pH con un valor entre (5.6-5.63) (Salvá *et al.* 2009; Cristofanelli *et al.* 2004). Además, el color de la carne de alpaca presenta valores medios de las coordenadas L* (36.17), a* (36.17) y b* (1.16).

c. Marinado de carne de alpaca

Actualmente el consumo de carnes procesadas se ha incrementado por que las personas buscan satisfacer sus necesidades en corto tiempo (Zhang *et al.* 2019). A través del tiempo se han ido innovando algunas presentaciones de derivados de carne como marinados, siguiendo con las exigencias de los consumidores como salud, sostenibilidad, calidad y bienestar. El marinado se refiere al proceso mediante el cual se incorpora una solución acuosa u oleosa, que puede contener diferentes ingredientes y/o aditivos, con el objetivo de mejorar el sabor, dar suavidad u otro tipo de atributos como color y jugosidad (Pabast *et al.* 2018). Además, permite la conservación de la carne por más tiempo, en el cual se mejora ciertos atributos de calidad importantes como mayor blandura, más jugosidad, sabor característico y mayor vida de anaquel (González *et al.* 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes elliptica* Sm. (CHINCHO)

3.1.1. Lugar de estudio

La presente investigación se realizó en los laboratorios de investigación de la de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y el laboratorio de Industrialización de Productos de Origen Animal IPOA de la Universidad Miguel Hernández (UMH) – España.

3.1.2. Materias primas, insumos y reactivos

Se recolectaron manualmente plantas de *Tagetes elliptica* Sm. de su habitat natural de la provincia de Chupaca, Región Junín, Perú (3263 msnm). Para su identificación genética se usaron 15 muestras de la planta siguiendo la metodología de Palomino, (2011) (Anexo 1). La extracción de los aceites esenciales- AE se realizó (1) en las hojas y (2) en la mezcla de las hojas con tallo, ambas por el método de arrastre con vapor de agua (Figura 7). Cinco kg de hojas frescas fueron colocados en el alambique (10L) y luego se introdujo vapor vivo saturado de 2.5 L de agua hirviendo por debajo de la carga. La destilación con vapor dirigido duró aproximadamente 1.5 h, cualquier posible rastro de agua presente en los aceites esenciales se eliminó utilizando sulfato de sodio anhidro (Sigma-Aldrich, Bush, Suiza), luego se almacenó a 4°C hasta su uso en estudios posteriores. El rendimiento del AE por ciento se calculó utilizando la siguiente ecuación (1):

$$\text{Rendimiento del AE (por ciento)} = \frac{\text{masa de AE obtenido (g)}}{\text{masa de materia (g)}} \times 100 \dots \dots (1)$$

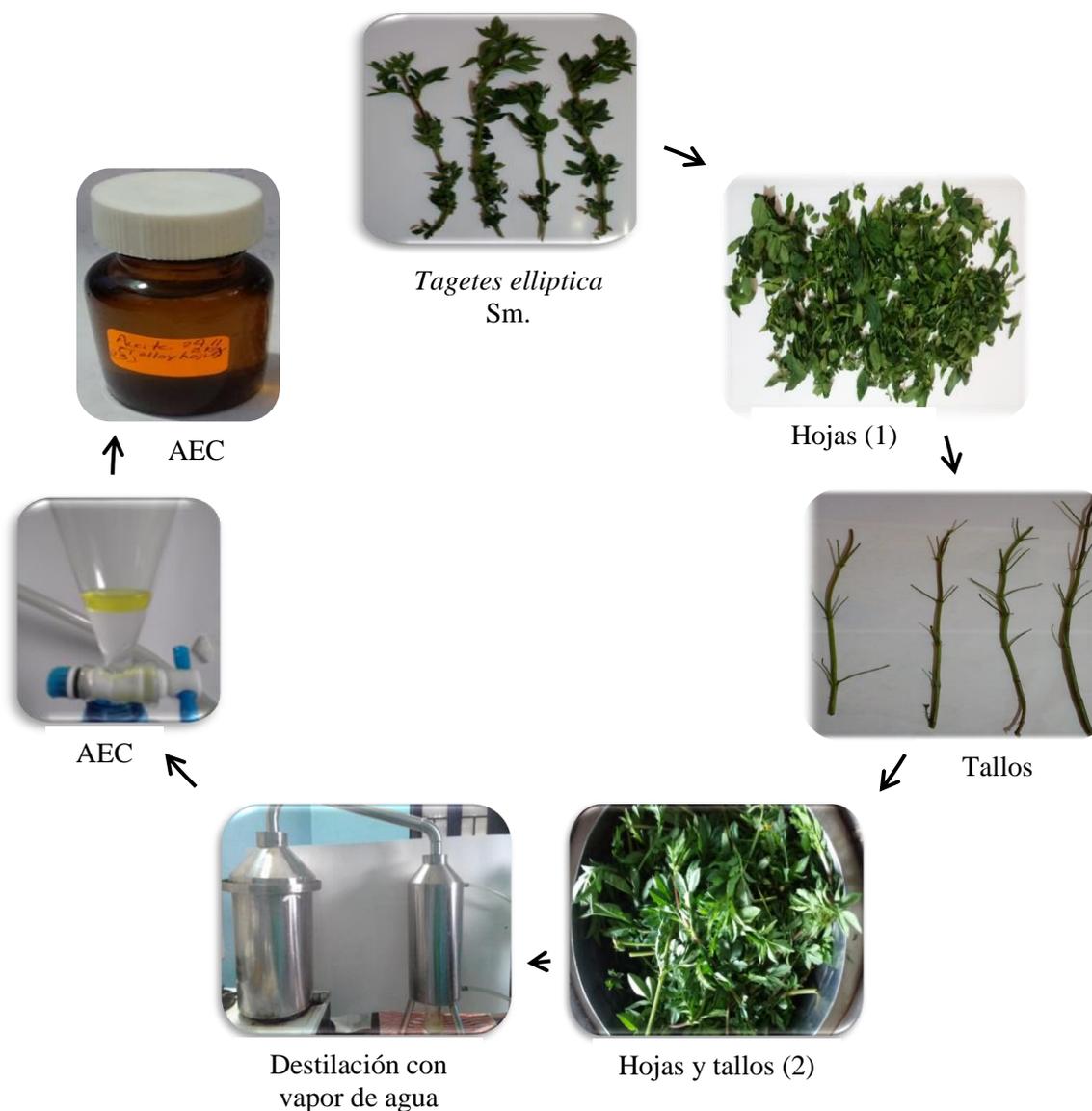


Figura 7: Etapas en la extracción del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Sm

3.1.3. Capacidad antioxidante de *T. elliptica* Sm

La capacidad antioxidante se realizó en el aceite esencial de las hojas y en el aceite esencial de la mezcla de las hojas con tallo de la *T. elliptica* Sm. (chincho).

3.1.3.1. Actividad de barrido de radicales libres DPPH

La actividad de barrido de radicales libres DPPH se determinó por el método sugerido por Brand *et al.* (1995) con una pequeña modificación. En este caso, se mezclaron 2 ml de 6×10^{-5} mol/L, 2-difenil-1 picrilhidrazilo (DPPH) preparado en metanol con 1.0 ml del aceite

esencial de *T. elliptica* Sm. (5 a 100 g/L), BHT y AA (0.005 a 0.1g/L) como antioxidantes de referencia. Las mezclas se agitaron a fondo en vórtex (700 g) durante 1 min y luego se colocaron en un cuarto oscuro. La disminución de la absorbancia a 517 nm se determinó después de 30 min, para todas las muestras, utilizando metanol como blanco. El valor IC₅₀ (concentración de aceite esencial necesaria para eliminar el 50 por ciento de los radicales libres DPPH) se determinó a partir de la curva de calibración de la actividad de eliminación de radicales libres en porcentaje frente a las concentraciones de extracto de aceite. El porcentaje de inhibición (PI) del radical DPPH se calculó según la fórmula de la ecuación (2), donde: A_{muestra} y A_{control} son la absorbancia de la muestra y la absorbancia del control, respectivamente.

$$\text{por ciento Inhibición} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{control}}} \times 100 \dots (2)$$

Los valores de IC₅₀ se calculó gráficamente con el porcentaje de inhibición (PI) frente a la concentración de AEC, para eliminar el 50 por ciento de los radicales libres de DPPH.

3.1.3.2. Ensayo de barrido de radicales 2, 2'-Azinobis (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS)

Se utilizó el método descrito por Olajuyibe *et al.* (2011) con algunas modificaciones para determinar la actividad de barrido ABTS. En primer lugar, se sintetizó el radical catiónico ABTS (ABTS⁺), con las soluciones madre que contenían ABTS 7 mM y persulfato de potasio 2.4 mM, mezclando las dos soluciones en proporciones iguales y dejando reaccionar durante 12-16 h en la oscuridad. A continuación, la solución se diluyó mezclando 1 ml de solución de ABTS⁺ con 100 mL de agua para obtener una absorbancia de 0.70-0.72 unidades a 734 nm utilizando el espectrofotómetro. Se tomaron 900 µL de solución ABTS⁺ y 10 µL de cada extracto de aceite esencial *T. elliptica* Sm. (5 a 100 g/L), se mezcló y se midió la absorbancia después de 6 min con el espectrofotómetro, para todas las muestras, utilizando metanol como blanco. El ABTS⁺ del extracto se comparó con el de los antioxidantes de referencia de BHT y AA (0.3125-6.250 g/L). El PI y el IC₅₀ del radical ABTS se calcularon con la misma ecuación descrita en el ensayo DPPH.

3.1.3.3. Poder antioxidante reductor férrico (FRAP)

La capacidad del extracto de aceite ensayado para reducir los iones férricos se evaluó mediante el método desarrollado por Oyaizu *et al.* (1986) con pequeñas modificaciones. Se mezcló 1 mL de cada extracto de aceite (0.3125-5 g/L) con 2.5 mL de tampón fosfato (0.2 M, pH 6.6) y 2.5 mL de ferricianuro potásico al uno por ciento (p/v). Las mezclas se incubaron a 50°C durante 20 min y se añadieron 2.5 mL de ácido tricloroacético al 10 por ciento (p/v) (se agitó durante 2 min). A continuación, se tomó una alícuota de 2.5 mL y se mezcló con 2.5 mL de agua destilada y 0.5 mL de cloruro férrico al 0.1 por ciento (p/v) (se dejó reposar durante 10 min).

La absorbancia de la mezcla se midió con un espectrofotómetro monohaz a 700 nm frente al blanco (sustituyendo la muestra por agua), después de dejar reposar la solución durante 30 minutos. Los valores de FRAC se expresaron en términos de capacidad antioxidante equivalente de Trolox (TEAC) en mM de Trolox/L. El ensayo se realizó por triplicado y los resultados se expresan como valores medios \pm desviaciones estándar. El poder reductor de los extractos se compara con el AA y el BHT (antioxidantes de referencia) (0.0625-5 g/L).

3.1.3.4. Capacidad quelante de iones ferrosos (FIC)

El ensayo FIC se llevó a cabo según el método de Singh y Rajini, (2004) con algunas modificaciones. Se preparó soluciones de 2mM $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 5mM ferrozina. Brevemente, se mezcló una solución (1 mL) de diferentes concentraciones de antioxidantes (1.25 -25 g/L) con 1 mL de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$. Tras cinco min de incubación, se inició la reacción añadiendo ferrozina (1 mL). La mezcla se agitó enérgicamente y, tras otros 10 min de incubación, se midió espectrofotométricamente la absorbancia de la solución a 562 nm. Se comparó con EDTA (antioxidante de referencia) (0.005-0.1 g/L). El porcentaje de inhibición de la formación del complejo ferrozina- Fe_2^+ se calculó mediante la ecuación (3), donde: A_{blanco} = absorbancia de la muestra de control y A_{muestra} = absorbancia de la muestra analizada.

$$\text{Efecto quelante (por ciento)} = \frac{(1 - A_{\text{muestra}})}{A_{\text{blanco}}} \times 100 \dots (3)$$

Los valores de EC_{50} se calculó gráficamente con el porcentaje de inhibición (PI) frente a la concentración de AEC en el sistema de reacción.

3.1.3.5. Ensayo Rancimat

Para determinar la actividad antioxidante lipídica de los aceites esenciales de *T. elliptica* Sm. se siguió el método de Tinello *et al.* (2018) y Viuda *et al.* (2010), con algunas modificaciones. En el cual se utilizó el método Rancimat 743 (Methrohm. Suiza), este método funciona según el siguiente principio. Se añadió una solución (100 µL) de diferentes concentraciones de AE (100, 80, 50, 20, 10 y 5 g/L) a la manteca de cerdo (2.5 g), previamente derretida, dando una concentración final de 0.4 por ciento, 0.32 por ciento, 0.08 por ciento, 0.04 por ciento y 0.02 por ciento de AE en el sistema reaccionante. Se comparó con BHT y AA (antioxidantes de referencia). La manteca de cerdo con y sin antioxidante añadido se calentó a 120°C y se insufló constantemente en la mezcla un flujo de aire de 20 L/h. El final del periodo de inducción se caracterizó por el aumento repentino de la conductividad del agua debido a la disociación de los ácidos carboxílicos volátiles (Laubli *et al.* 1986) El índice de actividad antioxidante (IAA) se calculó a partir de los tiempos de inducción medidos, según la ecuación (4) de (Forster *et al.* 2001).

$$IAA = \frac{\text{periodo de inducción de la manteca de cerdo con antioxidante}}{\text{periodo de inducción de la manteca de cerdo pura}} \dots (4)$$

Índice de actividad antioxidante >1 indica la inhibición de la oxidación lipídica; cuanto mayor sea el valor mejor será la actividad antioxidante (Lalas *et al.* 2003).

3.1.4. Identificación de los componentes del aceite por cromatografía de gases GC-MS

El análisis de los componentes del aceite esencial de las hojas de la *T. elliptica* Sm. se realizó mediante cromatografía de gases acoplado junto con la espectrometría de masas. El AEC se extrajo de acuerdo con el procedimiento enumerado en el apartado 3.1.2. Veinte µL de la muestra de aceite se diluyeron con 1 µL de diclorometano de grado GC. A continuación, se inyectó en el sistema 1 µL del aceite diluido mediante un inyector automático. Los análisis GC/MS se realizaron utilizando un aparato Agilent Technologies 5975C con una columna DB-5ms (60 m x 250 µm, 0.25 µm de espesor de película) interconectada con un detector de masas cuadrupolar. La temperatura del horno se mantuvo a 40°C (5 min), 40°C-180°C, 2.5°C / min hasta 200°C (2 min); y finalmente 2.5°C hasta 300°C (5min) temperatura del inyector 300°C; split ratio, 1:20; gas portador Helio a 1.0 ml/min. La identificación de los componentes individuales se determinó con otros datos de masas espectrales de masas publicados (Adams 2007). Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

3.1.5. Actividad antimicrobiana

3.1.5.1. Método de difusión en pocillos de agar

La actividad antibacteriana de los aceites esenciales solo de las hojas de la *T. elliptica* Sm. se evaluó mediante el método de difusión en pocillos NCCLS (1997). Las cepas bacterianas de prueba utilizados fueron *Staphylococcus aureus* ATCC 25923TM, *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Salmonella infantis*. Las cepas bacterianas se cultivaron durante toda la noche en caldo nutritivo a 37 °C hasta obtener una suspensión de 1.0×10^6 UFC mL⁻¹.

El inóculo bacteriano se extendió uniformemente con un bastoncillo de algodón estéril sobre placas de agar Mueller Hinton. Se perforó asépticamente un agujero de 6 mm de diámetro en la superficie del agar con una punta estéril y se introdujeron 40 µL del aceite esencial en cada pocillo. Como control positivo se utilizó DMSO. Después de incubarlas durante 24 h a 37 °C, se examinaron todas las placas en busca de zonas de inhibición del crecimiento y los diámetros de estas zonas se midieron en milímetros. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

3.1.6. Esquema experimental

En la Figura 8, se muestra el esquema experimental de la Etapa I.

3.1.7. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron en tres réplicas y los datos se presentaron como media \pm desviación estándar de determinaciones por triplicado. Los datos sobre las actividades antioxidante y antibacteriana se analizaron mediante el procedimiento univariante GML (General Lineal Model). Para la comparación entre medias se utilizó la prueba post hoc de Tukey ($p < 0.05$). La actividad antioxidante se estudió mediante la prueba ANOVA con un factor (concentración: 100, 80, 50, 20, 10 y 5 g/L). Para la actividad antibacteriana se aplicó un ANOVA con el factor volumen de aceite en la concentración (40, 20, 10 y 5 µL). Todas las determinaciones se realizaron con el programa informático SPSS® IBM® Statistics 22.0.0.0. (International Business Machines Corp. Armonk. Nueva York. EE.UU.).

ETAPA I

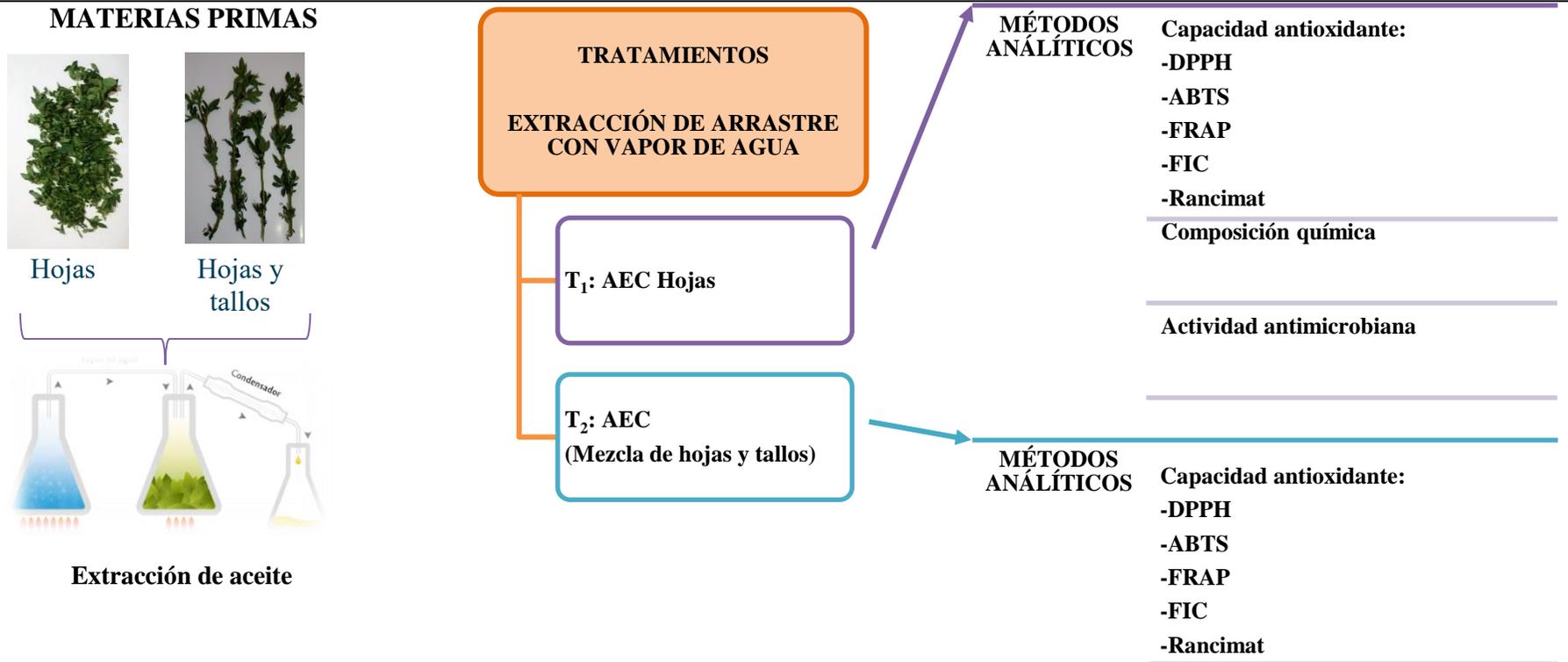


Figura 8: Esquema experimental de la ETAPA I – Caracterización del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Sm

3.2. OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CHINCHO POR DISEÑO BOX-BEHNKEN

3.2.1. Lugar de estudio

La presente investigación se realizó en los laboratorios de investigación de la de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) y el laboratorio de Investigación de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Nacional del Centro del Perú (UNCP).

3.2.2. Materias primas, insumos y reactivos

El aceite esencial de chincho (AEC) de las hojas se obtuvo como se indica en la sección 3.1.2.; el quitosano (QS) (quitina desacetilada de alto peso molecular, PolyCD-glucosamina), Tween 80, hidróxido de sodio y TPP se adquirieron de Sigma-Aldrich (Burlington, MA, EE. UU.). También se utilizaron Acetato de Sodio Anhidro ACS (Fermont, Canadá), Fosfato de Potasio Monobásico (Panreac, Barcelona, España) y Fosfato de Hidrógeno disódico anhidro más puro (Panreac, Barcelona, España). Las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923TM, *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Salmonella infantis* se obtuvieron de La Molina Calidad Total y Laboratorios de Microbiología de Alimentos (Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú). El metanol y el ácido acético (glacial) se adquirieron de Merck (Darmstadt, Alemania).

3.2.3. Diseño experimental usando Box-Benhken (DBB)

Para obtener nanopartículas de aceite esencial de chincho, la MSR construyó y fabricó una matriz de 17 formulaciones. Se utilizó Design Expert (software Design Expert® versión 13, State Ease Incorporation, Minneapolis, MN, EE. UU.) para optimizar la formulación utilizando un diseño de Box-Behnken (DBB) mediante la construcción de tres factores y tres niveles, como se muestra en la Tabla 6 y con cinco puntos centrales (Tabla 7). Así, se aplicó DBB utilizando la solución de quitosano (QS) pH (4.0, 4.4, 4.8); la relación de masa de QS/AEC (1:0.7, 1:0.85, 1:1.0); y la relación de masa de QS/TPP (1:0.46, 1:0.58, 1:0.7) como variables independientes. Asimismo, se evaluaron las dos variables dependientes de la formulación: (1) el porcentaje de eficiencia de encapsulación (EE) y (2) el porcentaje de

capacidad de carga (CC) de las AEC -QSNP.

En este estudio, los factores que representan las variables independientes seleccionadas fueron X_1 (pH de la solución de QS), X_2 (relación de masa QS/AEC) y X_3 (relación de masa QS/TPP), respectivamente. Se evaluó la influencia de los factores anteriores sobre las respuestas Y_1 (porcentaje de eficiencia de encapsulación) e Y_2 (porcentaje de capacidad de carga), de la elaboración de nanopartículas de AEC. El análisis estadístico de los valores obtenidos podría determinarse mediante la prueba de análisis de varianza (ANOVA). La interacción de las variables independientes y las respuestas se determinó utilizando el siguiente modelo matemático cuadrático, donde Y representa la respuesta detectada (Ecuación 5):

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{1,2}X_1X_2 + b_{1,3}X_1X_3 + b_{2,3}X_2X_3 + b_{1,1}X_1^2 + b_{2,2}X_2^2 + b_{3,3}X_3^2 \dots \quad (5)$$

Tabla 6: Variables independientes y dependientes del diseño Box-Behnken de 3 niveles y 3 factores

| Variable Independiente | Niveles Codificados | | |
|--|---------------------|-------------|------------|
| | Nivel bajo | Nivel medio | Nivel alto |
| | -1 | 0 | 1 |
| X_1 : pH | 4.0 | 4.4 | 4.8 |
| X_2 : Quitosano: Aceite esencial de chincho-QS: AEC (p/v) | 1:0.7 | 1:0.85 | 1:1 |
| X_3 : Quitosano: Tripolifosfato de sodio (TPP) – QS: TPP (p/p) | 1:0.46 | 1:0.58 | 1:0.7 |
| Variables Dependientes | Criterio | | |
| Y_1 : Eficiencia de encapsulación EE (por ciento) | Maximo | | |
| Y_2 : Capacidad de carga CC (por ciento) | Maximo | | |

X_1 =pH de solución de QS, X_2 = QS: AEC (p/v), X_3 =QS: TPP (p/p), Y_1 = Eficiencia de encapsulación EE (por ciento), Y_2 = Capacidad de carga CC (por ciento)

La formulación optimizada de nanopartículas de aceite esencial de chincho se seleccionó sobre la base de la deseabilidad del factor sobre las respuestas y se optimizó estas variables a través del software Desing Expert (Anexo 2). La Tabla 7 indica el diseño experimental con los 17 tratamientos para la optimización del nanoencapsulado del AEC.

Tabla 7: Condiciones del diseño experimental para optimización de nanopartículas del (AEC) mediante el método de gelificación iónica

| Experimentos | Variables independientes | | | Variables independientes | | |
|--------------|--------------------------|---------|---------|--------------------------|---------|---------|
| | pH | QS: AEC | QS: TPP | pH | QS: AEC | QS: TPP |
| 1 | 1 | 1 | 0 | 4.80 | 1:1 | 1:0.58 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 4.40 | 1:0.85 | 1:0.58 |
| 3 | -1 | 0 | -1 | 4.00 | 1:0.85 | 1:0.46 |
| 4 | 1 | 0 | -1 | 4.80 | 1:0.85 | 1:0.46 |
| 5 | -1 | 0 | 1 | 4.00 | 1:0.85 | 1:0.7 |
| 6 | 0 | -1 | 1 | 4.40 | 1:0.7 | 1:0.7 |
| 7 | 0 | -1 | -1 | 4.40 | 1:0.7 | 1:0.46 |
| 8 | 0 | 1 | 1 | 4.40 | 1:1 | 1:0.7 |
| 9 | 0 | 0 | 0 | 4.40 | 1:0.85 | 1:0.58 |
| 10 | -1 | 1 | 0 | 4.00 | 1:1 | 1:0.58 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 4.40 | 1:0.85 | 1:0.58 |
| 12 | 0 | 1 | -1 | 4.40 | 1:0.1 | 1:0.46 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 4.40 | 1:0.85 | 1:0.58 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 4.40 | 1:0.85 | 1:0.58 |
| 15 | -1 | -1 | 0 | 4.00 | 1:0.7 | 1:0.58 |
| 16 | 1 | -1 | 0 | 4.80 | 1:0.7 | 1:0.58 |
| 17 | 1 | 0 | 1 | 4.80 | 1:0.85 | 1:0.7 |

*QS=Quitosano, TPP=Tripolifosfato de sodio

3.2.4. Preparación de AEC-QSNP por gelificación iónica

Para elaborar las nanopartículas de quitosano cargadas con aceite esencial de chincho (AEC-QSNP). Se utilizó la metodología de gelificación iónica basada en las recomendaciones reportadas por Zhang *et al.* (2019). Se aplicó un proceso de dos pasos. La primera fase fue la emulsificación de aceite en agua (AE/agua) y la segunda fue la gelificación iónica. La solución de quitosano (QS) (3.2 mg/mL) se preparó disolviendo una solución de ácido acético (1 por ciento (v / v)) utilizando un agitador magnético a 60 °C durante 60 min. Luego, la solución de QS se filtró a través de un filtro de tamaño de poro de 1 µm para eliminar cualquier solución de quitosano no disuelto.

Una vez disuelto, todas las soluciones de quitosano se dividieron en tres volúmenes iguales y el pH de las soluciones se ajustó a pH: 4.0; 4.4 y 4.8. Se utilizó Tween-80 (1.6 mg/mL) como agente tensioactivo y las soluciones se agitaron durante 30 min a 18 ° C hasta obtener

una mezcla homogénea. Se disolvieron tres volúmenes diferentes de aceite esencial de chincho (126.65; 153.8; 180.95 μL) en etanol (4 mL) para obtener relaciones ponderales de QS: AEC de 1:0.7; 1:0.85 y 1:1 (mg/mL), respectivamente, formando la fase oleosa de la emulsión. Después de enfriar, la fase oleosa se vertió progresivamente en la fase acuosa con agitación vigorosa y se continuó agitando durante 20 min.

Después, se usaron tres volúmenes diferentes de 30 mL de la solución de TPP para obtener una relación en peso de QS: TPP de 1:0.46; 1:0.58 y 1:0.7 (mg/mL) y se agregaron a la solución, la cual se mezcló durante 25 min usando un agitador magnético. Para garantizar la gelificación completa, se continuó mezclando durante 45 min después de la adición completa del tripolifosfato. Las NP elaboradas se recolectaron por centrifugación durante 30 min a 4427 g a 20 °C y se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

3.2.4.1. Determinación de la eficiencia de encapsulación (EE) y la capacidad de carga (CC)

Para determinar el porcentaje de la eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC), se determinó el AEC encapsulado por espectrofotometría UV-Vis. Se dispersaron cantidades predeterminadas de AEC-QSNP en 3 mL de metanol y se centrifugaron a 6000 rpm durante 15 min a 18 °C del medio acuoso que contenía aceite no asociado, siguiendo las recomendaciones de Natrajan *et al.* (2015).

AEC presente en el sobrenadante se determinó mediante espectrofotómetro UV7 (Mettler Toledo, Barcelona, España) a una longitud de onda de 230 nm (Keawchaon y Yoksan 2011). La concentración de AEC se determinó mediante una curva de calibración adecuada de AEC puro y AEC en metanol con un R^2 de 0.9909 para el AEC (Anexo 3). Las nanopartículas de quitosano se trataron de la misma manera y se usaron como blanco. Se registraron muestras por triplicado para cada lote. El porcentaje de eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC) se estimaron a partir de las ecuaciones (6) y (7) respectivamente.

$$\text{Porcentaje de EE} = \frac{(\text{Cantidad total de AE cargado})}{\text{Cantidad inicial de AE}} \times 100 \dots (6)$$

$$\text{porcentaje de CC} = \frac{(\text{Cantidad total de AE cargado})}{\text{Peso de la muestra inicial}} \times 100 \dots (7)$$

3.2.5. Caracterización de formulaciones optimizadas de QS-NP cargada con aceite esencial de Chincho (*Tagetes elliptica* Sm.)

3.2.5.1. Tamaño de partícula, potencial Zeta e Índice de polidispersión

Se utilizó la dispersión de luz dinámica (DLS) en el 90 Plus/Bi-MAS (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, EE). Para determinar el tamaño medio de las partículas (promedio Z), el índice de polidispersidad y el potencial Zeta las CEO-CSNPs estaban en estado hidratado. Para producir un promedio, se midió la dispersión de la luz por triplicado en un ángulo de 90 grados y a 25 °C.

En el 90 Plus/Bi-MAS, el potencial Zeta se evaluó mediante un enfoque de dispersión electroforética de la luz. Las muestras de AEC-QSNP se diluyeron con cloruro de potasio 1 mM antes de colocarlas en la celda electroforética. La media de datos de movilidad electroforética se utilizó para determinar los valores de potencial Zeta (Tefas *et al.* 2015), con ligeras modificaciones. Todas las mediciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar (DE).

3.2.5.2. Identificación de los componentes del nanoencapsulado del aceite esencial de chincho por cromatografía de gases (GC-MS)

Se realizó la misma metodología de la sección 3.1.4.

3.2.5.3. Morfología de partículas

La morfología optimizada de los AEC-QSNP se determinó utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) (Hitachi High-Tech, SU8230, Hitachi High-Technologies Corporation, Tokio, Japón). Antes del análisis, las AEO-QSNP optimizados se liofilizaron utilizando un liofilizador Lyovapor L-200 (Buchi Iberica, Barcelona, España). Las nanopartículas liofilizadas se ensamblaron en trozos de aluminio sostenidos por cinta adhesiva de carbón. Se utilizó SEM, para visualizar la morfología de las AEC-QSNP bajo alto vacío a 10 kV de voltaje acelerado (Nawaz *et al.* 2022).

3.2.5.4. Análisis de Espectrofotometría Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Los espectros de infrarrojo medio (MIR) del aceite esencial de chincho y nanopartículas con quitosano se registraron en un espectrómetro (Thermo Nicolet IS10) y un módulo de muestreo ATR de reflectancia total atenuada de diamante platino de reflexión única en las siguientes condiciones: rango de adquisición de 4000-650 cm^{-1} , con una sensibilidad > 0.5 por ciento, número de escaneos de muestra 130, resolución. Los espectros de fondo de aire para las muestras se adquirieron antes de cada análisis en una superficie ATR limpia, usando las mismas condiciones FTIR (Medina *et al.* 2019). Se usaron aproximadamente 10 mg de aceite o cristales complejos para el análisis. La placa ATR se limpió y secó después de cada medición de muestra. Se utilizó el software Thermo Scientific OMNIC FTIR para la adquisición y manejo de datos FTIR.

3.2.5.5. Estudio de liberación *in vitro*

Las propiedades de liberación de AEC a partir de nanopartículas de quitosano se determinaron utilizando dos soluciones tampón a pH = 3 (tampón de acetato) y pH = 7 (tampón de fosfato). Las dispersiones de muestra (500 μL) se centrifugaron a $2350 \times g$ durante 8 min a 18 °C. Se eliminó el agua y se añadió la solución tampón (3 mL) a un tubo de centrifuga que contenía nanopartículas. La mezcla se agitó (1 min en vórtex) y se incubó a 22°C durante 6 h. En diferentes intervalos de tiempo de incubación (1 h), las muestras se centrifugaron a $2350 \times g$ durante 8 min a 18 °C, luego se tomó un volumen específico de sobrenadante para el análisis y se reemplazó con un volumen igual de tampón nuevo. La cantidad de AEC liberada en el sobrenadante, se analizó mediante un espectrofotómetro en longitudes de onda de 230 nm, siguiendo las recomendaciones de Keawchaoon y Yoksan (2011).

3.2.5.6. Actividad antimicrobiana

Se utilizó el método de microdilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) siguiendo la metodología descrita por Alves *et al.* (2013). Se utilizaron como microorganismos de prueba tres cepas de bacterias, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923TM, *Escherichia coli* ATCC 25922TM y *Salmonella infantis*. Todas las cepas de bacterias se cultivaron durante 24 h a 37 °C en caldo Mueller Hinton (MHB).

La concentración de las suspensiones de cultivo se ajustó a 10^6 UFC/mL en comparación con la turbidez de McFarland. Se realizaron diluciones dobles en serie y luego se inocularon suspensiones bacterianas (100 μ L) en la serie de muestras.

Después de la incubación a 37 °C durante 24 h, se determinó la MIC como la concentración de la muestra en el tubo sin turbidez y que contenía la concentración de muestra más baja. Se usaron nanopartículas de quitosano como control positivo, mientras que el control en blanco solo tenía MHB e inóculo bacteriano. Las pruebas se realizaron por triplicado para cada muestra.

3.2.6. Esquema experimental

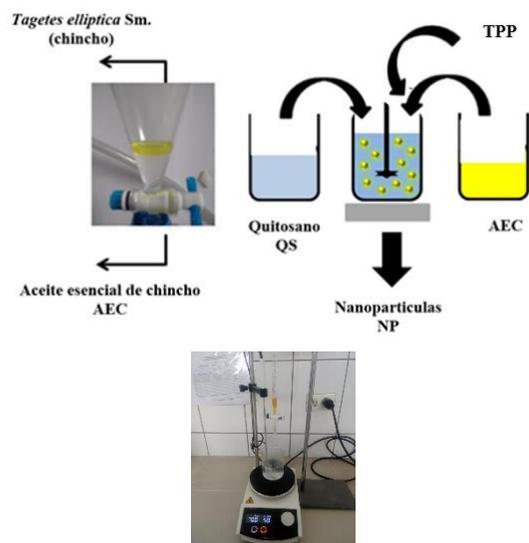
En la Figura 9, se muestra el esquema experimental de la Etapa II.

3.2.7. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico y los datos se expresan como media \pm SD de tres observaciones separadas. Los datos del diseño experimental de Box-Behnken se analizaron mediante la metodología de regresión múltiple de mínimos cuadrados para ajustar los modelos polinómicos en la optimización de AEC-QSNP. El análisis de datos y las superficies de respuesta se realizaron utilizando el software original Design Expert (software Design Expert ® versión 13, State Ease Incorporation, Minneapolis, MN, EE. UU.), con número de serie 9567-6841-7448-EVAL.

ETAPA II

MATERIAS PRIMAS



Optimización de nanopartículas de las hojas del AEC

| Factores | Niveles | | |
|-------------------------------|---------|--------|-------|
| | -1 | 0 | 1 |
| X ₁ : pH | 4.0 | 4.4 | 4.8 |
| X ₂ : QS/AEC (p/v) | 1:0.7 | 1:0.85 | 1:1 |
| X ₃ : QS/TPP (p/p) | 1:0.46 | 1:0.58 | 1:0.7 |

Número de factores experimentales: 3

Número de niveles: 3

Número de respuestas: 2 (porcentaje de EE y porcentaje de CC)

Número de corridas: 17

QS: Quitosano

TPP: Tripolifosfato de sodio

MÉTODOS ANÁLÍTICOS

Porcentaje de eficiencia de encapsulación-EE

Porcentaje de capacidad de carga-CC

Caracterización de nanopartículas optimizadas:

-Tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersión

-Composición química

-SEM

-FTIR

-Estudios de liberación

-Actividad antimicrobiana

Figura 9: Esquema experimental de la ETAPA II – Optimización del aceite de hojas de *Tagetes elliptica* Sm. y su incorporación en filetes de carne de alpaca

3.3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA, FÍSICA Y FISICOQUÍMICA DEL MÚSCULO *SEMIMEMBRANOSUS* DE LA CARNE DE ALPACA (*Vicugna pacos*)

El lugar de estudio fue el mencionado en la sección 3.2.1. y se usaron las materias primas, insumos y reactivos de la sección 3.2.2. Además, se utilizó piernitas de carne de alpaca de 18-24 meses de edad, fueron adquirida a un proveedor local de carnicería (Junín, Perú).

3.3.1. Composición proximal

Los contenidos de humedad, proteína (utilizando $N \times 6.25$ como factor de conversión), grasa y ceniza se determinaron de acuerdo con los métodos oficiales de la Asociación de Químicos Agrícolas Oficiales AOAC (2000).

3.3.1.1. Color

El color de los filetes de carne de alpaca se evaluó utilizando el espacio de color CIELAB (D_{65} como iluminante y 10° como observador estándar) y las coordenadas de color $L^*a^*b^*$ (L^* , a^* y b^* representan la luminosidad, color rojo/verde, y color amarillo/azul, respectivamente). Las muestras se midieron usando un colorímetro Minolta CM-700 (Minolta Camera Co., Osaka, Japón) usando el modo SCI (Componente espectacular incluido) y un cristal de baja reflectancia colocado en la superficie de la muestra y el equipo. Se aplicaron las directrices de AMSA para la evaluación del color (Sánchez *et al.* 2016; AMSA 2012). Las magnitudes psicofísicas tonalidad (H^*) y croma (C^*) de los filetes de carne de alpaca se calcularon utilizando las ecuaciones (8) y (9), respectivamente.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (8)$$

$$H^* = \arctang\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (9)$$

Las diferencias de color total (ΔE^*) de cada muestra con recubrimiento con respecto a la muestra control se calcularon con la Ecuación (10).

$$\Delta E = \sqrt{(L_s^* - L_c^*)^2 + (a_s^* - a_c^*)^2 + (b_s^* - b_c^*)^2} \quad (10)$$

3.3.1.2. pH

La medición del pH de las muestras se realizó según la metodología establecida por la Norma Técnica Peruana. Se pesó 10 g de muestra en papel aluminio, la muestra pesada se colocó en una licuadora y se añadió 100 ml de agua destilada, se licuó por 1 minuto y se filtró. En el filtrado se midió el pH (Norma Técnica peruana 2015).

3.3.1.3. Capacidad de retención de agua

Se utilizó la metodología de Manzilla (2000) donde los filetes de carne de alpaca se cocinaron en un baño maría a 80°C hasta que el centro del filete control alcance los 70°C. Una vez alcanzada la temperatura, se retiraron los filetes del baño maría y se dejaron enfriar a temperatura ambiente hasta una temperatura de 20°C y se procedieron a pesar. Se expresaron como pérdida de peso por cocción, equivalente a vapor de agua. Se utilizó la ecuación 11.

$$CRA = \frac{(\text{Peso del filete de carne cruda} - \text{Peso del filete de carne cocida})}{\text{Peso del filete de carne cruda}} \times 100 \dots (11)$$

3.3.2. Incorporación de las nanopartículas del quitosano cargadas con aceite esencial de *T. elliptica* Sm. en carne de alpaca

3.3.2.1. Preparación de la solución del recubrimiento para carne de alpaca

Se utilizó la metodología de Zhang *et al.* (2019), se preparó la solución con quitosano al 2 por ciento (p/v) disolviendo 2 g en 100 mL de ácido acético al 1 por ciento (p/v) y se agitó constantemente por 4 h a 60°C. Se filtró la solución con quitosano con papel filtro Whatman N°3 para eliminar las partículas insolubles. A la solución filtrada se añadió 0.5 g de glicerol/g de quitosano y 0.1 por ciento (v/v) de Tween 60. Y se agitó de forma constante por 1.5 h. Luego, se incorporaron las nanopartículas con aceite esencial de chincho (AEC-QSNP), a un nivel de 1 por ciento (v/v) y se agitaron a 800 rpm a temperatura ambiente por 1 h. Se obtuvo la solución para recubrir los filetes de carne de alpaca.

3.3.2.2. Preparación e inmersión de filetes de carne de alpaca marinados en la solución de recubrimiento con (AEC-QSNPs)

Se siguió la metodología de Zhang *et al.* (2019), con algunas modificaciones. Para la

inmersión se cortaron filetes de pierna de alpaca de aproximadamente 100 g (10x5x2 cm). Se elaboró una solución de marinado como se indica en la sección 3.3.2.1., en el cual se introdujeron los filetes a la solución de marinado en la proporción de 100: 35 (p/p) en bandejas de acero inoxidable. Después de la inmersión por 3 h se escurrió el líquido del marinado y se dejaron secar los filetes por 30 min en un ambiente desinfectado. Luego de la inmersión, se escurrió el exceso de la solución de recubrimiento, dejando secar sobre rejillas de acero inoxidable a 18°C por 15 min. El proceso de recubrimiento se repitió una vez más.

3.3.2.3. Análisis fisicoquímicos en el marinado de carne de alpaca

a. pH

Las muestras de filete de carne de alpaca (10 g) de cada grupo se trituraron y homogeneizaron con 100 mL de agua destilada. Luego, el homogeneizado de cada muestra se midió con un medidor de pH digital PHS-3C (INESA Scientific Instrument Co., Ltd., Shanghái, China) a 18 ± 1 °C tres veces (Kang *et al.* 2019).

b. Color

Se aplicó la misma metodología de la sección 3.3.1.1

3.3.2.4. Esquema experimental

En la Figura 10, se muestra el esquema experimental de la Etapa III.

3.3.2.5. Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico y los datos se expresan como media \pm SD de tres observaciones separadas. Los datos sobre las características fisicoquímicas de la carne de alpaca (pH y color) se analizaron mediante el procedimiento univariante GML (General Lineal Model) ($p < 0.05$). Para la comparación entre medias se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey ($p < 0.05$). El pH y color se estudiaron mediante la prueba ANOVA con un factor (Tratamientos: Sin recubrimiento, QS, AEC-QS y AEC-QSNP). Todas las determinaciones se realizaron con el programa informático SPSS® IBM® Statistics 22.0.0.0. (International Business Machines Corp. Armonk. Nueva York. EE.UU.).

ETAPA III

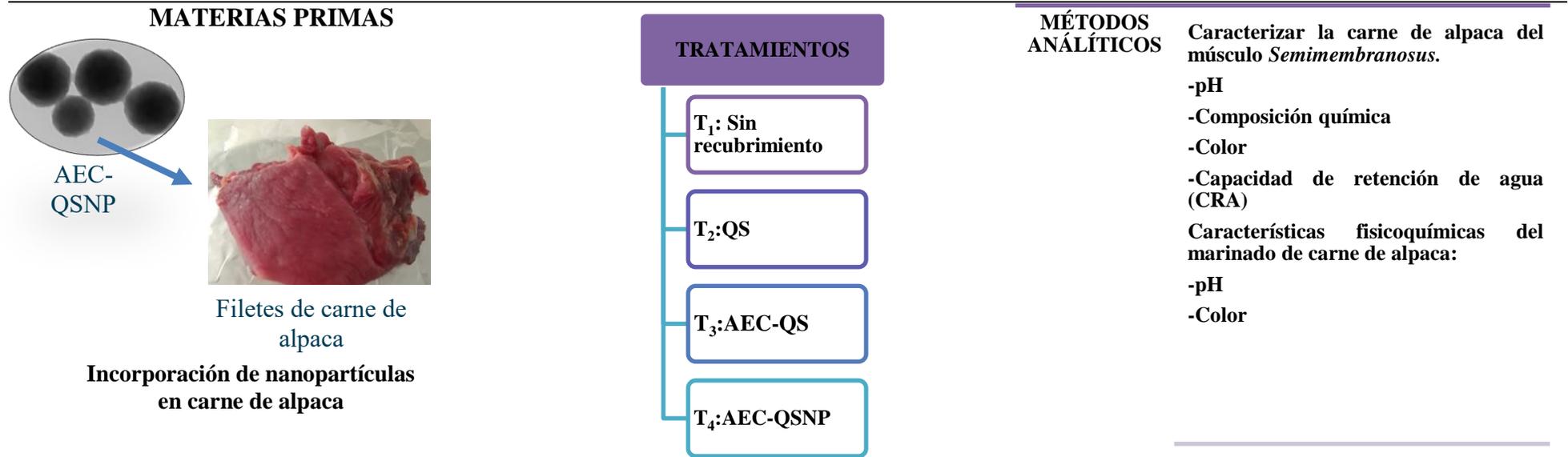


Figura 10: Esquema experimental de la ETAPA II – Optimización del aceite de hojas de *Tagetes elliptica* Sm. y su incorporación en filetes de carne de alpaca

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA, CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Tagetes elliptica* Sm. (CHINCHO)

4.1.1. Extracción del aceite esencial de las hojas y de la mezcla de hojas y tallos de *T. elliptica* Sm

El aceite esencial de las hojas y de la mezcla de hojas con tallo de *T. elliptica* Sm. fue de color amarillo claro brillante con olor intenso y agradable. El rendimiento del aceite esencial registrado de las hojas fue de $(0.23 \pm 0.02$ por ciento p/p) (porcentaje peso a peso) y de la mezcla de las hojas con tallo fue de $(0.15 \pm 0.01$ por ciento p/p) (porcentaje peso a peso), éste difiere en las hojas y hojas con tallo debido a las variaciones fisiológicas de la planta (De La Torre *et al.* 2017) (Tabla 8).

Tabla 8: Rendimiento de aceite de hojas y de la mezcla de hojas con tallo del (AEC)

| | Peso hojas (g) | Aceite (mL) | Densidad (g/mL) | Masa (g) | *n | Porcentaje n |
|---------------|-------------------|----------------|--------------------|-------------|--------|-----------------|
| Hojas | 13720 | 34.93 | 0.8842 | 30.89 | 0.0023 | 0.23 ± 0.02 |
| Hojas y tallo | 2000 | 3.4 | 0.8842 | 3.01 | 0.0015 | 0.15 ± 0.01 |

*n: Rendimiento

4.1.2. Capacidad antioxidante del aceite esencial de hojas de *T. elliptica* Sm

4.1.2.1. Actividad de barrido de radicales libres (DPPH)

El DPPH es un radical libre estable con una absorción característica a 517 nm y reacciona con un compuesto antioxidante que puede donar hidrógeno al DPPH y convertirlo en un producto más estable (Brand *et al.* 1995). Esta reacción ha causado un cambio de color de púrpura intenso a dorado o amarillo claro en las muestras de mayor concentración.

En este estudio, la actividad antioxidante en el aceite esencial de *T. elliptica* Sm. se probó

en el ensayo de eliminación de radicales DPPH a diferentes concentraciones y sus controles positivos BHT y AA se muestran en la Tabla 9. El AE de *T. elliptica* Sm. mostró el ($p < 0.05$) efecto de eliminación de radicales (87.63 ± 0.57) a 100 g/L, y los controles positivos, BHT y AA (33.21 ± 2.59 y 96.33 ± 0.13), IC_{50} del AE de *T. elliptica* Sm, BHT y AA contra DPPH se calcularon como 53.37 ± 1.43 g/L, 0.17 ± 0.01 g/L y 0.02 ± 0.00 g/L respectivamente (los controles se diluyeron 1.000 veces la concentración inicial). Por otro lado, estudios reportan que la especie de la *T. minuta*, fue capaz de reducir el radical DPPH estable incluso mejor que *T. elliptica* Sm. y mostró valores de IC_{50} 1.272 g/L en la concentración el (0.01 g/L-0.3 g/L) respectivamente (De Oliveira *et al.* 2018). Asimismo, Nasser (2014) informó que en el ensayo de barrido del radical DPPH, el aceite de *T. minuta* mostró un menor valor de IC_{50} de 0.036 g/L y mayor actividad antioxidante. El potencial antioxidante en este estudio disminuyó en orden AA > BHT > *T. elliptica* Sm.

Tabla 9: Capacidad antioxidante de los (AE) de las hojas de *T. elliptica* Sm. medida por el método (DPPH)

| Concentración (g/L) | AE de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. Inhibición del radical DPPH (porcentaje) | Concentración (g/L) | BHT Inhibición del radical DPPH (porcentaje) | AA |
|---------------------|---|---------------------|--|--------------------|
| 5 | 4.90 ± 2.36^a | 0.005 | 4.25 ± 0.18^a | 13.63 ± 2.78^a |
| 10 | 11.17 ± 2.15^b | 0.01 | $6.29 \pm 1.79^{a,b}$ | 23.54 ± 2.83^b |
| 20 | 21.14 ± 1.78^c | 0.02 | 10.17 ± 1.52^b | 56.36 ± 1.85^c |
| 50 | 48.09 ± 1.60^d | 0.05 | 17.50 ± 1.40^c | 96.01 ± 0.17^d |
| 80 | 77.77 ± 2.85^e | 0.08 | 21.26 ± 0.21^c | 96.26 ± 0.23^d |
| 100 | 87.63 ± 0.57^f | 0.1 | 33.21 ± 2.59^d | 96.33 ± 0.13^d |
| IC_{50}^* (g/L) | 53.37 ± 1.43 | IC_{50}^* (g/L) | 0.17 ± 0.01 | 0.02 ± 0.00 |

Cada valor se expresó como media \pm DE, n=3. Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey. * IC_{50} significa concentración (g/L) para una inhibición del 50 por ciento. *BHT: Butilhidroxitolueno, *AA: Ácido ascórbico.

4.1.2.2. Ensayo de eliminación de radicales 2, 2'-Azinobis (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS)

Se observó una actividad significativa de barrido de radicales libres ABTS en el aceite esencial de *T. elliptica* Sm. y en los controles positivos (BHT y AA). La tasa de disminución de la absorbancia a 734 nm depende del aceite esencial y de la cantidad de antioxidantes, por

lo que los resultados se expresan como equivalentes de patrones antioxidantes (Olajuyigbe *et al.* 2011). La Tabla 10, muestra la capacidad antioxidante detectada por el método ABTS, en la que la supresión de la absorbancia ABTS del aceite esencial de *T. elliptica* Sm. es dependiente de la concentración. El aceite esencial de *T. elliptica* Sm. mostró ($p < 0.05$) una actividad de barrido de radicales ABTS inferior (40.49 ± 0.58) al estándar de referencia BHT y AA (68.61 ± 1.40) y (99.18 ± 0.09). El IC_{50} fue la cantidad media (g/L) del AEC requerida para inhibir el 50 por ciento de los radicales libres DPPH o ABTS en el ensayo (Anexo 4). En este estudio el IC_{50} del ensayo DPPH por *T. elliptica* Sm. fue menor que en el ensayo ABTS con valores de 53.37 ± 1.43 (g/L) y 134.39 ± 2.16 (g/L). En este experimento se observa que (Z) y (E)-tagetenona es el principal compuesto presente en el AE de *T. elliptica* Sm, y fue eficaz en el barrido de radicales ABTS, lo que demuestra que puede ser utilizado como antioxidante (Singh *et al.* 2015).

Tabla 10: Capacidad antioxidante de los (AE) de hojas de *T. elliptica* Sm. medida por el método (ABTS)

| Concentración (g/L) | AE de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. | Concentración (g/L) | BHT | AA |
|-------------------------------------|---|-------------------------------------|---|------------------------|
| | Inhibición del radical ABTS (porcentaje) | | Inhibición del radical ABTS (porcentaje) | |
| 5 | 16.10 ± 0.85^a | 0.3125 | 38.26 ± 2.01^a | 22.55 ± 2.01^a |
| 10 | 24.24 ± 1.51^b | 0.625 | 52.05 ± 0.68^b | 45.51 ± 0.58^b |
| 20 | 27.01 ± 0.81^b | 1.25 | 63.03 ± 0.63^c | 96.59 ± 0.22^c |
| 50 | 34.62 ± 0.97^c | 3.125 | $66.18 \pm 0.20^{c,d}$ | 96.73 ± 0.18^c |
| 80 | 37.82 ± 1.59^d | 5 | $66.48 \pm 1.90^{c,d}$ | $98.17 \pm 0.23^{c,d}$ |
| 100 | 40.49 ± 0.58^d | 6.250 | 68.61 ± 1.40^d | 99.18 ± 0.09^d |
| IC_{50}^* (g/L) | 134.39 ± 2.16 | IC_{50}^* (g/L) | 0.62 ± 0.07 | 0.59 ± 0.02 |

Cada valor se expresó como media \pm DE, n=3. Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey. * IC_{50} significa concentración (g/L) para una inhibición del 50 por ciento. *BHT: Butilhidroxitolueno, *AA: Ácido ascórbico

4.1.2.3. Poder antioxidante férrico reductor (FRAP)

El ensayo FRAP, tiene el poder reductor de iones férricos de un compuesto y se utiliza a menudo como un indicador de su actividad donadora de electrones (Oyayzu 1986). En este estudio, se evaluó la capacidad del aceite esencial de *T. elliptica* Sm. para reducir el ion férrico a ferroso. Los resultados se presentan en la Tabla 11, donde el AEC presenta valores

similares en la concentración (m mol/L Trolox) en comparación con el control (BHT), indicando que muestran un potencial reductor, siendo el aceite esencial de *T. elliptica* Sm. el más activo, con valores superiores de (8.73±0.53) y (7.97±0.21) m mol/L Trolox. En el control (AA) se diluyeron 5 veces la concentración inicial (0.67±0.05) m mol/L Trolox. En este estudio, el aceite esencial de *T. elliptica* Sm. y el BHT mostraron capacidad reductora férrica en términos de concentración de Trolox sin diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) en las concentraciones más bajas (0.3125-0.625) g/L. Mientras que la mayor capacidad reductora se observó en la concentración más alta de aceite esencial de *T. elliptica* Sm., BHT y AA existieron diferencias significativas entre la capacidad reductora ($p < 0.05$). Las diferencias significativas para la actividad de barrido de radicales libres entre las muestras pueden atribuirse a la variada cantidad de compuestos activos presentes en *T. elliptica* Sm. como *T. minuta*, *T. palula* y *T. lucida* (Salehi *et al.* 2018).

Tabla 11: Capacidad antioxidante del (AE) de hojas de *T. elliptica* Sm. medida por el método (FRAP)

| Concentración (g/L) | AE de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. | BHT | Concentración (g/L) | AA |
|------------------------|---|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | TEAC* m mol/ L Trolox | | | TEAC* m mol/ L Trolox |
| 0.3125 | 0.06±0.01 ^a | 0.17±0.01 ^a | 0.0625 | 0.03±0.0 ^a |
| 0.625 | 0.23±0.02 ^a | 0.49±0.02 ^a | 0.125 | 0.07±0.0 ^a |
| 1.25 | 0.79±0.04 ^a | 1.25±0.05 ^b | 0.25 | 0.15±0.01 ^b |
| 3.125 | 2.32±0.42 ^b | 4.44±0.17 ^c | 0.625 | 0.43±0.00 ^c |
| 5 | 8.73±0.53 ^c | 7.97±0.21 ^d | 1 | 0.67±0.05 ^d |

Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey. * Capacidad antioxidante equivalente a Trolox

4.1.2.4. Capacidad quelante de iones ferrosos (FIC)

La capacidad reductora del aceite esencial de *T. elliptica* Sm. se utiliza para medir el poder antioxidante basado en un ensayo de reducción de Fe³⁺-TPTZ férrico modificado a Fe²⁺-TPTZ ferroso de un color púrpura a un color dorado con un máximo de absorción a 562 nm. (Singh y Rajini 2004). En la Tabla 12 se puede observar que la inhibición del complejo ferrozina-cloruro ferroso aumenta de manera dependiente de la concentración, a mayor concentración (25 g/L) el aceite esencial de *T. elliptica* Sm. mostró la mayor ($p < 0.05$)

inhibición (40.88 ± 0.98 por ciento), pero menor que el control positivo EDTA (80.22 ± 1.82 por ciento) con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre ellos. La EC_{50} para el extracto de aceite de *T. elliptica* Sm. se observó en 25.72 g/L, mientras que en EDTA fue de 0.06 g/L (el control EDTA se diluyó 1000 veces la concentración inicial). Sin embargo, el aceite esencial de *T. elliptica* Sm. y el control EDTA, no presentaron efecto en este ensayo en la concentración (1.25 - 2.5 g/L) y (0.005 - 0.01 g/L). En este estudio se evidenció en general que en los ensayos FRAP y FIC (Tabla 10 y 11), las altas concentraciones utilizadas en los métodos DPPH y ABTS dificultaron las lecturas de trabajo. Por este motivo, se realizaron varias diluciones para obtener mejores resultados.

Tabla 12: Capacidad antioxidante del (AE) de las hojas de *T. elliptica* Sm. medida mediante el ensayo de quelación del hierro ferroso

| AE de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. | | EDTA | |
|--|---|-------------------------------------|---|
| Concentración (g/L) | Inhibición del radical FIC (porcentaje) | Concentración (g/L) | Inhibición del radical FIC (porcentaje) |
| 1.25 | - | 0.005 | - |
| 2.5 | - | 0.01 | - |
| 5 | 7.87 ± 2.85^c | 0.02 | 1.25 ± 1.34^c |
| 12.5 | 27.48 ± 3.87^d | 0.05 | 41.47 ± 2.95^d |
| 20 | 39.90 ± 1.44^e | 0.08 | 71.92 ± 3.46^e |
| 25 | 40.88 ± 0.98^e | 0.10 | 80.22 ± 1.82^f |
| EC_{50}^* (g/L) | 25.72 ± 0.80 | EC_{50}^* (g/L) | 0.06 ± 0.00 |

Cada valor se expresó como media \pm DE, n=3. Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey.

* EC_{50} significa concentración (g/L) para un efecto quelante del 50 por ciento

4.1.2.5. Ensayo Rancimat

El método Rancimat determina el índice de estabilidad oxidativa en el aceite esencial de *T. elliptica* Sm. El periodo de inducción del aceite esencial de *T. elliptica* Sm. fue inferior y los valores oscilaron entre 6.56 - 7.29 h. En los controles positivos BHT y AA los valores oscilaron entre 8.20 - 11.57 h y 11.09 - 20.83 h. La Tabla 13 muestra los valores del ensayo Rancimat en términos de IAA de la manteca de cerdo con aceite esencial de *T. elliptica* Sm. añadido. Cuanto mayor es el periodo de inducción de la manteca con el aceite esencial de *T. elliptica* Sm., comparado con el control (manteca pura), mejor es la actividad antioxidante de ese compuesto.

El IAA, determinado por el método Rancimat, disminuyó en el orden AA > BHT > *T. elliptica* Sm. Según este método, sólo las concentraciones (5-10 g/L) de aceite esencial de *T. elliptica* Sm. mostraron actividad antioxidante (IAA = 1.01), pero inferior a la de los antioxidantes sintéticos (BHT=1.55 y AA = 2.84). El aceite esencial de *T. elliptica* Sm. mostró actividad prooxidante en concentraciones (20-100 g/L). En todas las concentraciones (5-100 g/L) de aceite esencial de *T. elliptica* Sm. no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.05$), pero en las mismas concentraciones el BHT y el AA mostraron los mayores índices ($p < 0.05$) de actividad antioxidante. Tinelo *et al.* (2018) reportaron valores similares al método Rancimat en el aceite de soja de 10.67 h, en el cual también comparo la estabilidad oxidativa con dos métodos Rancimat y Oxitest. Y demostró que el periodo de inducción del método Oxitest fue dos veces inferior al método Rancimat, con respecto al tiempo de oxidación. Por lo tanto, el método Oxitest puede ser una alternativa válida al método Rancimat, pero el valor del periodo de inducción del Oxitest se correlaciona con la fase del inicio de la autooxidación y no indica la formación de productos de oxidación secundarios como el Rancimat Kreps *et al.* (2021).

Tabla 13: Capacidad antioxidante del (AE) de las hojas de *T. elliptica* Sm. a diferentes concentraciones medida por el método Rancimat

| Concentración (g/L) | AE de hojas de <i>T. elliptica</i> Sm. | BHT | AA |
|---------------------|--|---------------------------|---------------------------|
| | Índice de Actividad Antioxidante (IAA) | | |
| 5 | 1.01±0.03 ^a | 1.09±0.07 ^a | 1.51±0.04 ^a |
| 10 | 1.01±0.04 ^a | 1.18±0.07 ^a | 2.27±0.13 ^b |
| 20 | 0.99±0.04 ^a | 1.28±0.11 ^{a, b} | 2.84±0.25 ^c |
| 50 | 0.91±0.03 ^a | 1.40±0.13 ^{a, b} | 2.71±0.27 ^{b, c} |
| 80 | 0.95±0.04 ^a | 1.55±0.20 ^b | 2.36±0.10 ^{b, c} |
| 100 | 0.93±0.03 ^a | 1.53±0.07 ^b | 2.25±0.22 ^b |

(a, b, c) Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey.

4.1.3. Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallos de *T. elliptica* Sm

El uso del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallos (Figura 6), permite utilizar la parte recolectada manualmente de esta especie. El uso de los tallos y hojas permitiría un mejor

aprovechamiento de la parte cosechada de esta especie. Es importante aprovechar al máximo y optimizar los rendimientos obtenidos, para ello es imprescindible conocer la actividad antioxidante de los aceites esenciales de la parte mayoritaria de la planta (hojas y tallos) y que se comercializan conjuntamente el chincho con hojas y tallos.

4.1.3.1. Capacidad antioxidante de radicales libres de (DPPH)

Los compuestos fenólicos comprenden uno o más anillos aromáticos con un grupo hidroxilo unido en sus estructuras que muestran una fuerte actividad antioxidante con efectos beneficiosos para la salud humana (Minatel *et al.* 2017). La actividad antioxidante del aceite de la mezcla de hojas y tallos de la *T. elliptica* Sm. se determinó mediante un ensayo (DPPH) y se comparó con la actividad del AA y BHT. La actividad antioxidante de las muestras de AEC de hojas y tallos se resume en la Tabla 14 en términos de PI y valores IC₅₀. Se observó el mismo efecto de la sección 4.1.2.1, cuando cambia inicialmente el color púrpura, que se desvanece a amarillo con disminución de la absorbancia a 517 nm (Mirshra *et al.* 2012) cuando los componentes bioactivos (antioxidantes) de los AE donan radicales de hidrógeno. Mientras tanto, en este estudio para AEC mostró el ($p < 0.05$) efecto de eliminación de radicales (91.86 ± 0.86) a 100 g / L; sin embargo, las actividades antioxidantes de los controles positivos fueron más que la muestra, AA y BHT (96.33 ± 0.13 y 33.21 ± 2.59) g / L (controles positivos se diluyeron 1000 veces la concentración inicial, como estudios evidenciados por An *et al.* (2018).

Tabla 14: Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallos de *T. elliptica* Sm. mediante el ensayo (DPPH)

| Concentración (g/L) | AE de hojas y tallos de <i>T. elliptica</i> Sm. Inhibición del radical DPPH (porcentaje) | Concentración (g/L) | BHT Inhibición del radical DPPH (porcentaje) | AA |
|--------------------------|--|--------------------------|--|-------------------------|
| 5 | 7.15±0.52 ^a | 0.005 | 4.25±0.18 ^a | 13.63±2.78 ^a |
| 10 | 13.75±1.05 ^b | 0.01 | 6.29±1.79 ^{a, b} | 23.54±2.83 ^b |
| 20 | 25.15±0.68 ^c | 0.02 | 10.17±1.52 ^b | 56.36±1.85 ^c |
| 50 | 67.45±1.25 ^d | 0.05 | 17.50±1.40 ^c | 96.01±0.17 ^d |
| 80 | 86.74±3.33 ^e | 0.08 | 21.26±0.21 ^c | 96.26±0.23 ^d |
| 100 | 91.86±0.83 ^f | 0.1 | 33.21±2.59 ^d | 96.33±0.13 ^d |
| IC ₅₀ * (g/L) | 45.57±0.59 | IC ₅₀ * (g/L) | 0.17±0.01 | 0.02±0.00 |

Cada valor se expresó como media ± DE, n=3. Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey. * IC₅₀

significa concentración (g/L) para una inhibición del 50 por ciento. *BHT: Butilhidroxitolueno, *AA: Ácido ascórbico.

La mezcla del AEC de hojas y tallos, también exhibió una moderada actividad de barrido de radicales libres DPPH, con valores de IC₅₀ de 45.57 ± 0.59 g/L y controles positivos, AA y BHT (0.02 ± 0.00 y 0.17 ± 0.01) g/L. Otros estudios Yalta *et al.* (2019), determinaron que el AEC obtuvo un valor más bajo en comparación con la *T. minuta*. Por otro lado, Huaraca *et al.* (2022) evidenciaron que los valores de IC₅₀ de AEC fue mayor en comparación con *T. minuta*, con valores de IC₅₀ (2.56 ± 0.12 y 1.77 ± 0.02) g/L, respectivamente.

4.1.3.2. Ensayo de eliminación de radicales 2, 2'-Azinobis (3-etilbenzo-tiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS)

El ensayo de decoloración del catión radical ABTS se basa en la generación de un ABTS azul/verde que puede ser reducido por la capacidad antioxidante de los alimentos basada en una rápida transferencia de electrones (Barbieri *et al.* 2016). El análisis de la diferente actividad de barrido de radicales ABTS del AEC de hojas y tallos con el AA y BHT como control positivo (Tabla 15), mostró cierta actividad de barrido de radicales ABTS dependiente de la concentración de AEC ($p < 0.05$) (5-100 g/L) y del control positivo BHT y AA (0.313-6.25 g/L) con diluciones en los controles positivos como estudios evidenciados por An *et al.* (2018).

Tabla 15: Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallos de *T. elliptica* Sm. mediante el ensayo (ABTS)

| Concentración (g/L) | AE de hojas y tallos de <i>T. elliptica</i> Sm. | | Concentración (g/L) | BHT AA | |
|--------------------------|---|--|----------------------------|---|--|
| | Inhibición del radical ABTS (porcentaje) | | | Inhibición del radical ABTS (porcentaje) | |
| 5 | 22.13±1.80 ^a | | 0.3125 | 38.26±2.01 ^a 22.55±2.01 ^a | |
| 10 | 30.95±0.71 ^b | | 0.625 | 52.05±0.68 ^b 45.51±0.58 ^b | |
| 20 | 35.42±2.26 ^c | | 1.25 | 63.03±0.63 ^c 96.59±0.22 ^c | |
| 50 | 45.66±3.47 ^d | | 3.125 | 66.18±0.20 ^{c,d} 96.73±0.18 ^c | |
| 80 | 52.99±1.41 ^e | | 5 | 66.48±1.90 ^{c,d} 98.17±0.23 ^{c,d} | |
| 100 | 59.24±0.56 ^f | | 6.25 | 68.61±1.40 ^d 99.18±0.09 ^d | |
| IC ₅₀ * (g/L) | 69.05±1.62 | | IC ₅₀ * (g/L) * | 0.62±0.07 0.59±0.02 | |

Cada valor se expresó como media ± DE, n=3. Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey. * IC₅₀ significa concentración (g/L) para una inhibición del 50 por ciento. *BHT: Butilhidroxitolueno, *AA: Ácido

ascórbico.

La capacidad de barrido de radicales ABTS del AEC presentó el siguiente orden descendente: AA > BHT > AEC con diferencias significativas ($p < 0.05$). En este ensayo, el AEC inhibió 59.24 ± 0.56 por ciento de los radicales a la concentración de 100 g/L y el valor más alto fue el control positivo AA y BHT (99.18 ± 0.09 por ciento y 68.61 ± 1.40 por ciento) (Tabla 15).

La actividad de barrido de radicales AEC ABTS fue ($PI_{50} = 69.05 \pm 1.62$ g/L) y el mayor barrido de radicales fue AA ($IC_{50} = 0.59 \pm 0.02$ g/L) seguido de BHT ($IC_{50} = 0.62 \pm 0.07$ g/L) (los controles positivos se diluyeron 16 veces la concentración inicial). Huaraca *et al.* (2022) reportaron que AEC fue el valor más alto comparado con *T. minuta* con valores IC_{50} (41.06 ± 0.23 y 21.02 ± 0.14) g/L, respectivamente. La actividad antioxidante puede estar relacionada con el contenido de ocimeno, limoneno, terpineno, mirceno, tagetona, dihidrotagetona y tagetenona (Kashyap *et al.* 2022; Salehi *et al.* 2018) que conducen a actividades antioxidantes.

4.1.3.3. Poder antioxidante férrico reductor (FRAP)

El ensayo FRAP sirve para determinar la actividad reductora férrica de las muestras de alimentos frente a las consecuencias oxidativas de las especies reactivas del oxígeno (Müller *et al.* 2010). Se observó que la capacidad reductora de los AEC y de los controles positivos (AA y BHT) aumentaba con el correspondiente incremento de la concentración (Tabla 16). La mezcla de aceites de hojas y tallos demostró buenos efectos reductores a la concentración (0.312 - 5) g/L, mostraron (0.10 ± 0.08 - 7.23 ± 0.03) mM Trolox/L, respectivamente, valores similares al control positivo (BHT) con igual concentración (0.17 ± 0.01 - 7.97 ± 0.21) mM Trolox/L. El BHT y el AA no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) las concentraciones más bajas (0.3125 y 0.0625 g/L).

La capacidad de reducción de iones férricos del AA (se diluyó 5 veces en referencia al AEC) en el ensayo (0.0625 - 1 g/L, 0.03 ± 0.0 - 0.67 ± 0.05 mM Trolox/L) fue más alta que los valores de absorbancia para el AEC y BHT (Salachna *et al.* 2021). También mostró que el AE de *T. palula* L. exhibió una capacidad dependiente de la dosis (para reducir ferroso a férrico) en el ensayo FRAP; y que podría estar relacionado con el tipo de cultivo que aumenta la concentración total de fenoles y las actividades antioxidantes (Chrysargyris *et al.* 2017).

Tabla 16: Capacidad antioxidante del aceite esencial de las hojas y tallos de *T. elliptica* Sm. mediante el ensayo (FRAP)

| Concentración (g/L) | AE de hojas y tallos de <i>T. elliptica</i> Sm. | BHT | Concentración (g/L) | AA |
|------------------------|--|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | TEAC* m mol/ L Trolox | | | TEAC* m mol/ L Trolox |
| 0.3125 | 0.10±0.08 ^a | 0.17±0.01 ^a | 0.0625 | 0.03±0.0 ^a |
| 0.625 | 0.33±0.24 ^b | 0.49±0.02 ^a | 0.125 | 0.07±0.0 ^a |
| 1.25 | 1.09±0.84 ^c | 1.25±0.05 ^b | 0.25 | 0.15±0.01 ^b |
| 3.125 | 3.67±3.06 ^d | 4.44±0.17 ^c | 0.625 | 0.43±0.00 ^c |
| 5 | 7.23±0.03 ^e | 7.97±0.21 ^d | 1 | 0.67±0.05 ^d |

Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey.

*Capacidad antioxidante equivalente a Trolox

4.1.3.4. Capacidad quelante de iones ferrosos (FIC)

Se determinó la actividad quelante de iones ferrosos del AEC en la mezcla de hojas y tallos y su poder reductor/antioxidante férrico para reducir de Fe^{3+} a Fe^{2+} . La actividad FIC aumentó significativamente ($p < 0.05$) con el aumento de la concentración, como se muestra en la Tabla 17. Los resultados mostraron que el EDTA (control positivo, se diluyó 250 veces en referencia a las diluciones de ABTS y DPPH como estudios evidenciados por An *et al.* (2018), es más efectivo como quelante que el AEC en todas las concentraciones evaluadas. El EDTA alcanzó altos niveles de quelación de iones ferrosos a mayor concentración (0.10 g/L, 80.22 ± 1.82 por ciento), mientras que la mejor actividad mostrada por el AEC a mayor concentración fue (25 g/L, 39.53 ± 1.54 por ciento), respectivamente. Sin embargo, el AEC y el EDTA control, no presentaron efecto en este ensayo en las concentraciones (1.25 - 5 g/L) y (0.005 - 0.01 g/L). Los valores de EC_{50} fueron en AEC (27.73 ± 0.62 g/L) y el control positivo EDTA (0.06 ± 0.01 g/L). En general, AEC presenta valores de actividad FIC más bajos en comparación con EDTA (control positivo). Sin embargo, otros estudios de la especie Tagetes como la *T. lucida* han evidenciado que el extracto de sus hojas tiene baja capacidad de quelación de iones ferrosos, pero mayor en comparación con los controles positivos AA y BHT Abdel *et al.* (2017).

Tabla 17: Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallos de *T. elliptica* Sm. mediante ensayo (FIC)

| AE de hojas y tallos de <i>T. elliptica</i> Sm. | | EDTA | |
|--|---|--------------------------------|---|
| Concentración (g/L) | Inhibición del radical FIC (porcentaje) | Concentración (g/L) | Inhibición del radical FIC (porcentaje) |
| 1.25 | – | 0.005 | – |
| 2.5 | – | 0.01 | – |
| 5 | – | 0.02 | 1.25±1.34 ^c |
| 12.5 | 15.78±6.86 ^c | 0.05 | 41.47±2.95 ^d |
| 20 | 32.64±1.63 ^d | 0.08 | 71.92±3.46 ^e |
| 25 | 39.53±1.54 ^e | 0.10 | 80.22±1.82 ^f |
| EC₅₀ * (g/L) | 27.73±0.62 | EC₅₀ * (g/L) | 0.06±0.00 |

Cada valor se expresó como media ± DE, n=3. Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey.

*EC₅₀ significa concentración (g/L) para un efecto quelante del 50 por ciento.

4.1.3.5. Ensayo Rancimat

La estabilidad oxidativa del AEC se determinó por el método Rancimat. La Tabla 18 muestran los tiempos de inducción a 120 °C medidos por Rancimat para AEC (10, 20, 50, 80 y 100 g/L de aceite) y como controles positivos AA y BHT con concentraciones iguales. El índice de actividad antioxidante (IAA) del AEC disminuyó con el aumento de la concentración del aceite ($p < 0.05$). Sin embargo, en los controles positivos BHT ($p < 0.05$) y AA ($p < 0.05$), el índice de actividad antioxidante (IAA) aumentó con el incremento de la concentración. El periodo de inducción del AEC (6.07±0.16-7.61±0.06) h, fue menor a los controles positivos AA (11.09±0.02-20.83±1.10) h y BHT (8.20±0.07-11.57±0.63) h, respectivamente. Esto significa que el AEC fue el menos eficaz para retrasar la oxidación. Sin embargo, no sólo es importante el contenido total de compuestos fenólicos, sino también la identidad de los compuestos individuales, ya que está relacionada con su poder antioxidante (Dauber *et al.* 2022). Según este método, sólo la concentración (5 g/L) de AEC mostró actividad antioxidante (IAA = 1.05), pero inferior a la de los antioxidantes sintéticos (AA = 2.84 y BHT=1.55). El AEC mostró actividad prooxidante en concentraciones (10-100 g/L), como se ha demostrado en otros estudios al aumentar la concentración del aceite Varas *et al.* (2020). Por otro lado, nuestros resultados del periodo de inducción son similares a los reportados por Rodríguez *et al.* (2021) en el aceite de sacha inchi y soja (4.32-11.02) h, utilizando el método Rancimat, pero ese mismo estudio evaluó el método RapidOxy y

mostró que los tiempos del periodo de inducción son menores (27.6-40.2) min. Por lo tanto, el método RapidOxy que se refiere a la estabilidad del oxígeno y que está relacionado a la aceleración de la oxidación por temperatura y presiones elevadas, podría ser una alternativa para determinar la oxidación del AEC en menor tiempo (Traxl *et al.* 2023).

Tabla 18: Capacidad antioxidante del aceite esencial de la mezcla de hojas y tallos de *T. elliptica* Sm. utilizando el ensayo RANCIMAT

| Concentración (g/L) | AE de hojas y tallos de <i>T. elliptica</i> Sm. | BHT | AA |
|------------------------|--|---------------------------|---------------------------|
| | Índice de Actividad Antioxidante (IAA) | | |
| 5 | 1.05±0.03 ^a | 1.09±0.07 ^a | 1.51±0.04 ^a |
| 10 | 0.99±0.03 ^b | 1.18±0.07 ^a | 2.27±0.13 ^b |
| 20 | 0.97±0.01 ^c | 1.28±0.11 ^{a, b} | 2.84±0.25 ^c |
| 50 | 0.96±0.01 ^{c, d} | 1.40±0.13 ^{a, b} | 2.71±0.27 ^{b, c} |
| 80 | 0.90±0.01 ^{c, d} | 1.55±0.20 ^b | 2.36±0.10 ^{b, c} |
| 100 | 0.84±0.03 ^e | 1.53±0.07 ^b | 2.25±0.22 ^b |

(^{a, b, c}) Los valores seguidos de la misma letra dentro de la misma columna no son significativamente diferentes ($p > 0.05$) según la prueba de rangos múltiples de Tukey.

Los aceites esenciales de *T. elliptica* Sm. de las hojas y de la mezcla de hojas con tallos tienen actividad antioxidante muy similares, lo que podría ser una alternativa valiosa como agente antioxidante en comparación con otras especies (Tabla 2). De Oliveira *et al.* (2019) han reportado la actividad antioxidante de otra especie muy conocida como *T. minuta* que presenta valores similares al AEC. Por otro lado, los aceites esenciales de otras especies (Ed-Dra *et al.* 2020; Kaur y Kaushal 2020; An *et al.* 2018; Mnif *et al.* 2011; Mikre *et al.* 2007) bien conocidas han presentado mayor concentración de inhibición por el método DPPH que el AEC. Para el ensayo FIC, otras especies bien conocidas Althaher *et al.* (2020); Viuda *et al.* (2010) reportaron menor concentración de efecto quelante que el AEC. Con respecto al ensayo Rancimat de especies bien conocidas en la dieta mediterránea AEC presentó valores similares con *Rosmarinus officinalis* L. y *Salvia officinalis* L. a los reportados por Viuda *et al.* (2010). Los resultados estadísticos se muestran en el (Anexo 5).

4.1.4. Análisis cromatográfico por (GC-MS) del aceite esencial de *T. elliptica* Sm

Se realizó el análisis (GC-MS) del aceite esencial solo de las hojas de la *T. elliptica* Sm. considerando su mayor rendimiento del aceite (Tabla 7), el cual se detectó un total de 27

compuestos, de los cuales el principal fue la tagetenona (56.11 por ciento) (Tabla 19). Los otros compuestos reportados fueron dihidrotagetona (14.38 por ciento), tagetona (8.57 por ciento), ocimeno (4.66 por ciento) identificados en el aceite de las hojas, que son compuestos biosintetizados por Tagetes (*Tagetes elliptica* Sm.) y son también una mezcla de compuestos terpénicos.

Tabla 19: Composición química del aceite esencial de hojas de *T. elliptica* Sm

| No | Componentes | T _r ^a | Área (Porcentaje) |
|----|--|-----------------------------|-------------------|
| 1 | α -Pinenos | 13.28 | 0.66 \pm 0.01 |
| 2 | β -Mirceno | 14.53 | 0.87 \pm 0.02 |
| 3 | β -Pinenos | 14.91 | 0.62 \pm 0.02 |
| 4 | α -Felandreno | 15.62 | 1.71 \pm 0.04 |
| 5 | β -trans-Ocimeno | 16.40 | 4.66 \pm 0.11 |
| 6 | β -Felandreno | 16.46 | 0.22 \pm 0.01 |
| 7 | Eucaliptol | 16.51 | 0.47 \pm 0.01 |
| 8 | Dihidrotagetona** | 16.98 | 14.38 \pm 0.21 |
| 9 | β -Linalool | 18.48 | 0.45 \pm 0.01 |
| 10 | Desconocido (C ₁₀ H ₁₄ O) | 18.88 | 0.50 \pm 0.01 |
| 11 | Desconocido (C ₈ H ₁₆ O) | 18.97 | 3.62 \pm 0.04 |
| 12 | Desconocido (C ₈ H ₁₆) | 19.35 | 0.85 \pm 0.00 |
| 13 | (Z) trans-Tagetona | 19.91 | 5.15 \pm 0.00 |
| 14 | (E) cis-Tagetona | 20.11 | 3.42 \pm 0.06 |
| 15 | Desconocido (C ₈ H ₁₀ O ₂) | 20.35 | 0.59 \pm 0.07 |
| 16 | α -Terpineol | 21.61 | 0.19 \pm 0.01 |
| 17 | Decanal | 21.72 | 0.98 \pm 0.01 |
| 18 | Desconocido (C ₁₀ H ₁₄ O) | 21.86 | 0.97 \pm 0.07 |
| 19 | (E) cis-Tagetenone** | 22.64 | 37.27 \pm 0.24 |
| 20 | (Z) trans-Tagetenone** | 22.84 | 18.84 \pm 0.29 |
| 21 | Desconocido (C ₁₀ H ₁₄ O) | 23.28 | 0.40 \pm 0.01 |
| 22 | 6-Isopropenil-3-metil-2-ciclohexen-1-ona | 23.82 | 0.40 \pm 0.00 |
| 23 | β -Cariofileno | 28.10 | 0.97 \pm 0.00 |
| 24 | Germacreno D | 29.71 | 0.45 \pm 0.01 |
| 25 | Biciclogermacreno | 30.10 | 0.46 \pm 0.00 |
| 26 | Elemol | 31.42 | 0.36 \pm 0.00 |
| 27 | Germacreno D-4-ol | 32.37 | 0.54 \pm 0.02 |

**Mayor componente

T_r^a: Tiempo de retención (min.)

En vista de esto, los autores Cruz *et al.* (2021) indican que los compuestos mayoritarios de tagetes son tagetona (43-9 por ciento) y dihidrotagetona (20.7 por ciento), seguidos de trans- β -ocimeno, eucaliptol, limoneno y β -cubebeno, tagetenonas, con potencial para ser utilizados como cosméticos y productos farmacéuticos y para resolver problemas de plagas

de insectos de plantas como repelentes de oliveira *et al.* (2018) evidenciaron la mayoría de los compuestos a tagetonas (70.64 por ciento) en *T. minuta*, estos son considerados tóxicos y repelentes de insectos. En la actualidad, no hay informes de la composición del aceite esencial de *T. elliptica* Sm.; sin embargo, se han reportado varios estudios sobre otras especies de Tagetes. Se ha descubierto que el compuesto principal cis-tagetenona se ha identificado en varias especies de Tagetes: *T. caracasana*, *T. patula* y *T. subulata* *T. minuta*, *T. lemmonii*, *Tagetes argentino*. El otro compuesto principal (E)-tagetona se ha registrado en varias especies de Tagetes (Gakuubi *et al.* 2016; Vázquez *et al.* 2011). Cualitativamente, las composiciones químicas del aceite esencial *T. elliptica* Sm. es similar al aceite de *T. minuta*. Algunos estudios reportaron que los principales componentes del aceite esencial de *T. minuta* fueron β -ocimeno, dihidrotagetona, tagetona, Z-ocimeno y E-ocimeno Cruz *et al.* (2021); Karimian *et al.* (2014), evidenciando que la dihidrotagetona y la tagetona son similares a las encontradas en el AEC. Los resultados evidenciaron que la mayoría de los aceites esenciales de Tagetes ssp. dependen de la especie, clima, altitud, época de recolección y etapa de crecimiento. Las plantas analizadas en esta investigación presentaron aproximadamente los mismos componentes que otros aceites esenciales de *T. patula* y *T. minuta* analizados anteriormente, sin embargo, mostraron diferencias importantes en su calidad y cantidad de componentes Salachna *et al.* (2021); Karimian *et al.* (2014).

4.1.5. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *T. elliptica* Sm

El método de difusión en pozos de agar se analizó en las hojas del AEC, considerando el mayor rendimiento de aceite entre las hojas y la mezcla de las hojas con tallo (Tabla 7). Se evaluó el AEC de las hojas y mostró actividad antimicrobiana frente a todas las cepas estudiadas (Ver anexo 6), lo que se evidencia en las marcadas zonas de inhibición que mostraron los microorganismos estudiados. Las especies Gram positivas (*S. aureus*) fueron marcadamente sensibles al aceite esencial, con zonas de inhibición de 19.67 y 14.30 mm, respectivamente (Tabla 20). Sin embargo, los halos obtenidos para las bacterias Gram negativas (*E. coli*) y (*S. infantis*) fueron mucho más bajos con valores de 12.63 y 13.00 mm, lo que indica una mayor resistencia del microorganismo puede establecerse contra *S. aureus* < *S. infantis* < *E. coli*. Estos resultados permiten considerar que el AEC es más eficaz contra los organismos Gram positivos en comparación con los Gram negativos. En este sentido, varios estudios sobre las propiedades antibacterianas de los aceites esenciales obtenidos de plantas del género Tagetes, así como de otras especies vegetales, han reportado comúnmente

que las bacterias Gram-positivas fueron más susceptibles a los efectos de los AE en comparación con las Gram-bacterias negativas Ayub *et al.* (2017); Senatore *et al.* (2004). Debido al hecho de que las bacterias Gram-negativas tienen una membrana externa que restringe la difusión de sustancias hidrofóbicas (Burt 2004). Por otro lado, las bacterias patógenas *S. aureus* y *E. coli* se consideran modelo para la evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas (Thielmann *et al.* 2019). Y se ha evidenciado que la *S. aureus* es susceptible con diversos aceites esenciales incluyendo el obtenido de otras especies de Tagetes Abers *et al.* (2021); Salehi *et al.* (2018); Ayub *et al.* (2017). Asimismo, la bacteria patógena *S. infantis* es la responsable de zoonosis transmisibles al ser humano, con alta resistencia a los antibióticos; la sensibilidad de esta bacteria en presencia del aceite esencial de *T. elliptica* se observó con el aceite esencial de orégano a concentraciones similares Di vito *et al.* (2020); lo que sugiere nuevas investigaciones con ensayos *in vivo* y a concentraciones más altas del AEC contra zoonosis y potencial uso antimicrobiano en el envasado de alimentos.

Se observó que el efecto inhibitor del aceite esencial de *T. elliptica* Sm. era proporcional a sus dosis. Se encontraron diferencias significativas en la mayoría de todas las dosis para *S. aureus* ($P < 0.05$), en el caso de *E. coli* y *S. infantis* las diferencias no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$) entre las dosis de 20 μL y 10 μL . El aceite esencial de *T. elliptica* Sm. presentó una mayor actividad inhibitoria frente a *S. aureus* en comparación con *E. coli* y *S. infantis* en el intervalo de 55.3-442.1 $\mu\text{g/mL}$, el aceite esencial de *T. patula* presentó inhibición frente a bacterias fitopatógenas Gram negativas, sin embargo, a concentraciones más elevadas entre 50-500 $\mu\text{g/mL}$ (Villada *et al.* 2021).

Tabla 20: Resultados de la actividad antibacteriana del (AEC) de las hojas de *T. elliptica* Sm

| AEC (IZ) ^a | Microorganismos | | |
|--------------------------|--|---|----------------------------------|
| | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923TM | <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922TM | <i>Salmonella infantis</i> |
| 5 μL | 14.30 \pm 1.13 ^a | 10.00 \pm 1.00 ^a | 10.63 \pm 0.55 ^a |
| 10 μL | 15.57 \pm 1.07 ^{a, b} | 10.87 \pm 0.85 ^{a, b} | 11.23 \pm 0.61 ^{a, b} |
| 20 μL | 17.33 \pm 1.16 ^{b, c} | 11.19 \pm 1.20 ^{a, b} | 12.33 \pm 0.58 ^{a, b} |
| 40 μL | 19.67 \pm 0.57 ^c | 12.63 \pm 0.56 ^c | 13.00 \pm 1.00 ^b |

^aIZ, diámetro de la zona de inhibición (mm) excluido el diámetro del pozo (6 mm).

Todos los valores de esta tabla representan la media \pm DE (n=3). El control negativo (DMSO) no mostró ninguna actividad.

4.2. OPTIMIZACIÓN DE NANOPARTÍCULAS MEDIANTE GELIFICACIÓN IÓNICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CHINCHO POR DISEÑO BOX-BEHNKEN (DBB)

4.2.1. Resumen del diseño experimental

4.2.1.1. Modelo apropiado

Se aplicó el diseño de Box-Benhken para optimizar los AEC-QSNP. Se realizaron un total de 17 corridas con 5 puntos centrales para evaluar el efecto de 3 variables independientes, las cuales se pueden observar (Tabla 21).

Tabla 21:Matriz de Box-Benhken y respuestas para las diferentes formulaciones en estudio

| Experimentos | Variables Independientes | | | Variables de respuesta | |
|--------------|--------------------------|----------------|----------------|------------------------|----------------|
| | X ₁ | X ₂ | X ₃ | Y ₁ | Y ₂ |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 21.55 ± 1.31 | 5.81 ± 0.37 |
| 2 | 1 | 0 | 1 | 24.27 ± 0.60 | 5.87 ± 0.29 |
| 3 | 0 | 0 | 0 | 19.09 ± 0.85 | 5.14 ± 0.23 |
| 4 | -1 | 0 | 1 | 23.50 ± 1.39 | 6.15 ± 0.20 |
| 5 | 1 | -1 | 0 | 18.71 ± 0.53 | 4.15 ± 0.10 |
| 6 | 0 | 1 | 1 | 29.46 ± 0.63 | 10.24 ± 0.44 |
| 7 | 0 | 1 | -1 | 39.12 ± 0.96 | 12.97 ± 1.19 |
| 8 | 1 | 1 | 0 | 12.15 ± 0.44 | 3.86 ± 0.13 |
| 9 | -1 | 1 | 0 | 28.34 ± 3.10 | 9.05 ± 1.01 |
| 10 | 0 | 0 | 0 | 21.71 ± 0.44 | 5.77 ± 0.22 |
| 11 | 0 | 0 | 0 | 20.38 ± 0.69 | 5.50 ± 0.20 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 21.17 ± 1.02 | 5.68 ± 0.30 |
| 13 | 0 | -1 | 1 | 24.19 ± 0.41 | 6.38 ± 0.73 |
| 14 | -1 | 0 | -1 | 49.48 ± 0.80 | 12.39 ± 1.69 |
| 15 | -1 | -1 | 0 | 25.31 ± 4.38 | 5.64 ± 0.69 |
| 16 | 1 | 0 | -1 | 25.14 ± 1.49 | 6.85 ± 0.43 |
| 17 | 0 | -1 | -1 | 52.92 ± 0.65 | 11.74 ± 0.87 |

X₁ = pH de solución de quitosano QS, X₂ = QS: AEC (p/v), X₃ = Quitosano: TPP (p/p), Y₁ = Eficiencia de Encapsulación EE por ciento, Y₂ = Capacidad de carga CC por ciento.

Como variables independientes se consideró el pH de las soluciones de quitosano (X₁); Relación de masa de quitosano-QS entre el aceite esencial de chincho-AEC (X₂) (p/v); y relación másica de quitosano-QS entre tripolifosfato de sodio-TTP (X₃) (p/p), sobre dos variables dependientes: Porcentaje de eficiencia de encapsulación (EE) obtenida de la

Ecuación (6) como Y_1 , y porcentaje de capacidad de carga (CC) calculado utilizando la Ecuación (7) como Y_2 . Este diseño experimental se puede observar en la Tabla 21. Todos los parámetros en estudio y sus respectivos valores de este DBB se pueden observar en la sección de materiales y métodos.

4.2.1.2. Análisis estadístico

Para todas las variables dependientes (Eficiencia de encapsulación- Y_1 , y Capacidad de carga- Y_2), el análisis de varianza se realizó utilizando el diseño de Box-Behnken (DBB) y ciertos parámetros, incluidos el valor p, el valor F, y el valor F del modelo, se obtuvieron mediante ANOVA aplicando el software Design Expert.

Tabla 22: Adecuación del modelo y estadísticas de resumen del modelo para la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga

| Fuente | Y_1 | | Y_2 | |
|-------------------------------|------------|----------------------------|------------|----------------------------|
| | F-Valor | p-Valor Prob > F | F-Valor | p-Valor Prob > F |
| Modelo | 58.10 | < 0.0001* | 106.09 | < 0.0001* |
| X ₁ | 76.84 | < 0.0001* | 140.78 | < 0.0001* |
| X ₂ | 5.20 | 0.0566 | 60.73 | 0.0001* |
| X ₃ | 152.17 | < 0.0001* | 211.18 | < 0.0001* |
| X ₁ X ₂ | 6.58 | 0.0373* | 24.67 | 0.0016* |
| X ₁ X ₃ | 45.09 | 0.0003* | 49.86 | 0.0002* |
| X ₂ X ₃ | 26.00 | 0.0014* | 12.46 | 0.0096* |
| X ₁ ² | 9.03 | 0.0198* | 44.53 | 0.0003* |
| X ₂ ² | 11.47 | 0.0116* | 51.78 | 0.0002* |
| X ₃ ² | 189.87 | < 0.0001* | 360.44 | < 0.0001* |
| Lack of Fit | 5.72 | 0.0626 no significativo | 3.00 | 0.1583 no significativo |
| R² análisis | | | | |
| R ² | 0.9868 | | 0.9927 | |
| R ² ajustado | 0.9698 | | 0.9834 | |
| R ² predicho | 0.8247 | | 0.9159 | |
| Precisión adecuada | 27.4914 | | 30.1171 | |
| Modelo | | | | |
| Remark | Cuadrático | | Cuadrático | |

X₁ = pH de solución de quitosano QS, X₂ = QS: AEC (p/v), X₃ = Quitosano: TPP (p/p), Y₁ = Eficiencia de Encapsulación EE por ciento, Y₂ = Capacidad de carga CC por ciento.

El mejor modelo para ajustar todas las variables de respuesta fue el cuadrático, si se compara con todos los demás modelos (primer orden), y se validó mediante ANOVA (multifactor). El resumen de ANOVA para el modelo cuadrático se presenta en la Tabla 22.

Se evidenció que el valor p para todas las respuestas (Y_1 y Y_2) fue < 0.0001 , lo que es necesario para confirmar que las variables independientes mostraron un efecto significativo sobre las variables de respuesta investigadas. El valor F de las variables de respuesta, demostró que se recomiendan valores más altos para proporcionar pocos errores en el modelo. Los valores F del modelo para Y_1 e Y_2 fueron 58.10 y 106.09, respectivamente, lo que muestra un modelo significativo. Debido al ruido residual, solo hay un 0.01 por ciento de posibilidades de que se produzca este gran valor F del modelo. En cuanto a la falta de ajuste, es obligatorio que sea no significativa para ajustar el modelo y confirmar su eficiencia (Soliman *et al.* 2022).

4.2.1.3. Efecto de las variables independientes en la eficiencia de encapsulación (Y_1)

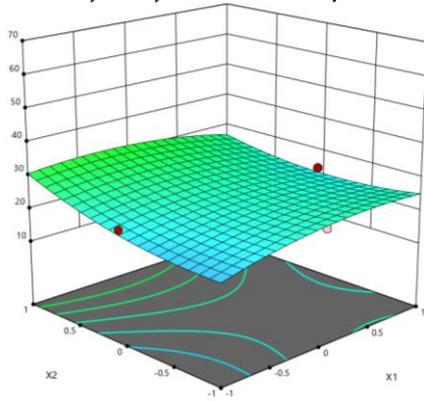
La eficiencia de encapsulación es un parámetro muy importante, ya que los aceites esenciales son química y físicamente inestables durante su vida útil, lo que podría limitar su uso para nuevas formulaciones de alimentos (Shetta *et al.* 2019; Natrajan *et al.* 2015). Estos problemas técnicos podrían resolverse utilizando técnicas de encapsulación. Por lo tanto, los aceites esenciales pueden actuar como antimicrobianos y antioxidantes en el procesamiento de alimentos, mejorando la seguridad alimentaria y la vida útil (Zhang *et al.* 2019; Pabast *et al.* 2018).

Se determinó el porcentaje de la eficiencia de encapsulación de varias formulaciones del sistema organogel de nanopartículas de aceite esencial de chincho, y los valores obtenidos se resumen en la Tabla 21. El porcentaje de EE de la formulación varió entre 12.15 ± 0.44 y 52.92 ± 0.65 . Es muy importante notar que se encontró una relación inversa entre la eficiencia de encapsulación de las formulaciones del sistema organogel de nanopartículas de aceite esencial de chincho y la concentración de las diferentes variables independientes utilizadas. Un valor positivo o negativo (Ecuación 12) está relacionado con un efecto positivo o negativo sobre la respuesta estudiada (Y_1), respectivamente.

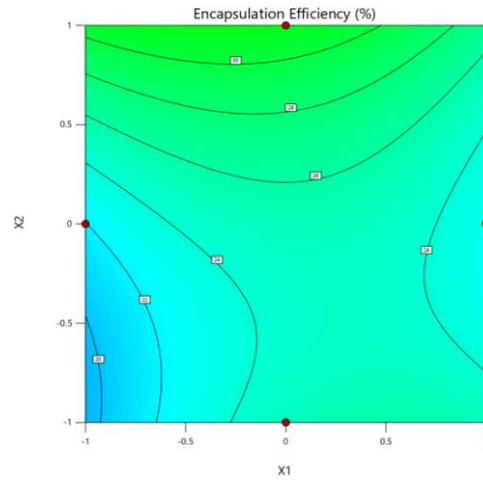
Eficiencia de encapsulación (Y_1):

$$20.78 - 5.79 X_1 - 1.51 X_2 - 8.16 X_3 - 2.40 X_1 X_2 + 6.28 X_1 X_3 + 4.77 X_2 X_3 - 2.74 X_1^2 + 3.09 X_2^2 + 12.56 X_3^2 \quad (12)$$

Porcentaje de eficiencia de encapsulación

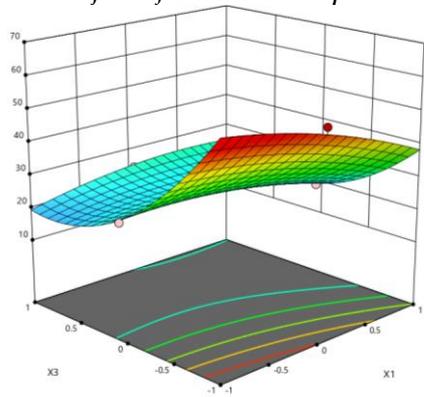


(a)

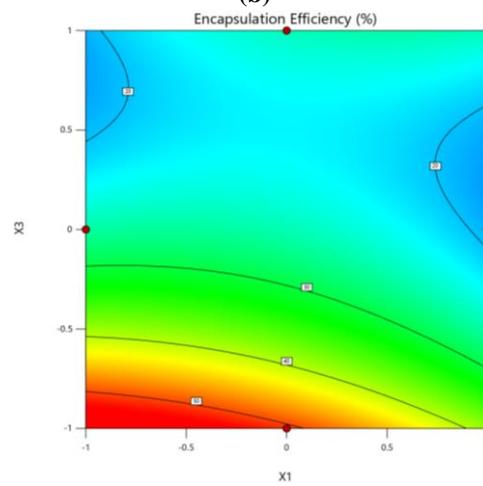


(b)

Porcentaje de eficiencia de encapsulación

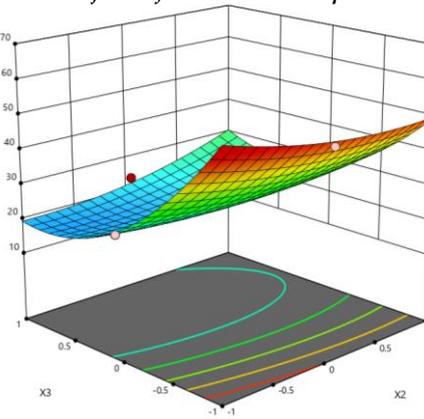


(c)

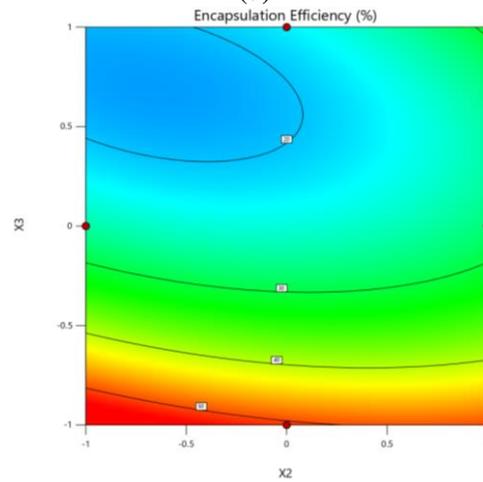


(d)

Porcentaje de eficiencia de encapsulación



(e)



(f)

Figura 11: Gráficos del modelo. Optimización de la eficiencia de encapsulación

(a) Gráficas de superficie de respuesta tridimensional que muestran el efecto de las variables ($X_1 = \text{pH}$ (4.4) y $X_2 = \text{Quitosano: Aceite esencial de Chincho}$ (p/v) (1: 0.7)) sobre la respuesta (Eficiencia de encapsulación), (b) Gráfico de contorno 2D, (c) Gráficos de superficie de respuesta 3D que muestran el efecto de las variables ($X_1 = \text{pH}$ (4.4) y $X_3 = \text{Quitosano: TPP}$ (p/) (1:0.46)) sobre la variable de respuesta (Eficiencia de encapsulación, (d) gráfico de contorno 2D, (e) Gráficas de superficie de respuesta 3D que muestran el efecto de las variables ($X_2 = \text{Quitosano: AEC}$ (p/v) (1:0.7) y $X_3 = \text{Quitosano: TPP}$ (p/p) (1:0.46)) en la variable de respuesta (Eficiencia de encapsulación) y (f) gráfico de contorno 2D.

De acuerdo con la ecuación 12, con la solución de pH más bajo ($\text{pH} = 4.0$) de X_1 , X_2 y X_3 , se observó un aumento constante en la eficiencia de encapsulación de la formulación, y esto ciertamente se debe a los parámetros de la formulación (Almeida *et al.* 2019; de Pinho Neves *et al.* 2014). El efecto de la ecuación se enfatizó y representó mediante una superficie de respuesta en 3D y un gráfico de contorno en 2D, como se muestra en la Figura 11.

Cuanto menor es la relación de quitosano-QS: Tripolifosfato de sodio-TTP QS: TPP (p/p) (X_3), mayor es la eficiencia de encapsulación (Figura 11 c, e). El efecto combinado de pH (X_1) y QS: TPP (X_3) fue positivo para la variable respuesta (Figura 11 c), y el efecto de pH (X_1) y QS: AEC (X_2) fue negativo sobre la variable respuesta (Figura 11 a).

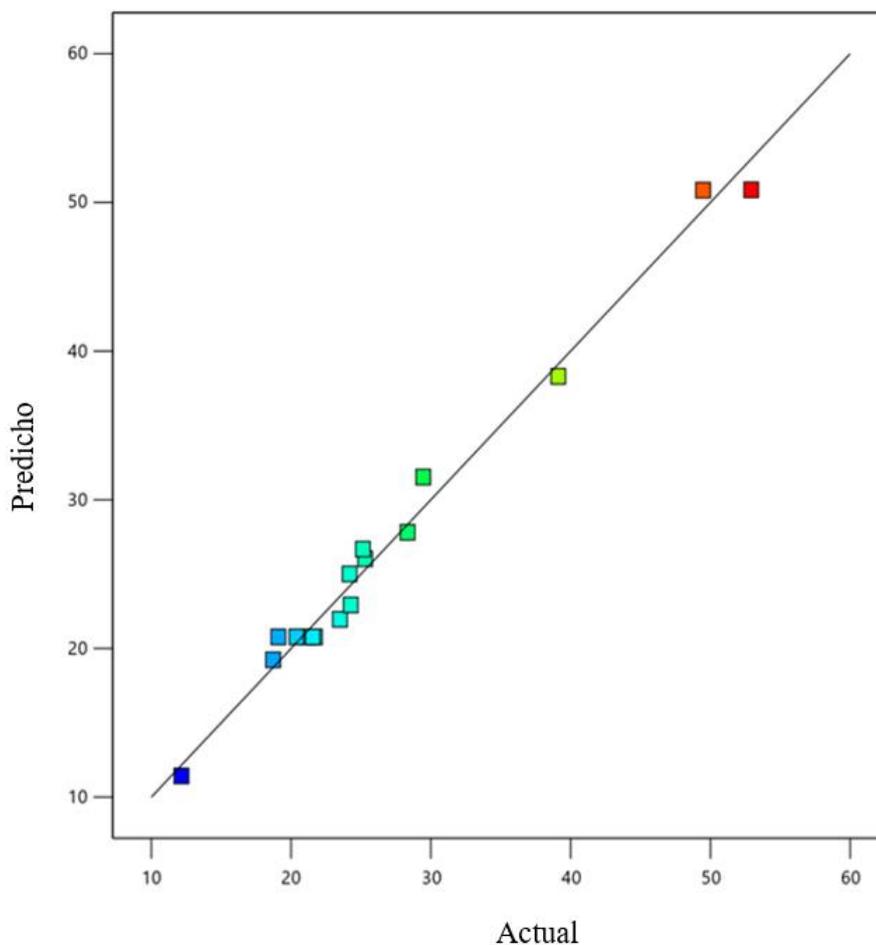


Figura 12: Gráfica de correlación lineal entre los valores actual y predicho para la respuesta de eficiencia de encapsulación (Y_1)

Como se muestra en la Figura 12, se encontró una correlación lineal entre las respuestas pronosticadas y las reales, donde el R^2 pronosticado para la respuesta Y_1 fue (0.8247), que estuvo en concordancia aceptable con el R^2 ajustado (0.9698), como puede observarse en la Tabla 22.

El valor de R^2 (0.9868) también indica que puede recomendar el modelo cuadrático, sumando a eso la precisión adecuada (27.4914), que es un valor deseable para dilucidar una señal adecuada y que muestra la robusta credibilidad del modelo. Además, el Lack of Fit no fue significativo ($p = 0.0626$). Asimismo, la Figura 12 muestra los valores residuales que se distribuyeron entre los dos lados de la línea, lo que significa que los datos reales y los valores predichos tenían una correlación creíble entre sí.

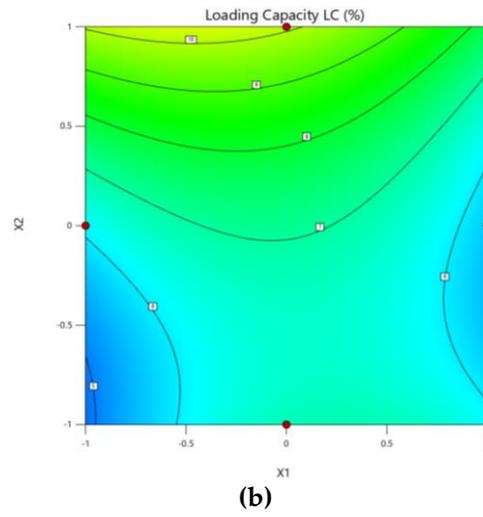
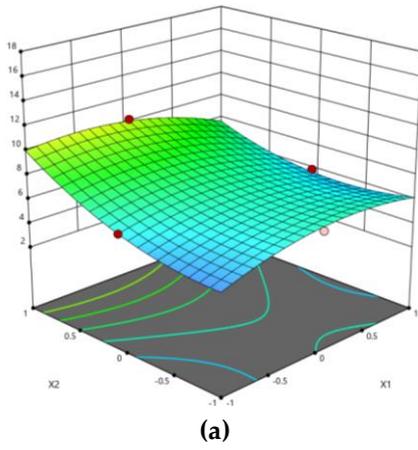
4.2.1.4. Efecto de las variables independientes sobre la capacidad de carga (Y_2)

La capacidad de carga corresponde a la concentración final de AEC en el 100 por ciento de la cantidad del constituyente utilizado para sintetizar las nanopartículas. Como se muestra en la Tabla 21, se determinó la capacidad de carga del aceite esencial de chincho encapsulado en el sistema organogel de nanopartículas de quitosano, y los valores variaron de 3.86 por ciento a 12.97 por ciento. Se encontró que estos resultados concuerdan con los informados por Keawchaon y Yoksan (2011), quienes informaron sobre la capacidad de carga de la encapsulación de carvacrol en los rangos de valores de 3 a 21 por ciento y de 14 a 31 por ciento.

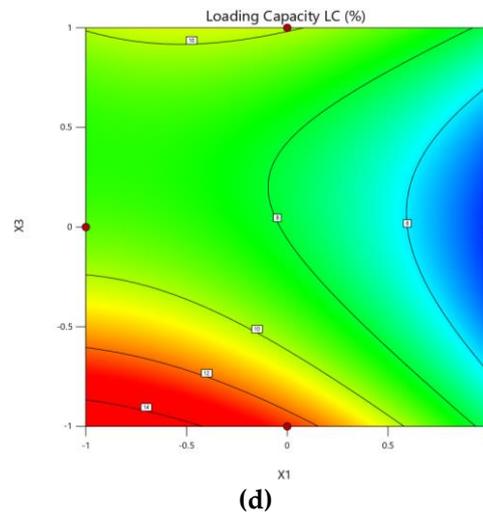
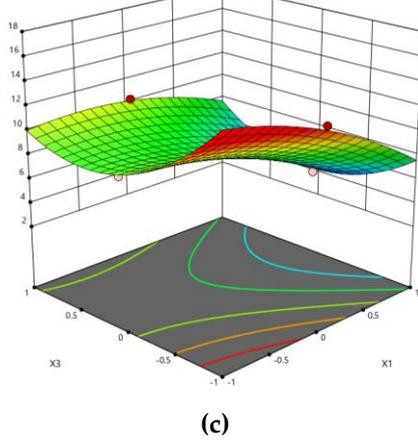
De manera similar Shetta *et al.* (2019) los valores de capacidad de carga informados de los aceites encapsulados (aceites esenciales de menta y té verde) oscilaron entre 8.15 y 22.2 por ciento y entre 2.2 y 23.1 por ciento. Se evaluaron las características de los contenidos de capacidad de carga de AEC de las formulaciones de nanopartículas de quitosano, y el resultado se muestra en la Figura 13. En AEC encapsulado, los resultados indicaron que la capacidad de carga aumentó en función del contenido inicial de AE, alcanzando su nivel máximo en 1:1 p/p con los AEC.

Los valores obtenidos mostraron una buena capacidad de carga, lo que demuestra que la afinidad del AEC con el material de la pared (quitosano), y la metodología utilizada, fue eficiente para obtener los AEC-QSNP (De Campo *et al.* 2017). Figura 13e muestra un aumento considerable en la capacidad de carga de AEC de las formulaciones de nanopartículas de quitosano, que se observó al aumentar la concentración de los factores independientes X_2 y X_3 .

Porcentaje de capacidad de carga



Porcentaje de capacidad de carga



Porcentaje de capacidad de carga

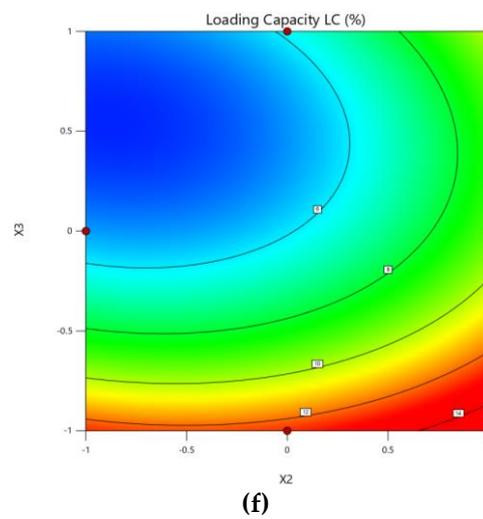
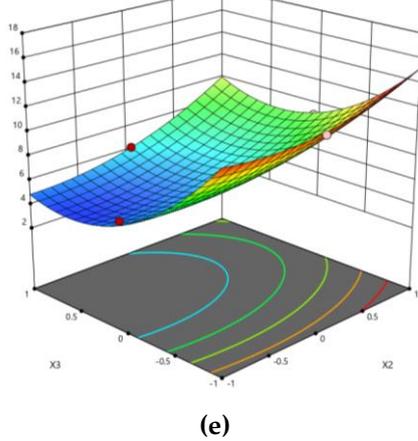


Figura 13: Gráficos del modelo. Optimización de la capacidad de carga

*(a) Gráficas de superficie de respuesta tridimensional que muestran el efecto de las variables ($X_1 = \text{pH (4.4)}$ y $X_2 = \text{Quitosano: Aceite esencial de Chincho (p/v) (1:0.7)}$) sobre la respuesta (Capacidad de carga), (b) Gráfico de contorno 2D, (c) Gráficos de superficie de respuesta 3D que muestran el efecto de las variables ($X_1 = \text{pH (4.4)}$ y $X_3 = \text{Quitosano: TPP (p/p) (1:0.46)}$) sobre la respuesta (Capacidad de carga), (d) gráfico de contorno 2D, (e) gráficos de superficie de respuesta 3D que muestran el efecto de las variables ($X_2 = \text{Quitosano: AEC (p/v) (1:0.7)}$ y $X_3 = \text{Quitosano: TPP (p / p) (1:0.46)}$) en respuesta (Capacidad de carga) y (f) gráfico de contorno 2D.

La Ecuación (13) interpreta la influencia previamente establecida de las variables independientes X_1 , X_2 y X_3 sobre la respuesta de la capacidad de carga Y_2 .

Capacidad de carga (Y_2):

$$5.58 - 1.56 X_1 + 1.03 X_2 - 1.91 X_3 - 0.9250 X_1 X_2 + 1.32 X_1 X_3 + 0.6575 X_2 X_3 - 1.21 X_1^2 + 1.31 X_2^2 + 3.45 X_3^2 \quad (13)$$

Como se muestra en la Figura 13, el efecto de la Ecuación (13) se representó mediante una superficie de respuesta 3D y un gráfico de contorno 2D.

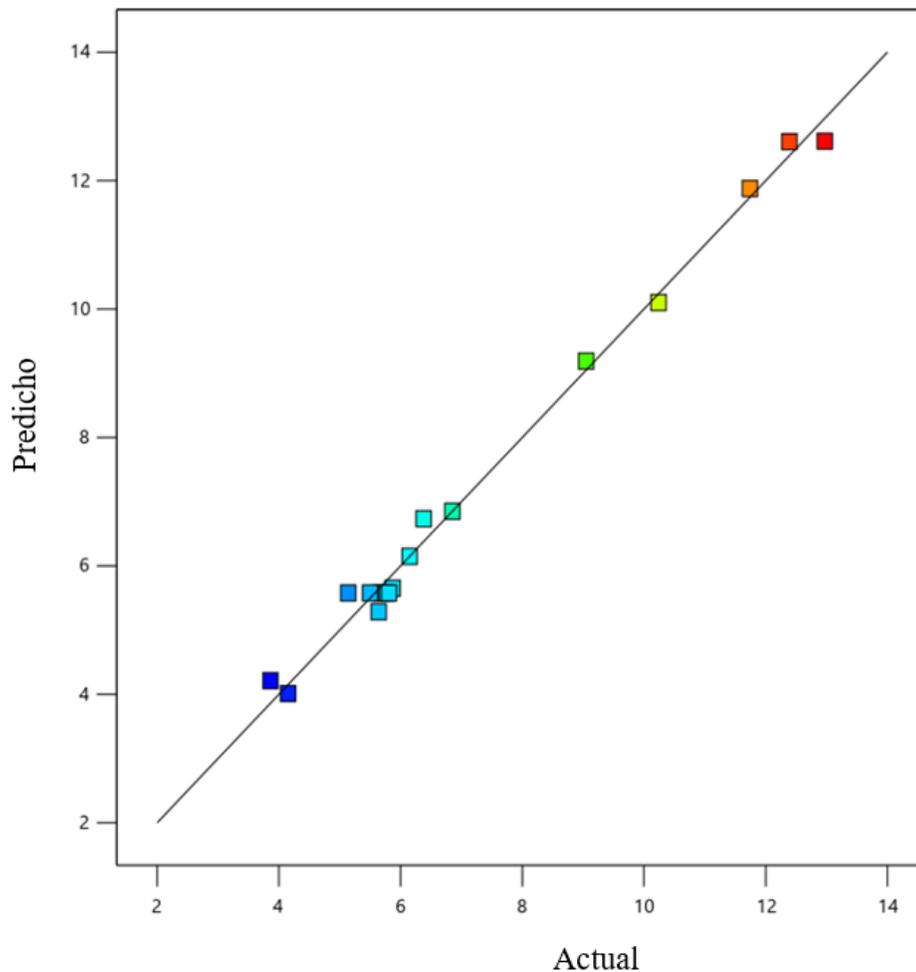


Figura 14: Gráfica de correlación lineal entre los valores actual y predicho para la respuesta de la capacidad de carga (Y_2)

En la Figura 14, hubo una relación lineal entre las respuestas pronosticadas y las reales, ya que se encontró que el R^2 pronosticado (0.9159) estaba en una armonía sensible con el ajustado (0.9834), porque los datos son similares, como se muestra en la Tabla 22. Además, el valor de R^2 (0.9927) indica que el sistema podría soportar el modelo y el valor de precisión adecuada (30.1171), que es un valor recomendado para el espacio de diseño. Además, la falta de ajuste no fue significativo ($p = 0.1583$).

4.2.1.5. Optimización del proceso de encapsulación

Los AEC-QSNP optimizados se produjeron utilizando la misma metodología seguida para las 17 formulaciones de prueba. La formulación optimizada se preparó sobre la base de los valores proporcionados por Design Expert (software Design Expert ® versión 13, State Ease Incorporation, Minneapolis, MN, EE. UU.) después del análisis de 17 formulaciones de prueba para variables independientes. El proceso de optimización depende de orientar las respuestas (Y_1 , Y_2) hacia ciertos criterios que se espera que alteren la fórmula optimizada. Los criterios seleccionados en este estudio fueron maximizar la eficiencia de encapsulación y maximizar la capacidad de carga.

Los valores reales calculados después de la optimización para el pH (X_1), relación de Quitosano: Aceite esencial de Chincho (p/v) (X_2) y relación de Quitosano: TPP (p/p) (X_3) fueron 4.4, 1:0.7 (p/v) y 1:0.46 (p/p), respectivamente. Los valores predichos de las respuestas para la optimización basada en mayor deseabilidad fueron 50.85 para Y_1 por ciento y 11.87 para Y_2 por ciento. Los resultados experimentales se presentan en la Tabla 23. Cuando se preparó la formulación optimizada de los AEC-QSNP utilizando los valores reales de las variables independientes, los valores reales de las respuestas fueron 52.64 ± 2.44 para Y_1 por ciento y 11.56 ± 0.55 para Y_2 por ciento.

Otros estudios muestran valores cercanos a la eficiencia de encapsulación por el método de gelificación iónica de 55.8-73.4 por ciento Hadidi *et al.* (2020). Los valores reales de las respuestas estaban cerca de los valores predichos y eran notoriamente cercanos entre sí.

Los AEC-QSNP optimizados se procesaron para su caracterización (tamaño de partícula, potencial zeta, PDI), composición química, microscopía electrónica de barrido (SEM), FTIR, estudio de liberación *in vitro* y actividad antimicrobiana.

Tabla 23: La respuesta de los valores predichos y experimentales de las condiciones optimizadas

| Respuesta (Porcentaje) | Valor predicho | Valor Experimental |
|-----------------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Y ₁ | 50.85 | 52.64 ± 2.44 |
| Y ₂ | 11.87 | 11.56 ± 0.55 |

Y₁ = Porcentaje de Eficiencia de encapsulación EE, Y₂ = Porcentaje de capacidad de carga CC

4.2.1.6. Caracterización de formulaciones optimizadas

En la Figura 15 se puede observar las nanopartículas de quitosano y las nanopartículas optimizadas cargadas con aceite esencial de chincho.

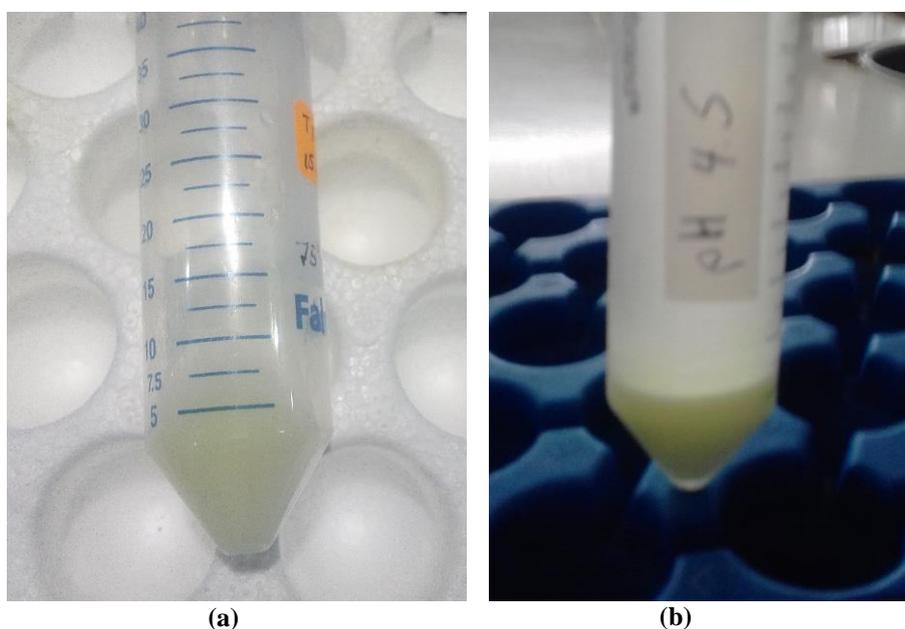


Figura 15: Fotografía de (a) Nanopartículas de quitosano (QSNP) (b) Nanopartículas de quitosano cargadas con aceite esencial de chincho (AEC-QSNP)

4.2.1.6.1. Tamaño de partícula, potencial zeta e índice de polidispersidad (PDI)

Se examinó el tamaño de nanopartícula hidrodinámica de QSNP y AEC-QSNP, y los valores obtenidos fueron el promedio de tres mediciones independientes. Los tamaños medios de partículas hidrodinámicas, el potencial Zeta y el PDI de los QSNP fueron 284.85 ± 1.04 nm, 21.49 ± 1.64 mV y 0.359 ± 0.01 respectivamente (Tabla 24).

Tabla 24: Caracterización de los (QSNP) cargados con (AEC) optimizados en términos de eficiencia de encapsulación, capacidad de carga, tamaño medio de partículas hidrodinámicas, potencial Zeta e índice de polidispersidad (PDI)

| Formulación | EE (porcentaje) | CC (porcentaje) | Tamaño de partícula (nm) | Potencial Z (mV) | PDI |
|-------------|-----------------|-----------------|--------------------------|------------------|--------------|
| QSNP | -- | -- | 284.85 ± 1.04 | 21.49 ± 1.64 | 0.359 ± 0.01 |
| AEC-QSNPs | 52.64 ± 2.44 | 11.56 ± 0.55 | 458.5 ± 0.06 | 23.30 ± 2.15 | 0.418 ± 0.02 |

Datos expresados como media ± DE (n = 3); QSNP: nanopartículas de quitosano; AEC-QSNPs: nanopartículas de quitosano de aceite esencial de chincho.

El tamaño de partícula y el potencial Zeta de los AEC-QSNP optimizados fueron 458.5 ± 0.06 nm y 23.30 ± 2.15 mV, respectivamente (Figura 16). Los valores de tamaño de partícula fueron similares a los reportados por Shetta *et al.* (2019), quienes nanoencapsularon aceite de menta 252.6 nm y té verde 256.3 nm. Asimismo, Zhang *et al.* (2019), mostro valores de la nanoencapsulación del aceite de *Paulownia Tomentosa* con un valor de 185 nm. De igual manera, se nanoencapsulo aceite esencial de *Satujera hortensis*, con valores entre 135.52 y 237.40 nm (Feyzioglu *et al.* 2016). A diferencia de este estudio, otros autores lograron encapsular nanopartículas de quitosano cargadas con carvacrol con un diámetro de 40-80 nm Keawchaon y Yoksan (2011).

Con respecto al tamaño de partícula, éste difiere según la clasificación propuesta. Algunos autores, mencionan que el tamaño de diámetro de los nanoencapsulados debería de ser < 200 nm y que el tamaño de la nanopartícula depende de las técnicas de nanoencapsulación y tipo de material utilizado (Mahdi 2017). Otros estudios mencionan que podrían tener valores < 1000 nm Joye (2021); Sanguansri y Agustín (2006). Por otro lado, según la definición de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), las partículas con un rango de tamaño de 1 a 100 nm se definen como nanopartículas (Jafari 2017).

La incorporación de AEC influye significativamente en el tamaño de las nanopartículas. Por otro lado, los valores obtenidos no indican una variación considerable en los potenciales zeta de las formulaciones, lo que podría estar relacionado con la naturaleza química no cargada del aceite esencial de chincho (Ibraheem *et al.* 2014). Los valores de PDI de AEC-QSNP fueron 0.418 más altos (0.2), lo que sugiere una medida de la falta de uniformidad que existe en la distribución del tamaño de las partículas (Shahab *et al.* 2020) (Tabla 24).

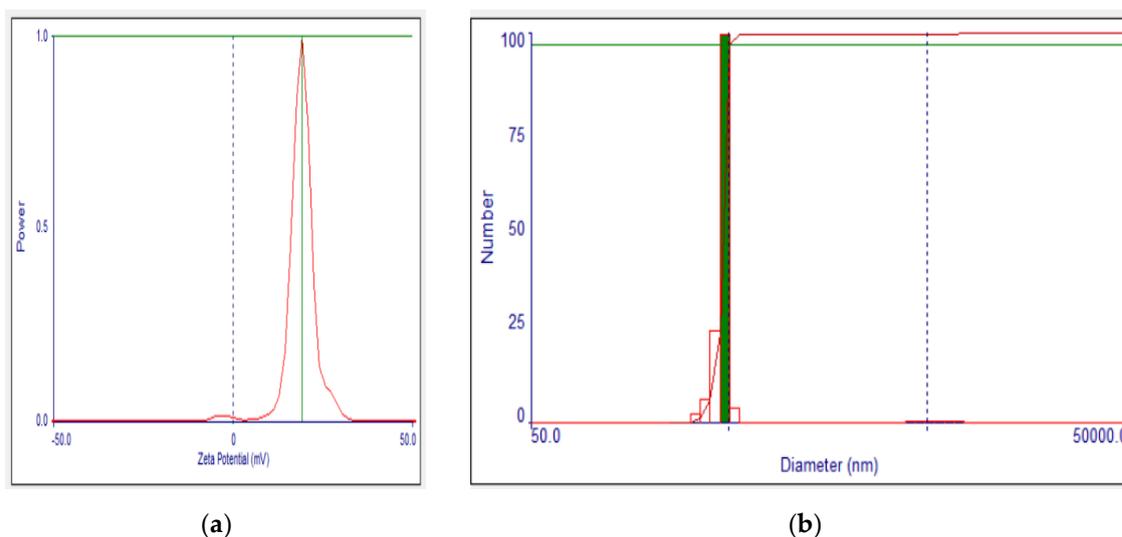


Figura 16:(a) Distribución de tamaño de partícula promedio y (b) gráficos de potencial zeta de (AEC-QSNP) optimizados

4.2.1.6.2. Análisis cromatográfico por (GC-MS) del nanoencapsulado del aceite esencial de *T. elliptica* Sm

La Tabla 25 muestra la composición química por el análisis GC-MS del nanoencapsulado del aceite esencial de las hojas de la *T. elliptica* Sm. que contenía 7 componentes principales. El análisis de GC-MS evidenció que el 2,4-ditertbutilfenol 31.69 por ciento contenía la mayor composición de los constituyentes, seguido de la dihidrotagetona 19.70 por ciento, el óxido de *cis*-Linalool 19.29 por ciento, el Epóxido de β -Ocimeno 11.29 por ciento y la *cis*-Tagetenona 10.31 por ciento. La dihidrotagetona y la *cis*-Tagetenona fueron los únicos compuestos encontrados igualmente en las hojas del aceite esencial de chincho sin encapsular (Tabla 19), estos estudios son similares a los reportados en la familia Tagetes Cruz *et al.* (2021); Arena *et al.* (2018).

Además, se encontró el óxido de *cis*-linalool que es uno de los compuestos principales que otorga los aromas florales de la naturaleza, este compuesto representa cerca del 70 por ciento de los terpenoides y se encuentra en más de 200 especies de plantas de diferentes familias (Aprotosoia *et al.* 2014). Todos los compuestos encontrados que fueron encapsulados con el quitosano han demostrado ser eficaces en la inhibición contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (O'Callaghan *et al.* 2016), además las nanopartículas de quitosano ha demostrado ser un excelente potencial como sustrato en la producción de compuestos de valor añadido en la industria alimentaria (Medina *et al.* 2019).

Tabla 25: Composición química del nanoencapsulado del aceite esencial de hojas de *T. elliptica* Sm

| No | Componentes | T _r ^a | Área (porcentaje) |
|----|---|-----------------------------|-------------------|
| 1 | Dihidrotagetona | 16.9 | 19.70 ± 0.22 |
| 2 | Epóxido de β-ocimeno | 18.2 | 11.29 ± 0.60 |
| 3 | Desconocido (C ₈ H ₁₆ O) | 19.0 | 3.19 ± 0.17 |
| 4 | <i>cis</i> -Tagetenona | 22.5 | 10.31 ± 0.12 |
| 5 | Óxido de <i>cis</i> -linalool | 23.7 | 19.29 ± 0.22 |
| 6 | Desconocido (C ₁₀ H ₁₈ O ₂) | 26.3 | 4.54 ± 0.16 |
| 7 | 2.4-ditertbutilfenol** | 30.0 | 31.69 ± 0.47 |

**Mayor componente

T_r^a: Tiempo de retención (min.)

4.2.1.6.3. Morfología de la superficie del nanoencapsulado de aceite esencial de *T. elliptica* Sm. con quitosano

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido (SEM) para el análisis morfológico de los QS (Figura 17 a, b) y AEC-QSNP (Figura 17 c, d) preparados por el método de gelificación iónica. Para la nanoencapsulación de partículas QS, no se observó aglomeración del sistema organogel de nanopartículas, como se puede observar en la (Figura 17 a,b).

Los resultados de la morfología superficial fueron similares a los informados por de Pinho Neves *et al.* (2014). Además, se puede ver en los resultados de la micrografía electrónica de transmisión que las nanopartículas AEC (Figura 17 c, d) muestran una forma redondeada y uniforme, similar a la reportada por Sharififard *et al.* (2021) para el aceite esencial *Origanum vulgare* y Detsi *et al.* (2020) para algunos extractos naturales encapsulados en quitosano por el método de gelificación iónica utilizando tripolifosfato.

Los resultados mostraron que el sistema de organogel de nanopartículas elaborado con esta formulación optimizada no presentó agregación entre ellas, lo cual estuvo relacionado con la carga en la superficie de los encapsulados y el potencial Z determinado (23.30 ± 2.15 mV) (Tabla 24), que predice buena estabilidad (Shetta *et al.* 2019).

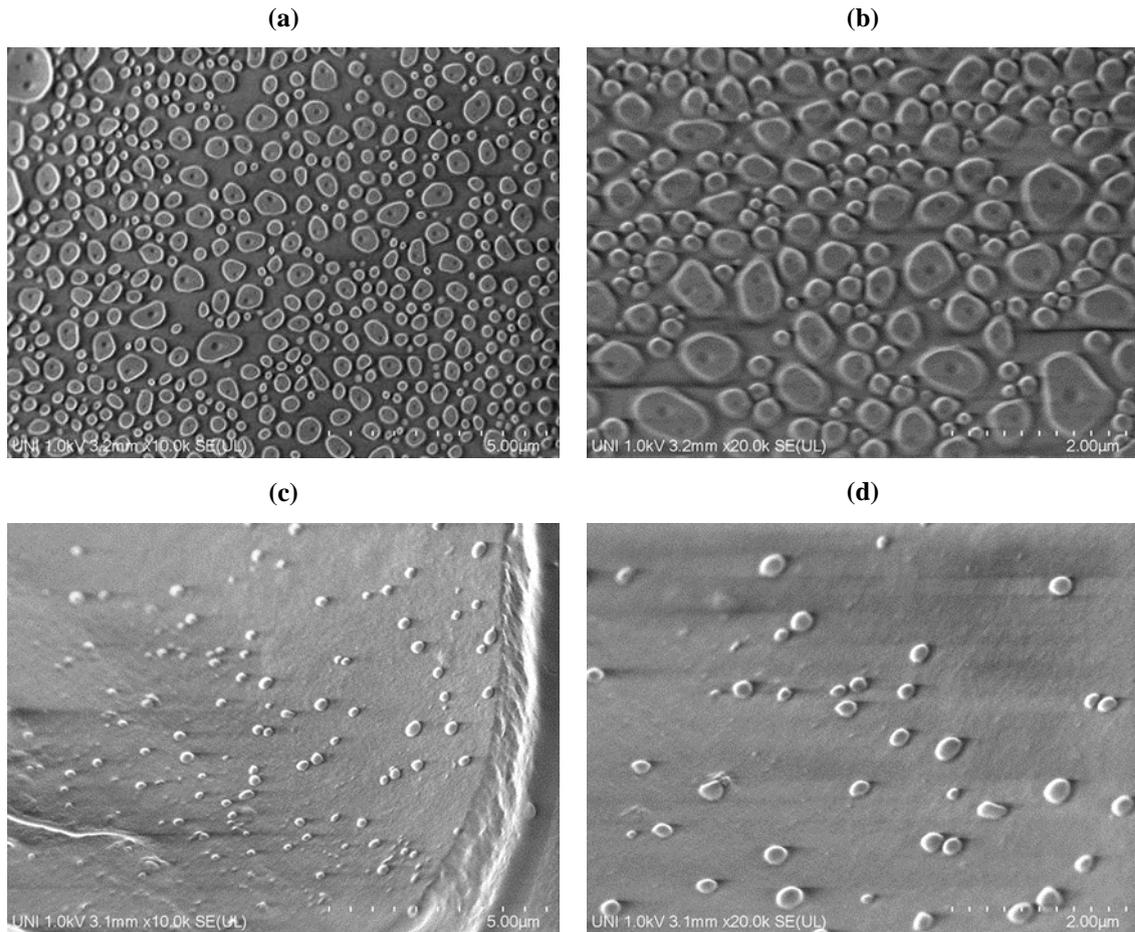


Figura 17: Micrografías de microscopio electrónico de barrido (SEM) de (QSNP) con (a) aumento de 10000X y (b) aumento de 20000X, y los (AEC-QSNP) optimizados con (c) aumento de 10000X y (d) aumento de 20000X

El análisis morfológico por SEM mostró un diámetro medio de los AEC-QSNP de aproximadamente 458.5 nm (Tabla 24), lo que valida los resultados anteriores obtenidos con la dispersión dinámica de la luz. Una vista a 10000X y 20000X (Figura 17 c, d) permitieron observar una dispersión en el interior de la nanopartícula, lo que probablemente podría significar la distribución del AEC formado en la matriz. Los puntos de vista fueron similares a lo reportado por Pashkunova *et al.* (2010) en hidrogel de quitosano liofilizado.

La microscopía electrónica de barrido es una buena técnica para determinar las características morfológicas de las partículas en estas estructuras tridimensionales (Alves *et al.* 2019), como los organogeles y las nanopartículas. Este estudio fue similar a lo reportado por Li *et al.* (2022); Glowka *et al.* (2014) en el que los microorganogeles y las nanopartículas, respectivamente, tenían forma de esfera.

4.2.1.6.4. Análisis de espectrofotometría infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR-ATR)

Los aceites esenciales de las hierbas aromáticas son sistemas de mezcla complejos, en la Figura 18 (a) se muestra las nanopartículas de quitosano QSNP, (b) las nanopartículas de quitosano cargadas con aceite de chincho AEC-QSNP, (c) el aceite esencial de chincho-AEC.

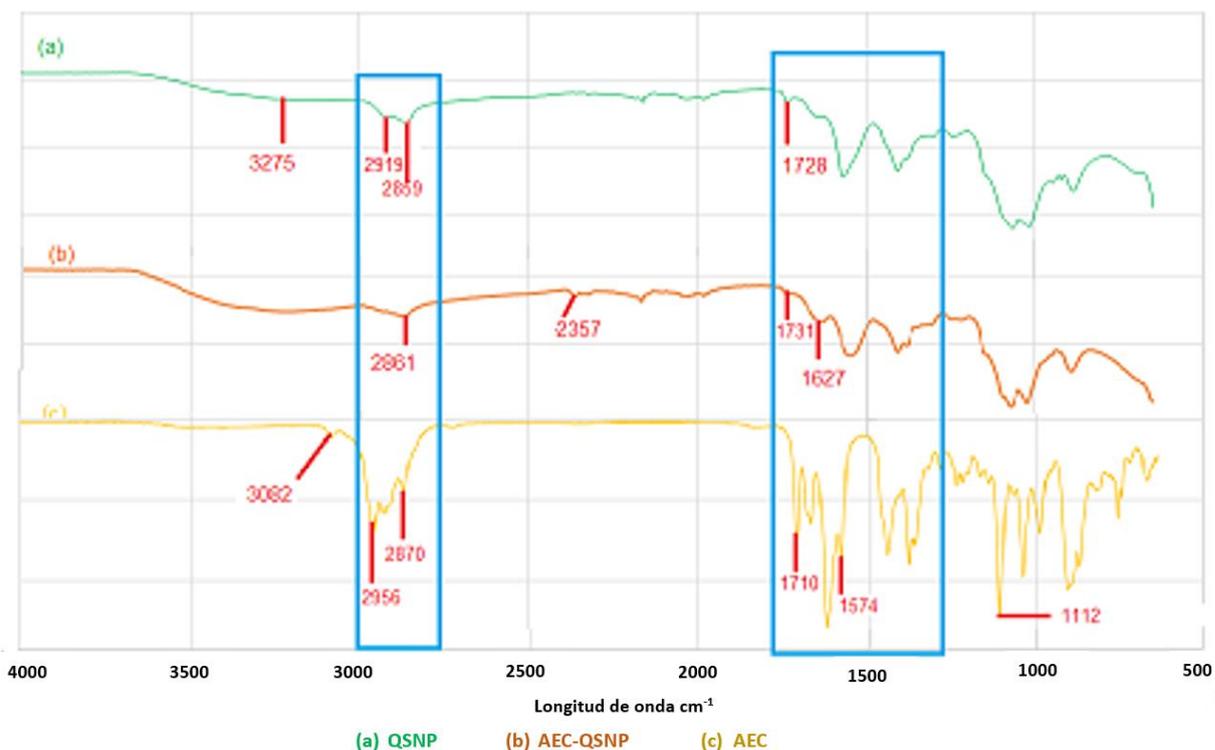


Figura 18: Espectros FTIR de (a) Nanopartículas de quitosano (QSNP), (b) Nanopartículas de quitosano cargadas con aceite de chincho (AEC-QSNP), (c) Aceite esencial de chincho-AEC

Los picos para QSNP se encuentran principalmente en la banda característica de 3275 cm^{-1} , que representa la Figura 18, en general las nanopartículas de quitosano (a) exhibió la banda característica en 3275 cm^{-1} que representa el estiramiento de NH- el estiramiento de O-H unido por hidrógeno lo que coincide con lo reportado por Xu *et al.* (2020); Ahmadi *et al.* (2018); Liu y Liu (2020), mientras que el pico de 2919 y 2859 cm^{-1} , se atribuye a la vibración de estiramiento de C-H del carbono sp^3 (Mondéjar *et al.* 2022) y el de 1083 cm^{-1} atribuyéndolo a la vibración de estiramiento C=O.

Los picos ocurridos en 1728 cm^{-1} , 1656 cm^{-1} de quitosano podrían atribuirse a las bandas de estiramiento C-O de la amida I y amida II) y 1593 cm^{-1} debido a la flexión NH_2 ,

respectivamente, lo que coincide con los estudios realizados por los autores Xu *et al.* (2020); Liu y Liu (2020); Bashiri *et al.* (2020); Song *et al.* (2021).

Los espectros (c) AEC puros muestran picos característicos definidos en 3082 cm^{-1} ; 2956 cm^{-1} y 2870 cm^{-1} característico de estiramiento de C-H o estiramiento de carboxilo O-H y 1574 cm^{-1} de flexión NH_2 , 1710 cm^{-1} a 1574 cm^{-1} de estiramiento C-O-C, 1112 cm^{-1} de estiramiento C-O-C y 909 cm^{-1} de estiramiento C flexión H, las bandas tiene una gran similitud con el aceite de canela y aceite esencial de ajo (Bashiri *et al.* 2020; Mondéjar *et al.* 2022; Song *et al.* 2021). Los espectros de (b) nanopartículas AEC-QSNP mostraron un espectro similar al quitosano, con algunos cambios las bandas de amida I y amina II cambiaron 1728 cm^{-1} , 1656 cm^{-1} y 1593 cm^{-1} a 1731 cm^{-1} , 1627 cm^{-1} y 1542 cm^{-1} , los picos indican claramente que los aceites se cargaron con éxito en las nanopartículas de quitosano, nuestros resultados fueron similares a los reportados por investigaciones recientes Ahmadi *et al.* (2018); Su *et al.* (2020). Además, apareció un nuevo pico que mostraba las interacciones electrostáticas entre QS y AEC, a 2357 cm^{-1} . Por otro lado, 3082 cm^{-1} , no se visualiza en el espectro (b), lo que indica que existe una interacción con el aceite esencial de chincho y el quitosano.

4.2.1.6.5. Liberación del aceite esencial de chincho en condiciones *in vitro*

El estudio de liberación *in vitro* de AEC a partir de AEC-QSNP se llevó a cabo durante 6 h en diferentes tampones de $\text{pH} = 3$ y $\text{pH} = 7$, su modelo matemático para ambas muestras presento las siguientes ecuaciones ($y = -0.6765x^2 + 6.8279x + 2.5966$) y ($y = -0.8717x^2 + 7.8079x + 2.1937$). Como se muestra en la Figura 19, la tasa de liberación acumulada de los QSNP de AEC en tampón de acetato ($\text{pH} = 3$) de 0 a 6 h fue de 20.87 ± 0.66 por ciento, el incremento de liberación del AEC presento diferencias significativas ($p < 0.05$) a cada hora, durante las 6 h. Mientras que en el tampón de fosfato ($\text{pH} = 7$) la liberación acumulada fue solo de 18.80 ± 0.77 por ciento, donde la liberación fue significativa ($p < 0.05$), pero el porcentaje de liberación no fue significativa ($p > 0.05$) en la (3h y 4h) y (5h y 6h). En ambos casos se demuestra que la liberación es lenta de los AEC-QSNP.

La liberación de los ingredientes activos del AEC, se debe en parte a la baja resistencia mecánica del sistema de organogel de nanopartículas de quitosano/TPP y la liberación puede minimizarse aumentando la resistencia mecánica de la partícula (Shu *et al.* 2002). La liberación controlada está relacionada con el aumento de la concentración de polímero; el

alimento podría tener una mejor protección, lo que provocaría un retraso en la liberación del compuesto bioactivo (Kamaly *et al.* 2016).

Algunos estudios reportan que el aceite esencial de orégano elaborado con nanopartículas de perlas de alginato, recubiertas cargadas en la cinética de liberación de aceite en un medio líquido, simularon una solución de marinado de carne; en el cual afirman que las nanopartículas podrían utilizarse como un agente antimicrobiano natural. Además, es fundamental conocer el efecto de estos procesos en la aplicación de los alimentos, debido a que estos factores afectan su perfil de liberación y reducen o prolongan su efecto. Los organogelatinas son semisólidos y tienen varias características únicas, como la lubricidad superficial y la capacidad antisecado, que despiertan un interés particular en diversas aplicaciones prácticas. Se utilizan como sistemas de entrega, pero son relativamente nuevos en la ciencia de los alimentos. Tienen alta estabilidad y alta eficiencia de encapsulación (Chen *et al.* 2017). Para obtenerlos, existen métodos que van desde la composición básica hasta el mecanismo de gelificación y estrategias de fabricación, como el método de gelificación iónica (Zeng *et al.* 2021). Además, Corredor *et al.* (2022) determinaron que los organogelatinas de aceite de sésamo tienen una liberación controlada y una mayor estabilidad de sus moléculas activas.

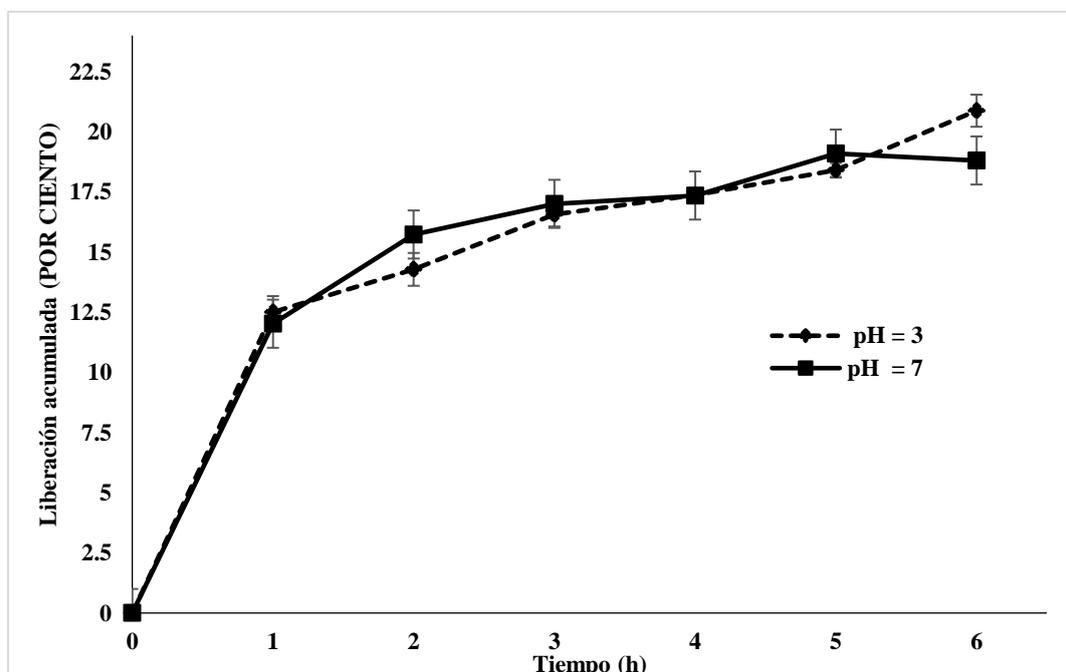


Figura 19: Aceite esencial de chincho liberado (por ciento) del sistema de organogel de nanopartículas de quitosano obtenido del proceso de optimización en tampones de acetato y fosfato (pH = 3 y pH = 7)

4.2.1.6.6. Actividad antimicrobiana del nanoencapsulado de aceite esencial de *T. elliptica* Sm. con quitosano

En la Tabla 26 se muestran los valores de concentración inhibitoria mínima (MIC) para el AEC encapsulado con quitosano, medidos frente a *S. aureus*, *E. coli* y *S. infantis*. La actividad antimicrobiana para los AEC-QSNP reportó valores de MIC en el rango de 5.29-10.57 µg/mL, y presentó mejor actividad contra bacterias Gram-positivas. El sistema de QSNP también mostró una mejor acción antimicrobiana contra las bacterias Gram-positivas que las bacterias Gram-negativas, según los valores obtenidos en el rango de 21.14-42.29 µg/mL. Esto se ha asociado con su capacidad para unirse de forma no covalente con los ácidos teicoicos incorporados en la capa de peptidoglicano de la bacteria (Verlee *et al.* 2017).

Del mismo modo, la MIC estuvo dentro de los rangos reportados por Ruiz *et al.* (2021) en el cual la MIC del AEC fue de 5 µL/mL frente a los microorganismos *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, otros estudios informan que la actividad antimicrobiana de las AEC-QSNP puede estar asociada a su tamaño de partícula Mohammadi *et al.* (2016). La actividad antimicrobiana del AEC se ha atribuido principalmente a la presencia de compuestos fenólicos (β -mirceno, óxido de cis-linalool y 2-tujeno) (Ruiz *et al.* 2021).

Asimismo, la actividad antimicrobiana obtenida de las AEC-QSNP sugiere que actúan como un sistema de liberación física, en el cual se mantuvieron los compuestos antimicrobianos, entre otros compuestos durante el proceso de elaboración. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Chen *et al.* (2017).

Tabla 26: Actividad antimicrobiana de (QSNP) y (AEC-QSNP), expresada como concentración inhibitoria mínima (MIC) contra *S. aureus*, *E. coli* y *S. infantis*

| Actividad antimicrobiana MIC (µg/mL) | | | |
|--------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | <i>S. aureus</i> ATCC 25923 | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S.</i> <i>infantis</i> |
| QSNPs | 21.14 | 42.29 | 42.29 |
| AEC-QSNPs | 5.29 | 10.57 | 10.57 |

QSNP: nanopartículas de quitosano; AEC-QSNPs: nanopartículas de quitosano de aceite esencial de chincho.

4.2.2. Caracterización química, física y fisicoquímica del músculo *Semimembranosus* de la carne de alpaca (*Vicugna pacos*)

4.2.2.1. Composición química de la carne de alpaca

En la tabla 27 se presenta los resultados obtenidos de la composición proximal del músculo *Semimembranosus* de la carne de alpaca, donde se muestra el contenido de humedad con un valor de 74.12 por ciento, que es similar a lo reportado por la carne de llama y bovino 72.72-73.94 por ciento Mamani y Gallo (2011); Cristofanelli *et al.* (2004).

Tabla 27: Composición química del músculo *Semimembranosus* de la carne de alpaca

| Parámetros | Promedio ± DS |
|-----------------------------------|----------------------|
| Composición proximal (Porcentaje) | |
| Humedad | 74.12 ± 0.07 |
| Proteína | 22.74 ± 0.05 |
| Grasa | 0.45 ± 0.01 |
| Ceniza | 2.56 ± 0.01 |

*DS: Desviación estándar

El contenido de humedad depende del contenido de la grasa intramuscular, además tiene efecto en la vida útil de la carne y en los parámetros sensoriales (Popova *et al.* 2021). El contenido de grasa intramuscular en la carne de camélidos es relativamente bajo, se evidencian valores de 0.45 por ciento y este depende de la edad de los animales en estudio. Además, diversos estudios han demostrado que están por niveles (< 4 por ciento) Popova *et al.* (2021); Bessong *et al.* (2017), lo cual hace que la carne de alpaca sea deseable para los consumidores, que buscan carnes rojas bajas en grasa. La alpaca se caracteriza por tener altos niveles de contenido proteico, en este estudio fue de 22.74 por ciento, que son valores superiores ligeramente a la carne de cordero (19.3 por ciento - 20.2 por ciento) (Popova y Marinova 2013), bovino con valores de 22.46 por ciento (Mamani y Gallo 2011), pero inferiores a la carne de llama (23.12 por ciento) (Cristofanelli *et al.* 2004).

El contenido de cenizas de la carne de alpaca reportó un valor de (2.56 por ciento), otros estudios evidencian valores cercanos entre (1.3 por ciento-2.5 por ciento) de la carne de llama, bovino y alpaca Mamani y Gallo (2014); Mamani y Gallo (2011). La causa de estas variaciones podría depender de la composición mineral y de los pastos de alimentación de los animales. Por lo tanto, esta evaluación es muy importante debido a que la carne de

camélidos sudamericanos, es una alternativa de consumo de una carne roja saludable que está influida por la nutrición del animal, la edad y los métodos de procedimiento (Popova *et al.* 2021; Smith *et al.* 2017; Mamani y Gallo 2014). Por otro lado, Banovic *et al.* (2009) informaron que la raza y la producción influyen en la calidad de la carne con respecto al contenido de grasa, el sabor la jugosidad y la ternura.

4.2.2.2. Característica física y fisicoquímica de la carne de alpaca

En la Tabla 28 se muestra los rasgos fisicoquímicos de la carne de alpaca que son los principales factores de calidad de la carne. Se puede observar que el pH inicial fue de 5.52, valores similares a los reportados por Smith *et al.* (2017). El pH puede estar afectado por varios factores, entre ellos las diferentes concentraciones de glucógeno presentes al momento del sacrificio, debido a las condiciones ambientales y factores estresantes como transporte. El pH y la capacidad de retención de agua tienen un impacto directo en la apariencia de los productos cárnicos frescos y procesados.

Tabla 28: Caracterización física y fisicoquímica del musculo *Semimembranosus* de la carne de alpaca

| Característica | Promedio ± DS |
|---|----------------------|
| pH | 5.52 ± 0.04 |
| Luminosidad (L*) | 36.19 ± 0.01 |
| Rojo/verde (a*) | 15.05 ± 0.04 |
| Amarillo/azul (b*) | 1.19 ± 0.00 |
| Capacidad de retención de agua (porcentaje) | 52.6 ± 0.13 |

*DS: Desviación estándar

El color de la carne es una de las características de calidad más importantes que influye en la decisión de los consumidores, además es un buen indicador de ternura, actuando como el principal criterio utilizado para la selección de la carne (Ripoll *et al.* 2019). Además, el color de la carne se define por la concentración y el estado químico del pigmento del músculo que puede ser medido por los parámetros CIEL*a*b* (Sánchez *et al.* 2016). El color instrumental de los filetes de carne de alpaca se muestra en la Tabla 28 con un valor de L* de 36.19, a* de 15.05 y b* de 1.19; valores similares a los reportados por Biffin *et al.* (2019); Salvá *et al.* (2009). Estos valores pueden verse afectados por los procesos tecnológicos, edad y tipo de

suplemento durante la alimentación. Además, el color de la carne de alpaca depende del contenido de mioglobina, que podría ser un factor en los valores de las coordenadas rojo/verde (a^*) de la carne de alpaca (Smith *et al.* 2017). Otros aspectos importantes, son los tratamientos de procesamiento que incluyen estimulación eléctrica (Popova *et al.* 2021). Con respecto a la capacidad de retención de agua se obtuvo un valor de 52.6 por ciento, esta característica está relacionado con la mezcla de proteínas y agua que sale de la carne sin otra manipulación que la gravedad, además influyen en la calidad de consumo y jugosidad de la carne (Sanchez *et al.* 2022).

4.2.3. Incorporación libre y nanoencapsulada del aceite esencial de *T. elliptica* Sm. en filetes de carne de alpaca

4.2.3.1. Características fisicoquímicas del recubrimiento en filetes de carne de alpaca

a. pH

El pH es factor importante debido a que es uno de los indicadores de calidad en los productos cárnicos elaborados y crudos. En la Figura 20, se observa el análisis fisicoquímico de pH de los diferentes grupos durante 13 días de almacenamiento en refrigeración, donde los valores son muy similares a los reportados a la Tabla 28 y algunos estudios reportados por Smith *et al.* (2017) en la carne de alpaca.

En el día 0 se evidenció diferencias significativas entre el grupo de tratamientos ($p < 0.05$) de las muestras sin recubrimiento (control) con las muestras de QS y AEC-QSNP, a diferencia del día 4 el pH ($p < 0.05$) que solo presentó diferencias significativas entre los grupos con y sin AEC. Por otro lado, el pH de las muestras sin recubrimiento fue más altas y significativas que las muestras con recubrimiento en los días 7 ($p < 0.05$), a excepción de la muestra con recubrimiento de QS (día 10 ($p < 0.05$) y día 13 ($p < 0.05$), esto puede estar relacionado con la producción de compuestos nitrogenados como amoníaco y aminos, los cuales generan la descomposición de las proteínas en diferentes carnes (Triki *et al.* 2018). La aplicación de todo el recubrimiento resultó en una disminución de los valores de pH ($p < 0.05$). El recubrimiento del quitosano sobre los filetes de carne de alpaca evidenció la disminución del pH frente al control, probablemente debido al contenido de ácido acético (Zhang *et al.* 2019).

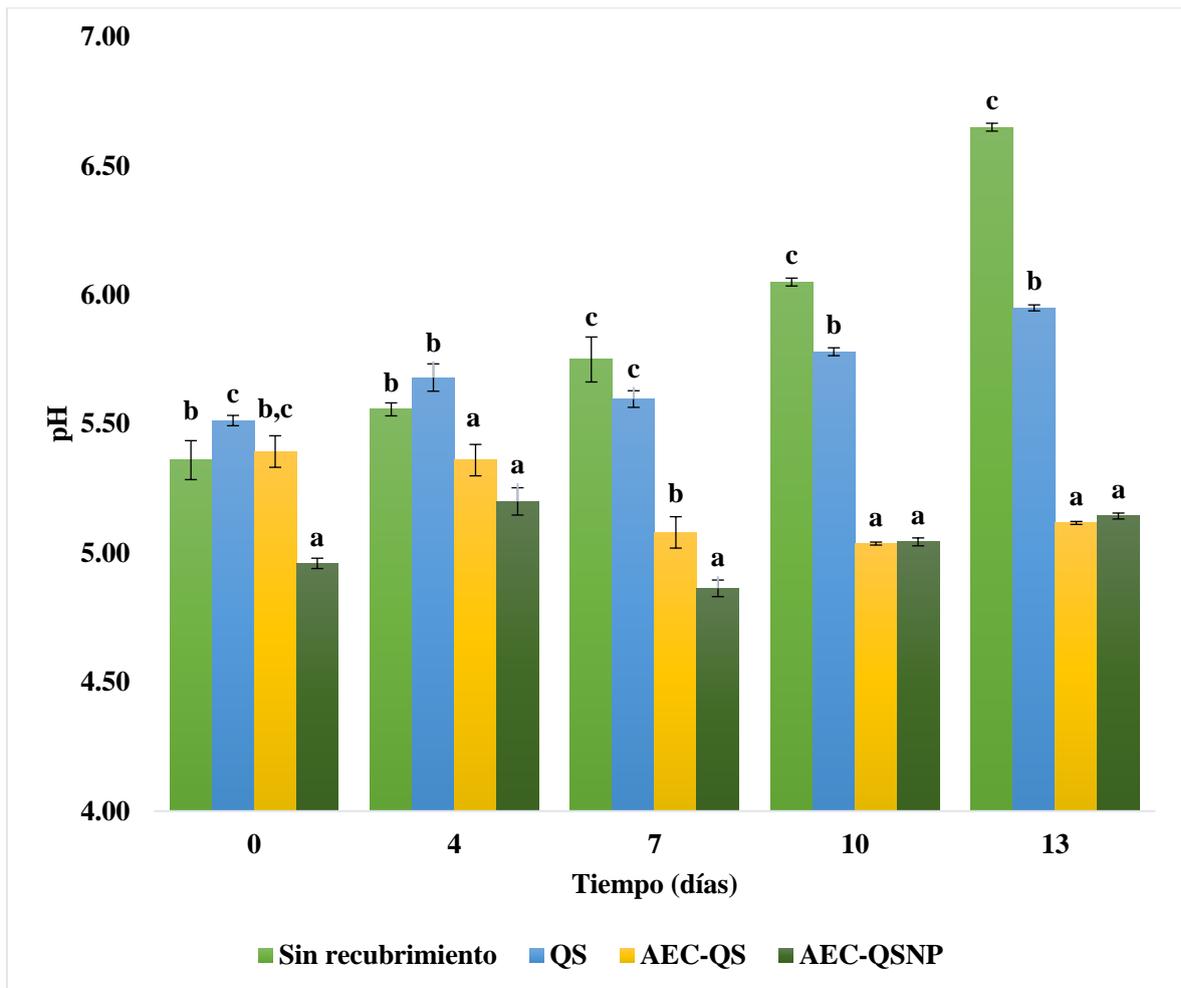


Figura 20: Cambios de pH en diferentes grupos durante 13 días de almacenamiento en refrigeración

^(a-d) Letras iguales en las mismas barras indican que no hay diferencia significativa según la prueba de post-hoc HSD de Tukey ($p > 0.05$)

Los valores de pH de las muestras que contenían AEC-QS y AEC-QSNP nanoencapsulados se mantuvieron estables durante el tiempo de almacenamiento, a diferencia del grupo sin recubrimiento y al grupo con quitosano QS. Esto es muy importante debido a que el pH es un factor crítico, que afecta la capacidad de retención de agua y la textura de los productos cárnicos. Además, debido a que el recubrimiento contiene ácido acético y que es insoluble en agua, se ha evidenciado una disminución del pH, así como se ha demostrado en diversos alimentos recubiertos con quitosano Osheba *et al.* (2013). Por otro lado, se informa que la estabilidad del pH en los filetes de carne con recubrimiento está relacionada con su actividad protectora contra la descomposición del sustrato y el menor crecimiento frente a las muestras sin recubrimiento Pabast *et al.* (2018).

b. Color

El color es uno de los atributos más importantes en los productos cárnicos, debido a que influye en la compra de los consumidores. En la Tabla 29, se muestran los cambios en los parámetros de color de los cuatro tratamientos, donde se evidenció diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles de (L^* , a^* y b^*) con respecto al control, durante los 13 días de almacenamiento, con excepción del parámetro L^* en el día 10 de almacenamiento ($p > 0.05$). Por otro lado, los valores de L^* , Control y QS aumentaron durante el tiempo de almacenamiento ($p < 0.05$). Los valores de a^* y b^* para los cuatro tratamientos no mostraron diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento ($p > 0.05$), con excepción en el día 13 de a^* (AEC-QS) ($p < 0.05$) y b^* (control) ($p < 0.05$).

Tabla 29: Efecto del tratamiento y tiempo de almacenamiento sobre los cambios de color en diferentes grupos del músculo de carne de alpaca

| | | Días de almacenamiento | | | | |
|--------------|-------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | 0 | 3 | 7 | 10 | 13 |
| L^* | Sin recubrimiento | 35.52 ± 0.9 ^{aA} | 37.65 ± 1.1 ^{aB} | 39.06 ± 0.1 ^{aBC} | 40.62 ± 0.3 ^{aCD} | 41.98 ± 1.1 ^{aD} |
| | QS | 38.89 ± 0.5 ^{bA} | 39.31 ± 0.3 ^{aA} | 41.45 ± 0.3 ^{bB} | 41.62 ± 0.9 ^{aB} | 43.52 ± 0.5 ^{abC} |
| | AEC-QS | 40.4 ± 0.3 ^{cA} | 40.93 ± 0.8 ^{bAB} | 41.42 ± 0.2 ^{bAB} | 40.54 ± 0.3 ^{aA} | 42.11 ± 1.0 ^{abC} |
| | AEC-QSNP | 41.2 ± 0.2 ^{cA} | 40.68 ± 0.6 ^{bA} | 43.31 ± 0.6 ^{cB} | 40.95 ± 0.8 ^{aA} | 43.97 ± 0.6 ^{bB} |
| a^* | Sin recubrimiento | 15.81 ± 0.1 ^{aAB} | 15.23 ± 0.2 ^{aA} | 15.66 ± 0.5 ^{aAB} | 15.91 ± 0.4 ^{aAB} | 16.47 ± 0.1 ^{aB} |
| | QS | 19.01 ± 0.4 ^{cAB} | 18.77 ± 0.7 ^{bAB} | 18.6 ± 0.8 ^{bAB} | 17.9 ± 0.7 ^{bA} | 19.8 ± 0.2 ^{bB} |
| | AEC-QS | 17.49 ± 0.6 ^{bA} | 18.03 ± 0.6 ^{bAB} | 18.29 ± 0.6 ^{bAB} | 18.17 ± 0.3 ^{bAB} | 18.9 ± 0.4 ^{bB} |
| | AEC-QSNP | 19.01 ± 0.4 ^{cA} | 17.79 ± 0.8 ^{bA} | 17.4 ± 0.9 ^{abA} | 17.40 ± 0.5 ^{bA} | 17.33 ± 0.6 ^{aA} |
| b^* | Sin recubrimiento | 1.77 ± 0.2 ^{aA} | 1.6 ± 0.5 ^{aA} | 1.59 ± 0.3 ^{aA} | 2.61 ± 0.1 ^{aA} | 3.75 ± 0.6 ^{aB} |
| | QS | 2.36 ± 0.3 ^{cA} | 2.58 ± 0.2 ^{bA} | 2.47 ± 0.1 ^{bA} | 2.51 ± 0.3 ^{bA} | 2.46 ± 0.5 ^{bA} |
| | AEC-QS | 5.72 ± 0.3 ^{bA} | 5.76 ± 0.2 ^{bA} | 5.35 ± 0.3 ^{bA} | 5.6 ± 0.4 ^{bA} | 5.44 ± 0.4 ^{bA} |
| | AEC-QSNP | 7.87 ± 0.5 ^{cA} | 7.41 ± 0.3 ^{bA} | 7.94 ± 0.6 ^{abA} | 7.18 ± 0.6 ^{bA} | 7.26 ± 0.3 ^{aA} |
| C^* | Sin recubrimiento | 15.91 ± 0.1 ^{aA} | 15.31 ± 0.22 ^{aA} | 15.74 ± 0.45 ^{aA} | 16.12 ± 0.39 ^{aAB} | 16.90 ± 0.22 ^{aB} |
| | CS | 19.16 ± 0.3 ^{bAB} | 18.94 ± 0.72 ^{bAB} | 18.76 ± 0.75 ^{bAB} | 18.13 ± 0.67 ^{bA} | 20.02 ± 0.13 ^{cB} |
| | AEC-CS | 18.40 ± 0.6 ^{bA} | 18.93 ± 0.48 ^{bA} | 19.06 ± 0.54 ^{bA} | 19.01 ± 0.43 ^{bA} | 19.67 ± 0.45 ^{bcA} |
| | AEC-CSNP | 20.58 ± 0.2 ^{cB} | 19.27 ± 0.70 ^{bAB} | 19.14 ± 0.57 ^{bA} | 18.84 ± 0.42 ^{bA} | 18.79 ± 0.44 ^{bA} |
| H^* | Sin recubrimiento | 6.39 ± 0.86 ^{aA} | 5.91 ± 1.68 ^{aA} | 5.83 ± 1.45 ^{aA} | 9.33 ± 0.56 ^{aAB} | 12.82 ± 1.68 ^{bB} |
| | CS | 7.08 ± 1.12 ^{aA} | 7.81 ± 0.26 ^{aA} | 7.57 ± 0.23 ^{aA} | 7.88 ± 0.60 ^{aA} | 7.07 ± 1.35 ^{aA} |
| | AEC-CS | 18.09 ± 0.69 ^{bA} | 17.71 ± 1.01 ^{bA} | 16.34 ± 1.41 ^{bA} | 17.12 ± 0.86 ^{bA} | 16.06 ± 1.03 ^{bA} |
| | AEC-CSNP | 22.50 ± 1.64 ^{cA} | 22.65 ± 1.40 ^{cA} | 24.58 ± 2.72 ^{cA} | 22.43 ± 2.10 ^{cA} | 22.74 ± 1.54 ^{cA} |
| ΔE^* | Sin recubrimiento | - | - | - | - | - |
| | CS | 4.79 ± 0.54 ^{aA} | 4.08 ± 0.74 ^{aA} | 3.92 ± 0.62 ^{aAB} | 2.35 ± 0.79 ^{aA} | 4.03 ± 0.18 ^{aB} |
| | AEC-CS | 6.52 ± 0.96 ^{aA} | 6.03 ± 0.26 ^{bA} | 5.25 ± 0.30 ^{aB} | 3.78 ± 0.35 ^{abA} | 3.17 ± 0.23 ^{aA} |
| | AEC-CSNP | 32.71 ± 1.05 ^{bB} | 7.10 ± 0.48 ^{bA} | 7.92 ± 0.81 ^{bB} | 4.91 ± 0.60 ^{bA} | 4.15 ± 0.71 ^{aA} |

(^{a-c}) letras iguales en la misma columna y (^{A-D}) letras iguales en la misma fila, indican que no hay una diferencia significativa según la prueba post-hoc HSD de Tukey ($p > 0.05$).

El día 13, todos los tratamientos mostraron los valores más altos de L^* ($p < 0.05$). Asimismo,

en el día 13, QS ($p>0.05$) y AEC-QS ($p<0.05$) mostraron los valores más altos de a^* con respecto al control. Por otro lado, en el día 7, control y AEC-QS mostró los valores más bajos ($p>0.05$) con respecto al control. En el tratamiento control y AEC-QS, se observa una tendencia creciente de los parámetros (L^* y a^*) durante los 13 días de almacenamiento y esto puede estar relacionado con la desnaturalización de las proteínas que tiende a aumentar la dispersión de la luz (L^* y a^*) (Farouk *et al.* 1998). Por otro lado, los valores de b^* , AEC-QS y AEC-QSNP disminuyeron en el día 7 y 13, estos resultados podrían ser desfavorables, debido a que cuando los valores de (b^*) disminuyen, el color de la carne se torna de color más oscuros y menos amarillos lo cual no favorece a la comercialización de la carne (Smith *et al.* 2017).

Por otro lado, los tratamientos con recubrimiento en su mayoría, mostraron valores (L^* , a^* y b^*) más altos en comparación con el grupo control. Los grupos con AEC-QS y AEC-QSNP mantuvieron valores similares y estables durante el almacenamiento, esto podría ser debido a que el quitosano tiene la propiedad de inhibir la decoloración de las muestras durante el almacenamiento, además de inhibir la oxidación de proteínas (Dey y Dora 2011). Por otro lado, podría mantener la integridad de las células y los tejidos de la carne, debido a que el AEC se difunde gradualmente en la carne de alpaca, lo cual retrasa los cambios de parámetros de color durante el almacenamiento.

Como se puede observar en las muestras con recubrimiento QS, AEC-QS y AEC-QSNP, el valor de b^* ($p<0.05$) se incrementó inicialmente y luego disminuyó durante los días de almacenamiento. Este efecto puede estar asociado con la transformación del pigmento de la carne y la formación de metamioglobina, que es más rápido cuando la concentración del oxígeno es baja (Moore y Gill 1987). Otros estudios informaron resultados similares Wang *et al.* (2021) en el cual los valores de L^* , a^* y b^* de las pechugas de pollo, recubiertas con nanoemulsiones de aceite esencial de canela se mantuvieron estables durante el almacenamiento a 4 °C.

Por otro lado, los valores de C^* mostraron diferencias significativas de CS, AEC-CS y AEC-QSNP frente al control ($p<0.05$), durante los 13 días. Y el día 13, control, CS y AEC-CS mostraron los valores de C^* más altos ($p<0.05$), con respecto al control. En todos los tratamientos no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) en los valores de H^* , con

excepción en el control ($p < 0.05$), en el día 7 y 10. Los valores más altos de H^* mostró la muestra AEC-CSNP ($p < 0.05$), durante los 13 días de almacenamiento. Con respecto a las diferencias de color instrumental entre las muestras de control y los demás tratamientos, se observó que estos se incrementaron cuando se incorporó el recubrimiento en los filetes de carne de alpaca, durante los 13 días de almacenamiento. Por otro lado, en el día 0 se observó los valores más altos de diferencia de color instrumental, con valores de $\Delta E^* > 3$, a excepción del día 10 (CS), por lo que la diferencia de color puede ser percibido por los consumidores (Martínez *et al.* 2001).

V. CONCLUSIONES

1. Se extrajo el aceite esencial de *T. elliptica* Sm. y se obtuvo mayor rendimiento en las hojas (0.23 por ciento), además demostró ser una buena fuente de compuestos bioactivos (cis-tagetenona, trans-tagetenona y dihidrotagetonona), posee capacidad antioxidante y propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Debido a estas propiedades podría considerarse una alternativa segura y ecológica a los antioxidantes sintéticos y agentes antimicrobianos en la industria alimentaria.
2. El diseño de Box-Benhken de 3 niveles y 3 factores proporcionó ecuaciones polinómicas adecuadas para las respuestas evaluadas eficiencia de encapsulación (EE) y capacidad de carga (CC) y, en consecuencia, se utilizó con éxito para optimizar la formulación de nanopartículas de aceite esencial de chincho. Las nanopartículas optimizadas tuvieron un porcentaje de EE de 52.64 y porcentaje de CC de 11.56, además fueron reproducibles con un tamaño de partícula de 458.5 ± 0.06 nm, un potencial Z de 23.30 ± 2.15 mV y un índice de polidispersidad de 0.418 ± 0.02 .
3. El compuesto mayoritario en las nanopartículas de aceite esencial de chincho optimizadas fue el 2.4 Diterbutilfenol. Los estudios morfológicos evidenciaron la forma redondeada y uniforme de las nanopartículas de aceite esencial de chincho, además los estudios de liberación *in vitro* fueron alrededor de 18.80 ± 0.77 por ciento y 20.87 ± 0.66 por ciento durante 6 h y las concentraciones mínimas inhibitorias tuvieron actividad antimicrobiana contra tres cepas: *Staphylococcus aureus* (5.29 $\mu\text{g/mL}$), *Salmonella infantis* (10.57 $\mu\text{g/mL}$) y *Escherichia coli* (10.57 $\mu\text{g/mL}$).
4. La carne de alpaca fue caracterizada de acuerdo a su composición fisicoquímica y demostró ser una carne saludable. Los resultados de incorporación del recubrimiento en filetes de carne de alpaca indicaron que el pH en todos los tratamientos fue menor frente al control y las coordenadas de color fueron mayores. La incorporación del recubrimiento mantuvo la estabilidad de la carne durante los 13 días de almacenamiento en refrigeración 4°C, lo cual es beneficioso para conservar los productos cárnicos.

VI. RECOMENDACIONES

Para continuar con la investigación de esta tesis doctoral se recomienda:

- Realizar mayores estudios sobre el aceite esencial de la *T. elliptica* Sm. para identificar el compuesto o los compuestos responsables de la actividad antioxidante y antimicrobiana.
- Experimentar ensayos *in vitro* (cepas bacterianas), considerando estudios más detallados de los mecanismos de acción de la *T. elliptica* Sm, para poder utilizarlos como antimicrobianos en envases de alimentos.
- Realizar estudios de vida útil del nanoencapsulado del aceite esencial de *T. elliptica* Sm. y aplicarlo en una matriz alimentaria diferente, para evaluar si es tecnológicamente viable como un aditivo natural en diversos productos cárnicos.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel, S; Ibrahim, A; Ismail, R.; Shaffie, N.; Hendawy, S. Omer, E.A. 2017. *In-vivo* hypoglycemic and hypolipidemic properties of *Tagetes lucida* alcoholic extract in streptozotocin-induced hyperglycemic Wistar albino rats, *Annals of Agricultural Sciences*, 628(2): 169-181. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2017.11.005>.
- Abdelaziz, E; Filali, F; Presti, V; Zekkori, B; Nalbhone, L; Bouymajane, A; Trabelsi, N; Lamberta, F; Bentayeb, A; Giuffrida, A; Giarratana. F. 2020. Chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial action of five Moroccan essential oils against *Listeria monocytogenes* and different serotypes of *Salmonella enterica*. *Microbial Pathogenesis*, 149: 104510. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104510>.
- Abere, D; Ojo, S; Paredes, M; Hakami, A. 2022. Derivation of composites of chitosan-nanoparticles from crustaceans source for nanomedicine: A mini review, *Biomedical Engineering Advances*, (4): 100058. <https://doi.org/10.1016/j.bea.2022.100058>.
- Abers, M; Schroeder, S; Goelz, L; Sulser, A; Rose, T; Puchalski, K; Langland, J. 2021. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 21:124. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03285-3>
- Adams, R. P. 2017. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. Texensis Publishing.
- Ahmadi, Z; Saber, M; Akbari, A; Mahdavinia, G. R. 2018. Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (*Lamiaceae*) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161:111–119. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.05.051>
- Al-Maqtari, Q; Rehman, A; Mahdi, A; Al-Ansi, W; Wei, M; Yanyu, Z; Phyto, H. M; Galeboe, O; Yao, W. 2022. Application of essential oils as preservatives in food systems: Challenges and future prospectives – a review. *Phytochemistry Reviews*, 21(4):1209-1246. <https://doi.org/10.1007/s11101-021-09776-y>
- Almeida, K. B; Ramos, A. S; Nunes, J. B. B; Silva, B. O; Ferraz, E. R. A; Fernandes, A. S; Falcao, D. Q. 2019. PLGA nanoparticles optimized by Box-Behnken for efficient

- encapsulation of therapeutic *Cymbopogon citratus* essential oil. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 181: 935-942. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.06.01>.
- AlMotwaa, S; Al-Otaibi. W. 2022. Formulation design, statistical optimization and *in vitro* biological activities of nano-emulsion containing essential oil from cotton-lavender (*Santolina chamaecyparissus* L.). *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 75: 103664. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103664>.
- Althaher, A; Oran, S; Bustanji, Y.K. 2020. Phytochemical Analysis, Invitro Assessment of Antioxidant Properties and Cytotoxic Potential of *Ruta chalepensis* L. Essential Oil, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 23(6): 1409-1421, <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1871078>
- Álvarez, F; Barrajón, E; Herranz, M; Micol, V. 2021. Antibacterial plant compounds, extracts and essential oils: An updated review on their effects and putative mechanisms of action, *Phytomedicine*, 90: 153626, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153626>.
- Alves, J; Dias dos Santos, S; Pintado, M; Pérez, J; Fernández, J; Viuda, M. 2013. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial, antifungal and antioxidant properties of essential oils obtained from some herbs widely used in Portugal, *Food Control*, 32(2): 371-378, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.022>
- AMSA. Meat Color Measurement Guidelines; Association. AMS 2012. Champaign, Illinois, USA
- An, L; Sun, Y; Huang, J; Liu, Y; Yuan, H; Zhang, R; Sun, Y. 2018. Chemical Compositions and *in vitro* Antioxidant Activity of the Essential Oil from *Coreopsis tinctoria* Nutt. Flower, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(4): 876-885. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1510792>
- AOAC. 2000. AOAC Métodos Oficiales de Análisis de AOAC Internacional, 17^a ed.; Internacional, A., Ed.; AOAC Internacional: Gaithersburg, MD, EE. UU., 2000; Volumen 1.
- Aprotosoiaie, Ana; Hăncianu, M; Costache, I; Miron, Anca. 2014. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties, *Flavour Fragr. J*, 29: 193–219. <https://doi.org/10.1002/ffj.3197>
- Aqeel, U; Aftab, T; Khan, M; Naeem, M. 2023. Regulation of essential oil in aromatic plants under changing environment. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 32: 100441, <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100441>..
- Arabpoor, B; Yousefi, S; Weisany, W; Mehran Ghasemlou, M. 2021. Multifunctional coating composed of *Eryngium campestre* L. essential oil encapsulated in nano-

- chitosan to prolong the shelf-life of fresh cherry fruits, *Food Hydrocolloids*, 111: 106394, <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106394>.
- Arena, J; Omarini, A; Zunino, M; Peschiutta, M; Defagó, M; Zygodlo, J. 2018. Essential oils from *Dysphania ambrosioides* and *Tagetes minuta* enhance the toxicity of a conventional insecticide against *Alphitobius diaperinus*. *Industrial Crops and Products*. 122: 190-194. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.077>.
- Avilés, D. F; Montero, M; Barros, M. 2018. Los camélidos sudamericanos: productos y subproductos. *Actas Iberoamericanas En Conservación Animal*, 11: 30– 38.
- Ayub, Muhammad; Hussain, Abdullah; Hanif, Muhammad; Chatha, Shahzad; Kamal, Ghulam; Muhammad; S; Janneh, O. 2017. Variation in phenolic profile, β -carotene and flavonoid contents, biological activities of two *Tagetes* species from Pakistani flora. *Chemistry & Biodiversity*, 14:6. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600463>.
- Bakkali, F; Averbeck, S; Averbeck, D; Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils- A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Banović, M; Grunert, K; Barreira, M; Fontes, M. 2009. Beef quality perception at the point of purchase: A study from Portugal. *Food Quality and Preference*, 20(4): 335-342, <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2009.02.009>.
- Barbieri, N; Costamagna, M; Gilabert, M; Perotti, M; Schuff, C; Isla, M; Benavente, A. 2016. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of three aromatic plants from La Rioja province, *Pharmaceutical Biology*, 54(1): 168-173. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1028077>
- Bashiri, S; Ghanbarzadeh, B; Ayaseh, A; Dehghannya, J; Ehsani, A. 2020. Preparation and characterization of chitosan-coated nanostructured lipid carriers (CH-NLC) containing cinnamon essential oil for enriching milk and anti-oxidant activity. *Food Science and Technology*, 119: 108836. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.108836>
- Bazargani, B; Aliakbarlu, J;Tajik, H. 2015. Influence of Coating Basedon Pomegranate Juice-Chitosan *Zataria multiflora* Oil on Chemical Stability of Chicken Meatuduring Frozen Storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(2): 192-201. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12596>
- Behbahani, B; Noshad, M; Falah. F. 2019. Cumin essential oil: Phytochemical analysis, antimicrobial activity and investigation of its mechanism of action through scanning electron microscopy, *Microbial Pathogenesis*, 136: 103716, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103716>.

- Bekhit, A.E; Hopkins, D.L; Fahri, F.T; Ponnampalam, E.N. 2013. Oxidative processes in musclesystems and freshmeat: sources, markers, and remedies. *Food Science and Food Safety*. 12: 565–597. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12027>
- Beltrán, H. 2016. Las Asteráceas (Compositae) del distrito de Laraos (Yauyos, Lima, Perú)/ The Asteraceae (Compositae) from Laraos district (Yauyos, Lima, Perú). *Revista Peruana De Biología*, 23(2): 195-220. <https://doi.org/10.15381/rpb.v23i2.12439>
- Bessong, W; Saccà, E; Corazzin, M; Sepulcri, A; Piasentier, E. 2017. Body and meat characteristics of young bulls from zebu goudali of cameroon and its crosses with the italian simmental. *Italian Journal of Animal Science*, 17(1): 240–249.
- Bhavaniramy, S; Vishnupriya, S; Al-Aboody, M. S; Vijayakumar, R; Baskaran, D. 2019. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. *Grain & Oil Science and Technology*, 2(2): 49-55. <https://doi:10.1016/j.gaost.2019.03.001>.
- Bhowmik, S; Agyei, D; Ali, A. 2022. Bioactive chitosan and essential oils in sustainable active food packaging: Recent trends, mechanisms, and applications, *Food Packaging and Shelf Life*, 34: 100962, <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100962>.
- Biffin, T; Smith, M; Bush, R; Collins, D; Hopkins, D. 2019. The effect of electrical stimulation and tenderstretching on colour and oxidation traits of alpaca (*Vicunga pacos*) meat, *Meat Science*, 156: 125-130. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.05.026>.
- Bouid, H; Oubannin, S; Ibourki, M; Bijla, L; Hamdouch, A; Sakar, E; Harhar, H; Majourhat, K; Koubachi, J; Gharby, S. 2023. Comparative evaluation of chemical composition, antioxidant capacity, and some contaminants in six Moroccan medicinal and aromatic plants, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 47: 102569, <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102569>
- Brand, W; Cuvelier. M. E; Berset. C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. 28: 25-30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).
- Brito, G; Peixoto, V; Martins, M; Rosário, D; Ract, J; Conte, C; Torres, A; Castelo, V. 2022. Development of chitosan-based oleogels via crosslinking with vanillin using an emulsion templated approach: Structural characterization and their application as fat-replacer, *Food Structure*, 32: 100264, <https://doi.org/10.1016/j.foostr.2022.100264>.
- Burt, S. 2004. Aceites esenciales: sus propiedades antibacterianas y posibles aplicaciones en los alimentos: una revisión. , 94(3): 223–253. <https://doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

- Cáceres, L. M; Velasco, G. A; Dagnino, E. P; Chamorro, E. R. 2020. Microencapsulation of grapefruit oil with sodium alginate by gelation and ionic extrusion: Optimization and modeling of crosslinking and study of controlled release kinetics, *Revista Tecnología y Ciencia*, 41: 41-61. <https://doi.org/10.33414/rtyc.39.41-61.2020>.
- Carhuapoma M. 2017. Elucidación estructural, actividad Anti-Trypanosoma cruzi y toxicidad aguda del aceite esencial de *Tagetes elliptica* Smith “chinchu”. Tesis de maestría, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Unidad de Posgrado - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Carrancá, M; Martín, V; Kirilov, P. 2017. Colloidal Dispersions of Gelled Lipid Nanoparticles (GLN): Concept and Potential Applications. *Gels*, 3: 33. <https://doi.org/10.3390/gels3030033>
- Chen, X.W; Chen, Y.J; Wang, J.M; Guo, J; Yin, S.W; Yang, X.Q. 2017. Tunable volatile release from organogel-emulsions based on the self-assembly of β -sitosterol and γ -oryzanol. *Food Chemistry*. 221: 1491-1498. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.001>
- Chrysargyris, A; Xylia, P; Botsaris, G; Tzortzakis, N. 2017. Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. *Industrial Crops and Products*, 103: 202-212. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.010>.
- Cornelius, W; Wycliffe, W. 2016. Chapter 90 - *Tagetes (Tagetes minuta)* Oils. Editor(s): Victor R. Preedy. *Essential Oils in Food Preservation. Flavor and Safety*. Academic Press. 791-802. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00090-0>.
- Corredor, M; Vargas, D; Mora, C. 2022. Hypromellose—Collagen hydrogels/sesame oil organogel based bigels as controlled drug delivery systems. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 75: 103637. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103637>
- Cristofanelli, S; Antonini, M; Torres, D; Polidori, P; Renieri, C. 2004. Meat and carcass quality from Peruvian llama (*Lama glama*) and alpaca (*Lama pacos*), *Meat Science*, 66: 589–593.
- Cruz, O; Espinoza, M; Santiesteban, A; Cruz-López, L. 2021. Chemical Characterization of the volatiles of *Tagetes nelsonii*. *Polibotánica*. 51: 203–211. <https://doi.org/10.18387/polibotánica.51.13>
- da Trindade, R.; Xavier, J.; Setzer, W; Maia, J.; da Silva, J. 2021. Chemical Diversity and Therapeutic Effects of Essential Oils of Aniba Species from the Amazon: A Review. *Plants*, 10:1854. <https://doi.org/10.3390/plants10091854>

- Dauber, C; Carreras, T; González, L; Gámbaro, A; Valdés, A; Ibañez, E; Vieitez, I. 2022. Characterization and incorporation of extracts from olive leaves obtained through maceration and supercritical extraction in Canola oil: Oxidative stability evaluation, *Food Science and Technology*, 160: 113274. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113274>.
- De Campo, C.; Pereira dos Santos, P.; Costa, T.; Paese, K.; Guterres, S.; De Oliveira Rios, A.; Hickmann, S. 2017. Nanoencapsulation of chia seed oil with chia mucilage (*Salvia hispanica* L.) as wall material: Characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*. 234: 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.04.153>
- De La Cruz, H; Vilcapoma, G; Zevallos, P. 2007. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Peru. *Journal of Ethnopharmacology*. 111(2): 284-294. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.018>.
- De La Cruz, L., Hernández, M., Monroy, I., Rivas, C., Verde, M., Gonzalez, V., Viveros, E. 2022. Biological activities of seven medicinal plants used in chiapas, México. *Plants*. 11(14): 1790. <https://doi.org/10.3390/plants11141790>
- De la Cruz, M. G; Malpartida, S. B; Santiago, H. B; Jullian, V; Bourdy, G. 2014. Hot and cold: medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejon de Huaylas, Ancash, Peru). *Journal of Ethnopharmacology*, 155(2): 1093-1117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.042>.
- De La Torre, J; Gassara, F; Kouassi, A; Brar, S; Belkacemi, K. 2017. Uso de especias en los alimentos: propiedades y beneficios. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57(6): 1078-1088. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.858235>
- De Oliveira, D; Abib, P; Giacomini, R; Lenardão, E; Schiedeck, G; Wilhelm, E; Luchese, C., Savegnago, L; Jacob, R. 2019. Antioxidant and antifungal activities of the flowers' essential oil of *Tagetes minuta*, (Z)-tagetone and thiotagetone. *Journal of Essential Oil Research*. 31:2, 160-169. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1519465>.
- De Oliveira, D; Abib, P; Giacomini, R; Lenardão, E; Schiedeck, G; Wilhelm, E; Luchese, C; Savegnago, L; Jacob, R. 2018. Antioxidant and antifungal activities of the flowers' essential oil of *Tagetes minuta*, (Z)-tagetone and thiotagetone, *Journal of Essential Oil Research*. *Journal of Essential Oil Research*, 31(2): 160-169. <https://doi.org/10.1080/10412905.2018.1519465>
- de Pinho Neves, A. L; Milioli, C. C; Müller, L; Riella, H. G; Kuhnen, N. C; Stulzer, H. K. 2014. Factorial design as tool in chitosan nanoparticles development by ionic gelation

- technique. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 445: 34-39. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.058>
- Detsi, A.; Kavetsou, E.; Kostopoulou, I.; Pitterou, I.; Pontillo, A.R.N.; Tzani, A.; Christodoulou, P.; Siliachli, A.; Zoumpoulakis, P. 2020. Nanosystems for the Encapsulation of Natural Products: The Case of Chitosan Biopolymer as a Matrix. *Pharmaceutics*, 12: 669. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070669>
- Dey, S; Dora, K. 2011. Suitability of chitosan as cryoprotectant on croaker fish (*Johnius gangeticus*) surimi during frozen storage. *Journal Food Science Technology*. 48: 699-705. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0197-8>
- Di Vito, Maura; Cacaci, Margherita; Barbanti, Lorenzo; Martini, Cecilia; Sanguinetti, Maurizio; Benvenuti, Stefania; Tosi, Giovanni; Fiorentini, Laura; Scozzoli, Maurizio; Bugli, Francesca; Mattarelli, Paola. 2020. *Origanum vulgare* Essential Oil vs. a Commercial Mixture of Essential Oils: In Vitro Effectiveness on *Salmonella* spp. from Poultry and Swine Intensive Livestock. *Antibiotics*, 9(11): 763. <https://doi:10.3390/antibiotics9110763>
- Díaz, J. 2014. Estructura química del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Tagetes elliptica* Sm. “Chincho”, actividad antibacteriana y antifúngica en la aplicación de un alimento andino, Tesis para optar el grado académico de Magister en Ciencia de Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de posgrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.
- Dutra da Silva, B; Alves do Rosário, D; Weitz, D; Conte, C. 2022. Essential oil nanoemulsions: Properties, development, and application in meat and meat products, *Trends in Food Science & Technology*, 121:1-13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.01.026>.
- Dutra da Silva, B; Bernardes, P; Pinheiro, P; Fantuzzi, E; Roberto, C. 2021. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products, *Meat Science*, 176: 108463, <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108463>.
- Ed-Dra, A; Filali, F.R; Presti, V.L; Zekkori, B; Nalbone, L; Bouymajane, A; Trabelsi, N; Lamberta, F; Bentayeb, A; Giuffrida, A; Giarratana. F. 2020. Chemical composition, antioxidant capacity and antibacterial action of five Moroccan essential oils against *Listeria monocytogenes* and different serotypes of *Salmonella enterica*, *Microbial Pathogenesis*, 149:104510. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104510>.

- Esposito, C; Kirilov, P; Roullin, G. 2018. Organogels, promising drug delivery systems: an update of state-of-the-art and recent applications, *Journal of Controlled Release*. 271: 1-20, <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.019>.
- FAO. 2005. Situación actual de los Camélidos sudamericanos en Perú. *Fao*, 46(1): 1–62.
- Farouk, M; Swan, J. 1998. Effect of rigor temperature and frozen storage on functional properties of hot-boned manufacturing beef, *Meat Science*, 49(2):233-247, [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(97\)00134-4](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(97)00134-4).
- Fernández, J; Viuda, M. 2018. Introduction to the Special Issue: Application of Essential Oils in Food Systems. *Foods*. 7: 56. <https://doi.org/10.3390/foods7040056>
- Fernández, S. 2005. Situación actual de los Camélidos Sudamericanos en Perú (Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo a la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914). Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Feyzioglu, G; Tornuk, F. 2016. Development of chitosan nanoparticles loaded with summer savory (*Satureja hortensis* L.) essential oil for antimicrobial and antioxidant delivery applications, *Food Science and Technology*, 70: 104-110, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.02.037>.
- Forster, K; Simon, R; Schmidt, D; Kaltner. 2001. In Proceedings of the 28th EBC Congress. Budapest. Hungary.
- Gakuubi, M. M; Wagacha, J. M; Dossaji, S. F; Wanzala, W. 2016. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against Selected Plant Pathogenic Bacteria. *International Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1155/2016/7352509>.
- Gallo, T; Cattelan, M; Alvim, I; Nicoletti, V. 2020. Oregano essential oil encapsulated in alginate beads: Release kinetics as affected by electrostatic interaction with whey proteins and freeze-drying. *Journal of Food Processing and Preservation*. 44: e14947. <https://doi.org/10.1111/jfpp.14947>
- Ghaderi, M; Barzegar, M; Sahari, M.A. 2016. Nanoencapsulation Approach to Improve Antimicrobial and Antioxidant Activity of *Thyme Essential Oil* in Beef Burgers During Refrigerated Storage. *Food Bioprocess Technol* 9: 1187–1201. <https://doi.org/10.1007/s11947-016-1708-z>
- Giannenas, I; Sidiropoulou, E; Bonos, E; Christaki, E; Florou-Paneri, P. 2020. Chapter 1. The history of herbs, medicinal and aromatic plants, and their extracts: Past, current situation and future perspectives, Florou-Paneri, P., Christaki, E., Giannenas, I. 1rd

- ed.; Feed Additives: Academic Press, Greece, 1-18. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814700-9.00001-7>.
- Giarratana, F; Muscolino, D; Ziino, G; Giuffrida, A; Marotta, S. M; Lo Presti, V; Panebianco, A. 2017. Activity of *Tagetes minuta* Linnaeus (Asteraceae) essential oil against L3 Anisakis larvae type 1. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine. 10: 461-465. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2017.05.005>
- Główka, E; Wosicka, H; Hyla, K; Stefanowska, J; Jastrzębska, K; Klapiszewski, Ł.; Jesionowski, T; Cal, K. 2014. Polymeric nanoparticles-embedded organogel for roxithromycin delivery to hair follicles. Eur J Pharm Biopharm. 88: 75–84.
- González, M; Baldeón, S; Beltrán, H; Julian, V; Bourdy, G. 2014. Hot and cold: Medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). J. of Ethnopharmacology, 155: 1093-1117. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.06.042>
- González, R; Mateo, J; Totosaus, A; Pérez, M. 2004. Efecto del masaje o marinado con cloruro de calcio en la textura de carne de bovino. Ciencia y Tecnología Alimentaria. 4(4):274-277.
- Hadidi, M; Pouramin, S; Adinepour, F; Haghani, S.; Seid Mahdi, S. 2020. Chitosan nanoparticles loaded with clove essential oil: Characterization, antioxidant and antibacterial activities, Carbohydrate Polymers, 236: 116075, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116075>.
- Hammond, G; Fernández, I; Villegas, L; Vaisberg, A. (1998). A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. Journal of Ethnopharmacology. 61(1): 17-30. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00009-9).
- Hoffman, K. 1993. Quality concepts for meat and meat products. Fleischwirtschaft, 73: 1014-1019.
- Huang, X; Gao, W; Yun, X; Qing, Z; Zeng, J. 2022. Effect of Natural Antioxidants from Marigolds (*Tagetes erecta* L.) on the Oxidative Stability of Soybean Oil. Molecules, 27(9): 2865. <https://doi.org/10.3390/molecules27092865>
- Huaraca, R; Delgado, M; Tapia, F. 2022. Metabolitos bioactivos y actividad antioxidante in vitro del aceite esencial extraído de dos especies del género *Tagetes*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas, 50:3. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v50n3.93429>

- Ibraheem, D; Agusti, G; Elaissari, A; Fessi, H. 2014. Preparation and Characterization of Albumin-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles for In Vivo Applications. *Journal of Colloid Science and Biotechnology*. 3: 160–166. <https://doi.org/10.1166/jcsb.2014.1086>
- Ibrahim, S; Abdallah, H; El-Halawany, A. 2016. Naturally occurring thiophenes: Isolation, purification, structural elucidation, and evaluation of bioactivities. *Phytochemistry Reviews*. 15: 197–220. <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9403-7>
- Ibrahim, S; Mohamed, G. 2017. Tagetones A and B, new cytotoxic monocyclic diterpenoids from flowers of *Tagetes minuta*. *Chinese Journal of Natural Medicines*. 15(7): 546-549. [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(17\)30081-X](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(17)30081-X).
- Jafari, S. 2017. An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. *Nanoencapsulation technologies for the food and nutraceutical industries*. Pp. 1-34. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00001-X>
- Jamwal, R; Amit, Shivani, A; Sharma, S; Kelly, S; Cannavan, A; Dileep Kumar Singh, D. 2021. Recent trends in the use of FTIR spectroscopy integrated with chemometrics for the detection of edible oil adulteration, *Vibrational Spectroscopy*, 113: 103222, <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2021.103222>.
- Joye, I. 2021. Application of nano/microencapsulated ingredients in cereal flours and bakery products. *Application of nano/microencapsulated ingredients in food products*, pp. 275-304. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815726-8.00006-4>
- Kaderides, K; Kyriakoudi, A; Mourtzinis, I; Goula, A. 2021. Potential of pomegranate peel extract as a natural additive in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 115: 380-390. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.050>.
- Kamaly, N; Yameen, B; Wu, J; Farokhzad, O.C. 2016. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release. *Chem. Rev.* 116: 2602–2663. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00346>
- Kang, C; Xiang, Q; Zhao, D. 2019. Inactivation of *Pseudomonas deceptionensis* CM2 on chicken breasts using plasma-activated water. *Journal of Food Science and Technology*. 56: 4938–4945. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03964-7>
- Karimian, P; Kavooosi, G; Amirghofran, Z. 2014. Antioxidative and antiinflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(3): 219-227. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(14\)60235-5](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(14)60235-5).

- Kashyap, P., Singh, S., Singh, M., Gupta, A., Tandon, S., Shanker, K., Verma, R., Ram Verma, R. 2022. An efficient process for the extraction of lutein and chemical characterization of other organic volatiles from marigold (*Tagetes erecta* L.) flower. *Food Chemistry*. 396, 133647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133647>.
- Kaur, J; Kaushal, S. 2020. Chemical Analysis, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Harsingar (*Nyctanthes arbortristis*) essential oil, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2020.1759458>
- Keawchaon, L; Yoksan, R. 2011. Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, 84(1): 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.12.031>.
- Khalil, M; Raila, J; Ali, M; Islam, K; Schenk, R; Krause, J; Schweigert, F; Rawel, H. 2012. Stability and bioavailability of lutein ester supplements from *Tagetes* flower prepared under food processing conditions. *Journal of Functional Foods*, 4(3): 602-610. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.03.006>.
- Khorshidian, N; Yousefi, M; Khanniri, E; Mortazavian, A. 2018. Potential application of essential oils as antimicrobial preservatives in cheese, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45: 62-72, <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.09.020>.
- Kreps, F; Dubaj, T; Krepsová, Z. 2021. Accelerated oxidation method and simple kinetic model for predicting thermooxidative stability of edible oils under storage conditions, *Food Packaging and Shelf Life*, 29: 100739, <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2021.100739>.
- Kumar, R; Sharma, S; Ramesh, K; Pathania, V; Prasad. R. 2014. Irradiance stress and plant spacing effect on growth, biomass and quality of wild marigold (*Tagetes minuta* L.) – an industrial crop in western Himalaya. *Journal of Essential Investigación petrolera*, 26: 348-358. <https://doi.org/10.1080/10412905.2014.935497>.
- Lalas, S; Dourtoglou. V. 2003. *Am. Oil Chem. Soc.* 80(6): 579.
- Lammari, N; Louaer, O; Meniai, A; Fessi, H; Elaissari, A. 2021. Plant oils: From chemical composition to encapsulated form use, *International Journal of Pharmaceutics*, 601: 120538, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120538>.
- Laubli, M; Bruttel. P.A. 1986. *Am. Oil Chemistry Society*. 63: 792.
- Li, Y; Erhunmwunsee, F; Liu, M; Yang, K; Zheng, W; Tian, J. (2022). Antimicrobial mechanisms of spice essential oils and application in food industry, *Food Chemistry*, 382: 132312. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132312>.
- Liu, T., & Liu, L. 2020. Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading

- thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1509–1515. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.07.207>
- Loockerman, D; Turner, B; Jansen, R. 2003. Phylogenetic Relationships within the Tagetes (Asteraceae) Based on Nuclear. Ribosomal ITS and Chloroplast ndhF Gene Sequences. *Systematic Botany*. 28(1):191-207. <http://www.jstor.org/stable/3093948>
- Lucas, R; Yilmaz, B.; Khaneghah, A; Hano, C; Shariati, M; Bangar, S; Goksen, G.; Dhama, K.; Lorenzo, J. 2023. Cinnamon: An antimicrobial ingredient for active packaging, *Food Packaging and Shelf Life*, 35: 101026, <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2023.101026>.
- Madrid, A. 2014. La Carne y los productos cárnicos ciencia y tecnología. Madrid. AMV Ediciones. Pp 55-56.
- Mamani, L. W; Gallo, C. B. 2014. Meat quality, proximate composition and muscle fatty acid profile of young llamas (*Lama glama*) supplemented with hay or concentrate during the dry season. *Meat Science*, 96(1): 394-399.
- Mamani, L; y Gallo C. 2011. Chemical composition and instrumental quality of bovine, llama (*Lama glama*) and horse meat under an extensive production system. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 22: 301-311
- Mansilla, H. I. 2000. Efecto de la temperatura de cocción en características físicas de carne bovina. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ingeniería en Alimentos, Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias. Valdivia. Chile.
- Marotti, M; Piccaglia, R; Biavati, B; Marotti, I. 2004. Caracterización y evaluación del rendimiento de aceites esenciales de diferentes especies de Tagetes , *Journal of Essential Oil Research*, 16(5): 440-444. <https://doi.org/10.1080/10412905.2004.9698767>
- Martin, B; Brouillet, F; Franceschi, S; Perez, E. 2017. Evaluation of Organogel Nanoparticles as Drug Delivery System for Lipophilic Compounds. *AAPS Pharm Science Technology*, 18: 1261-1269. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0587-y>
- Martin, B; Garrat, G; Beyssac, E. 2020. Organogel Nanoparticles as a New Way to Improve Oral Bioavailability of Poorly Soluble Compounds. *Pharm Res*, 37: 92. <https://doi.org/10.1007/s11095-020-02808-w>
- Martínez, J.A.; Melgosa, M.; Pérez, M.M.; Hita, E.; Negueruela, A.I. Note. 2021. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines. *Food Science and Technology International*. 7, 439–444. <https://doi.org/10.1106/VFAT-5REN-1WK2-5JGQ>

- Medina, N; Espinosa, H; Trombotto, S; Ayora, T; Patrón, J; González, T; Sánchez, Á; Cuevas, J.C; Pacheco, N. 2019. Ultrasound-Assisted Extraction Optimization of Phenolic Compounds from Citrus latifolia Waste for Chitosan Bioactive Nanoparticles Development. *Molecules*, 24: 3541. <https://doi.org/10.3390/molecules24193541>
- Mikre, W; Rohloff, J; Hymete, A. 2007. Volatile Constituents and Antioxidant Activity of Essential Oils Obtained from Important Aromatic Plants of Ethiopia, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(6): 465-474. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2007.10643580>
- Minatel, I.O; Borges, C.V; Ferreira, M.I; Gomez, H.A.G; Chen, C.Y.O; Lima, G.P.P. 2017. Phenolic compounds: Function properties, impact of processing and bioavailability. In *Phenolic Compounds-Biological Activity*; IntechOpen: Rijeka, Croatia, <https://doi.org/10.5772/66368>
- MINIAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego). 2019. Camélidos Sudamericanos. Lima144 Perú. Consultada el 10 de abril del 2023. Disponible en: <http://www.minagri.gob.pe/portal/objetivos/40-sector-agrario/situacion-delasactividades-de-crianza-y-produccion/298-camelidos-sudamericanos?start=1>
- Mishra, B; Chandra. M. 2022. Evaluation of phytoremediation potential of aromatic plants: A systematic review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 31: 100405. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2022.100405>.
- Mnif, W; Dhifi, W.; Jelali, N; Baaziz, H; Hadded, A; Hamdi, N. 2011. Characterization of Leaves Essential oil of Pelargonium graveolens Originating from Tunisia: Chemical Composition, Antioxidant and Biological Activities, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 14(6): 761-769, <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2011.10644001>
- Mogoşanu, G; Grumezescu, A; Bejenaru, C; Bejenaru, L. 2017. Natural products used for food preservation, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, In *Nanotechnology in the Agri-Food Industry, Food Preservation*, 365-411. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804303-5.00011-0>.
- Mohammadi, A; Hashemi, M; Masoud, S. 2016. Effect of chitosan molecular weight as micro and nanoparticles on antibacterial activity against some soft rot pathogenic bacteria. *Food Science and Technology*. 1: 347–355. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.010>
- Mondéjar, M., Rubio, A., López, A. J., García, J. C., Ahrazem, O., Gómez-Gómez, L., Niza, E. 2022. Chitosan nanoparticles loaded with garlic essential oil: A new alternative to

- tebuconazole as seed dressing agent. *Carbohydrate Polymers*, 277, 118815. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2021.118815>
- Moore, V. J; Gill, C. O. 1987. The pH and display life of chilled lamb after prolonged storage under vacuum or under CO₂. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30(4): 449-452.
- Mora, C. E; Fessi, H; Elaissari, A. 2011. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification-diffusion methods: Critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science*, 163: 90-122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2011.02.005>
- Mujtaba, M; Morsi, R; Kerch, G; Elsabee, M; Kaya, M; Labidi, J; Khawar, K. 2019. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, 121: 889-904, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.109>.
- Nasser, A.A; Ali, F.S; Sharopov, A.G; Al-kaf, G.M; Hill, N; Arnold, S.S; Al-Sokari, A. 2014. Composition of essential oil from *Tagetes minuta* and its cytotoxic, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural Product Communications*, 9; 265-268.
- Natividad, Á; Cisneros, G; Rojas, R; Matos, A; Ramos R, M. 2009. Componentes antioxidantes del chincho (*Tagetes elliptica* Sm.): vitamina c y Flavonoides. *Investigación Valdizana*, 3(2): 94-99. <https://revistas.unheval.edu.pe/index.php/riv/article/view/641>
- Natrajan, D; Srinivasan, S; Sundar, K; Ravindran, A. 2015. Formulation of essential oil-loaded chitosan-alginate nanocapsules. *Journal Food Drug Analysis*, 23(3): 560-568. <https://doi:10.1016/j.jfda.2015.01.001>
- Nawaz, T; Iqbal, M; Khan, B.A; Nawaz, A; Hussain, T; Hosny, K.M; Abualsunun, W.A; Rizg, W.Y. 2022. Development and Optimization of Acriflavine-Loaded Polycaprolactone Nanoparticles Using Box–Behnken Design for Burn Wound Healing Applications. *Polymers* 14: 101. <https://doi.org/10.3390/polym14010101>.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). 1997. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 6th ed. Approved Standard. M2-A6. Wayne. PA
- Norma técnica peruana. 2015. NTPISO 2917. Carne y productos cárnicos. Medición del pH.
- O'Callaghan, K; Kerry, J. 2016. Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms

- Sharififard, including cheese-derived cultures, *Food Control*, 69: 256-261. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.005>.
- Odjo, K; Al-Maqtari, Q; Yu, H; Xie, Y; Guo, Y. Li, M; Du, Y; Liu, .; Chen, Y; Yao, W. 2022. Preparation and characterization of chitosan-based antimicrobial films containing encapsulated lemon essential oil by ionic gelation and cranberry juice, *Food Chemistry*, 397: 133781. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133781>.
- Olajuyigbe. O.O; Afolayan. A.J. 2011. Phenolic content and antioxidant property of the bark extracts of *Ziziphus mucronata* Willd. subsp. *mucronata* Willd. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 11: 130. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-130>.
- Ortiz, G; Melero, E; Sánchez, R. 2022. Potential sources and methodologies for the recovery of phenolic compounds from distillation residues of Mediterranean aromatic plants. An approach to the valuation of by-products of the essential oil market – A review, *Industrial Crops and Products*, 175: 114261, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.114261>.
- Osheba, A; Sorour, M; Abdou, E. S. 2013. Effect of chitosan nanoparticles as active coating on chemical quality and oil uptake of fish fingers. *Journal of Agriculture and Environmental Sciences*, 2(1): 1-14.
- Oyaizu. M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.* 44: 307-315.
- Pabast, M; Shariatifar, N; Beikzadeh, S; Jahed. G. 2018. Effects of chitosan coatings incorporating with free or nano-encapsulated *Satureja* plant essential oil on quality characteristics of lamb meat, *Food Control*, 91: 185-192. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.03.047>.
- Palomino, C. 2011. Aplicación de los marcadores moleculares en la evaluación genética de las principales variedades de café (*Coffea arabica* L.) de Villa Rica, Perú. Tesis Lic. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Panmei, R; Gajurel, P.R.; Singh, B. 2019. Ethnobotany of medicinal plants used by the Zeliangrong ethnic group of Manipur, northeast India. *Journal of Ethnopharmacology*, 235:164-182, <https://doi/10.1016/j.jep.2019.02.009> .
- Pashkunova, I.; Kremser, C.; Galanski, M.; Arion, V.; Debbage, P.; Jaschke, W.; Keppler, B. 2010. Lectin–Gd-Loaded Chitosan Hydrogel Nanoparticles: A New Biospecific Contrast Agent for MRI. *Molecular Imaging and Biology*, 13(1): 16–24. <https://doi.org/10.1007/s11307-010-0309-x>

- Petrović, S; Ušjak, L; Milenković, M; Arsenijević, J; Drobac, M; Drndarević, A; Niketić, M. 2017. *Thymus dactylicus* as a new source of antioxidant and antimicrobial metabolites. *Journal of Functional Foods*. 28: 14-121. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.11.007>.
- Pichette, A; Garneau, F; Collin, G; Jean, F; Gagnon, H; Lopez, J. 2005. Essential Oils from Bolivia. IV. Compositae: *Tagetes* aff. *maxima* Kuntze and *Tagetes multiflora* H.B.K., *Journal of Essential Oil Research*, 17(1): 27-28, <https://doi.org/10.1080/10412905.2005.9698820>
- Pimentel Ramirez, Erika, Castillo Andamayo, Diana, Quintana Del Solar, Maurtua Torres, Dora, Villegas Vílchez, León, & Díaz Santisteban, Camilo. 2015. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Revista Estomatológica Herediana*, 25(4), 268-277.
- Pooja J. Rao, P; Halagur B. Sowbhagya,H. 2017. Chapter 7 - Nanoencapsulation of Spice Oils, Editor(s): Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria Holban, In *Handbook of Food Bioengineering, Soft Chemistry and Food Fermentation*, Academic Press, pp. 179-207, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811412-4.00007-2>.
- Popova, T; and P. Marinova. 2013. "Carcass composition and meat quality in lambs reared indoors and on pasture." *Agricultural Science and Technology*. 5(3): 325-330.
- Popova, T; Tejada, L; Peñarrieta, J; Smith, M; Bush, R; Hopkins, D. 2021. Meat of South American camelids - Sensory quality and nutritional composition, *Meat Science*, 171: 108285. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108285>.
- Quispe, E; Rodríguez, T; Iñiguez L; Mueller, J. 2009. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamérica. *Animal Genetic Information* 45:1-14.
- Rawat, A; Kholiya, S; Chauhan, A; Kumar, D; Venkatesha, K.T; Upadhyay, R.K.; Padalia, R.C. 2023. Chemical composition of the essential oil from different plant parts of *Zingiber zerumbet* Sm. grown in the foothills of Uttarakhand, *Biochemical Systematics and Ecology*, 108: 104627, <https://doi.org/10.1016/j.bse.2023.104627>.
- Riaz, Muhammad; Ahmad, Rizwan; Rahman, Najm Ur; Khan, Zahid; Dou, Deqiang; Sechel, Gabriela; Manea, Rosana. 2020. Traditional uses, phyto-chemistry and pharmacological activities of *Tagetes patula* L. *Journal of Ethnopharmacology*, 112718–. doi:10.1016/j.jep.2020.112718 .
- Ripoll, G; Alcalde, M; Argüello, A; Panea, B. 2019. Web-based survey of consumer preferences for the visual appearance of meat from suckling kids, *Italian Journal of*

- Animal Science. 18(1): 1284-1293, <https://doi.org/10.1080/1828051X.2019.1649990>
- Rodríguez, G; Squeo, G; Estivi, L; Quezada, S; Buleje, D; Caponio, F; Brandolini, A; Hidalgo, A. 2021. Changes in stability, tocopherols, fatty acids and antioxidant capacity of sacha inchi (*Plukenetia volubilis*) oil during French fries deep-frying, Food Chemistry, 340, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127942>.
- Roobab, U; Khan, A; Lorenzo, J; Arshad, R; Chen, B; Zeng, X; Bekhit, A; Suleman, R; Aadil, R. 2021. A systematic review of clean-label alternatives to synthetic additives in raw and processed meat with a special emphasis on high-pressure processing (2018–2021), Food Research International, 150: 110792, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110792>.
- Rout, S; Tambe, S; Deshmukh, R; Mali, S; Cruz, J; Srivastav, P; Amin, P; Gaikwad, K; Andrade, E; Oliveira, M. 2022. Recent trends in the application of essential oils: The next generation of food preservation and food packaging, Trends in Food Science & Technology, 129: 421-439. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.10.012>.
- Ruiz, J; Salazar, M. 2021. Composición química y actividad antibacteriana de los aceites esenciales de *Citrus paradisi*, *Juglans neotropica* Diels, *Schinus molle* y *Tagetes elliptica* Smith. Revista de la Sociedad Química del Perú, 87: 228-241. <https://dx.doi.org/10.37761/rsqp.v87i3.350>
- Saani, M; Lawrence, R; Lawrence, K. 2018. Evaluation of pigments from methanolic extract of *Tagetes erecta* and *Beta vulgaris* as antioxidant and antibacterial agent. Natural Product Research. 32, 10, 1208-1211. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1326037>.
- Salachna, P; Łopusiewicz, Ł; Wesołowska, A; Meller, E; Piechocki, R. 2021. Mushroom waste biomass alters the yield, total phenolic content, antioxidant activity and essential oil composition of *Tagetes patula* L. Industrial Crops and Products, 171: 113961. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113961>.
- Salehi, B; Valussi, M; Morais, M. F. B; Carneiro, J. N. P; Leal, A; Coutinho, H. D. M; Sharifi-Rad, J. 2018. *Tagetes* spp. Essential Oils and Other Extracts: Chemical Characterization and Biological Activity. Molecules, 23:11. <https://doi:10.3390/molecules23112847>
- Salvá, B. K; Zumalacárregui, J. M; Figueira, A. C; Osorio, M. T; Mateo, J. 2009. Nutrient composition and technological quality of meat from alpacas reared in Peru. Meat Science, 82(4): 450–455. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.02.015
- Sánchez, C. 2004. Crianza y producción de Alpacas: Herencia Ancestral (Ediciones).

Lima.pp 132-133

- Sánchez, E; Fuentes, E; Navarro, C; Sayas E; Sendra E; Fernández, J; Pérez, J.A. 2016. Effects of tuna pâté thickness and background on CIEL*a*b* color parameters and reflectance spectra. Food control. 22: 1226-1232. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.01.022>
- Sanchez, P; Arogancia, H; Boyles, K; Pontillo, A; Ali. M. 2022. Emerging nondestructive techniques for the quality and safety evaluation of pork and beef: Recent advances, challenges, and future perspectives, Applied Food Research, 2(2):100147. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100147>.
- Sanguansri, P; Mary Ann Augustin, M. 2006. Nanoscale materials development – a food industry perspective, Trends in Food Science & Technology, Volume 17 (10): ,47-556, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.04.010>.
- Segovia, I; Suárez, L; Castro, A; Suárez, S; Ruiz, J. 2010. Chemical composition of essential oil from *Tagetes elliptica* Smith “chincho” and antioxidant, antibacterial and antifungal activities. Ciencia e Investigación Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM, 13: 81-86.
- Senatore, F; Napolitano, F; Mohamed, M; Harris, P; Mnkeni; P; Henderson, J. 2004. Antibacterial activity of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oil with different chemical composition. Flavour Fragr. J.19(6): 574-578. <https://doi:10.1002/ffj.1358>.
- Shahab, M; Rizwanullah, M; Alshehri, S; Imam, S.S. 2020. Optimization to development of chitosan decorated polycaprolactone nanoparticles for improved ocular delivery of dorzolamide: *In vitro*, ex vivo and toxicity assessments. Int. J. Biol. Macromol. 163: 2392–2404. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.185>
- Sharififard, M.; Kouchak, M.; Alizadeh, I.; Jahanifard, E. 2021. Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *viride*) Essential Oil: Extraction, Preparation, Characterization, and Encapsulation by Chitosan-Carbomer Nanoparticles for Biomedical Application. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical. 16: e101013. <https://doi.org/Pashkunova.10.5812/jjnpp.101013>
- Sharma, S; Barkauskaite, S; Jaiswal, A; Jaiswal, S. 2021. Essential oils as additives in active food packaging, Food Chemistry, 343: 128403, <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128403>.
- Shetta, A; Kegere, J; Mamdouh, W. 2019. Comparative study of encapsulated peppermint and green tea essential oils in chitosan nanoparticles: Encapsulation, thermal stability, *in-vitro* release, antioxidant and antibacterial activities. International Journal of

- Biological Macromolecules, 126: 731-742.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.161>.
- Shu, X.Z; Zhu, K.J. 2002. The influence of multivalent phosphate structure on the properties of ionically cross-linked chitosan films for controlled drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 54: 235–243.
- Singh, P; Krishna, A; Kumar, V; Krishna, S; Singh, K; Gupta M; Singh, S. 2015. Chemistry and biology of industrial crop *Tagetes* Species: a review. *Journal of Essential Oil Research.* 28: 1-14. <http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2015.1076740>
- Singh. N; Rajini. P.S. (2004). *Food Chemistry.* 85: 611.
- Šivel, M; Kráčmar, S; Fišera, M; Klejdus, B; Kubáň, V. 2014. Lutein content in marigold flower (*Tagetes erecta* L.) concentrates used for production of food supplements. *Czech Journal of Food Sciences,* 32(6): 521-525.
<https://doi.org/10.17221/104/2014-CJFS>
- Skendi, A; Irakli, M; Chatzopoulou, P; Bouloumpasi, E; Biliaderis.C. 2022. Phenolic extracts from solid wastes of the aromatic plant essential oil industry: Potential uses in food applications. *Food Chemistry Advances,* 1: 100065,
<https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100065>.
- Smith, A; Bush, R; Thomson, P. C; Hopkins, D. 2015. Carcass traits and saleable meat yield of alpacas (*Vicugna pacos*) in Australia. *Meat Science,* 107: 1–11. doi:10.1016/j.meatsci.2015.04.003
- Smith, M; Bush, R. D; van de Ven, R. J; Hall, E. J. S; Greenwood, P. L; Hopkins, D. L. 2017. The impact of gender and age on the nutritional parameters of alpaca (*Vicugna pacos*) meat, colour stability and fat traits. *Meat Science,* 123: 21–28. doi:10.1016/j.meatsci.2016.08.012
- Soladoye, O; Juárez, L; Aalhus, L;Shand, P;Estévez, M. 2015. Protein oxidation in processed meat: mechanisms and potential implications on human health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 14: 106-122.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12127>
- Soliman, N.M; Shakeel, F; Haq, N; Alanazi, F.K; Alshehri, S; Bayomi, M; Alenazi, A.S.M; Alsarra, I.A. 2022. Development and Optimization of Ciprofloxacin HCl-Loaded Chitosan Nanoparticles Using Box–Behnken Experimental De-sign. *Molecules,* 27: 4468. <https://doi.org/10.3390/molecules27144468>
- Song, X., Wang, L., Liu, T., Liu, Y., Wu, X., & Liu, L. 2021. Mandarin (*Citrus reticulata* L.) essential oil incorporated into chitosan nanoparticles: Characterization, anti-biofilm

- properties and application in pork preservation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 185, 620–628. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.06.195>
- Stefanaki, A.; Andel, T. 2021. Chapter 3. Mediterranean aromatic herbs and their culinary use. Stefanaki, A.; Andel. 1rd ed.; *Aromatic Herbs in Food*. Naturalis Biodiversity Center, Leiden, The Netherlands, 93-121. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822716-9.00003-2>
- Su, H., Huang, C., Liu, Y., Kong, S., Wang, J., Huang, H., & Zhang, B. 2020. Preparation and Characterization of *Cinnamomum* Essential Oil–Chitosan Nanocomposites: Physical, Structural, and Antioxidant Activities. *Processes*. 8: 834. <https://doi.org/10.3390/PR8070834>
- Sundar, S; Parikh, J. 2023. Advances and trends in encapsulation of essential oils, *International Journal of Pharmaceutics*, 635: 122668, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2023.122668>.
- Tagnaout, I; Zerkani, H; Hadi, N; El Moumen, B; El Makhoukhi, F; Bouhrim, M; Al-Salahi, R; Nasr, F.A; Mechchate, H; Zair, T. 2022. Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Thymus broussonetii* Boiss and *Thymus capitatus* (L.) Hoffmann and Link Essential Oils. 11: 954. <https://doi.org/10.3390/plants11070954>
- Tefas, L. R; Tomuța, I; Achim, M; Vlase, L. 2015. Development and optimization of quercetin-loaded plga nanoparticles by experimental design. *Clujul Medical*, 88(2): 214-223. <http://dx.doi.org/10.15386/cjmed-418>.
- Teixeira, B; Marques, A; Ramos, C; Neng, N; Nogueira, J; Saraiva, J; Nunes, M. 2012. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils, *Industrial Crops and Products*, 43, 587-595. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.069>.
- Tereschuk, M., Riera, M., Castro, G., Abdala, L. 1997. Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. *Journal of Ethnopharmacology*, 56: 3, 227-232. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00038-X](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00038-X).
- Thielmann, Julian; Muranyi, Peter; Kazman, P. 2019. Screening essential oils for their antimicrobial activities against the foodborne pathogenic bacteria *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Heliyon*, 5(6): e01860. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01860>
- Tinello, F; Lante, A; Bernardi, M. Cappiello, F; Galgano, F; Caruso, M; Favati, F. 2018. Comparison of OXITEST and RANCIMAT methods to evaluate the oxidative

- stability in frying oils. *European Food Research and Technology*. 244: 747–755.
<https://doi.org/10.1007/s00217-017-2995-y>
- Traxl, R; Wieser, M; Perfler, L; Lackner, R. 2023. Quantification of oxygen uptake enabled by temperature- and pressure-corrected oxidation stability tests — Application to assessment of aging susceptibility of bitumen, *Construction and Building Materials*, 392: 131926, <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2023.131926>.
- Triki, M; Herrero, A.M; Jiménez, F; Ruiz, C. 2018. Quality Assessment of Fresh Meat from Several Species Based on Free Amino Acid and Biogenic Amine Contents during Chilled Storage. *Foods*, 7:132. <https://doi.org/10.3390/foods7090132>
- Varas, M; Pascual, G; Barriga, M; Villegas, L; Ursetta, S; Guevara, A; Hidalgo, A. 2020. Effect of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) lycopene-rich extract on the kinetics of rancidity and shelf-life of linseed (*Linum usitatissimum* L.) oil, *Food Chemistry*, 302: 125327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125327>.
- Varghese, S; Siengchin, S; Parameswaranpillai, J. 2020. Essential oils as antimicrobial agents in biopolymer-based food packaging - A comprehensive review, *Food Bioscience*, 38: 100785. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100785>.
- Vázquez, A. M; Aimar, M. L; Demmel, G. I; Criado, S. G; Ruiz, G. M; Cantero, J. J; Rossi, L. I; Velasco, M. I. 2011. Determinación de Compuestos Orgánicos Volátiles de *Tagetes argentina* Cabrera (Asteraceae) utilizando análisis por HS-SPME. *Boletín Latinoamericano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(5): 0717-7917, 463-469. www.blacpma.usach.cl.
- Verlee, A; Mincke, S; Stevens, C. V. 2017. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydrate Polymers*. 164: 268–283. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.001>
- Villada, J; JAguillón, J; Soto, E; Loango, N. 2021. Evaluation of antibacterial activity of extract and essential oil of *Tagetes patula* L. *in vitro* against *Ralstoniasolanacearum* biovar 2, *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 54:17-18 <https://doi.org/10.1080/03235408.2021.1916185>
- Viuda, M; Ruiz, Y; Sánchez, E; Fernández, J; Pérez, J. 2010. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. 25(1): 13-19. <https://doi.org/10.1002/ffj.1951>
- Walia, S; Kumar. R. 2020. Wild marigold (*Tagetes minuta* L.) an important industrial aromatic crop: liquid gold from the Himalaya. *J. Essent. Oil Res.* 32: 373-393. <https://doi.org/10.1080/10412905.2020.1813211>

- Wang, W; Zhao, D; Xiang, Q; Li, K; Wang, B; Yanhong Bai, Y. 2021. Effect of *cinnamon* essential oil nanoemulsions on microbiological safety and quality properties of chicken breast fillets during refrigerated storage, *Food Science and Technology*, 152: 112376, <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112376>.
- Weisany, W; Yousefi, S; Tahir, N; Golestanehzadeh, N; McClements, D; Adhikari, B; Ghasemlou, M. 2022. Targeted delivery and controlled released of essential oils using nanoencapsulation: A review, *Advances in Colloid and Interface Science*, 303: 102655, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2022.102655>.
- Wintola, O; Olajuyigbe, A; Afolayan, A; Coopoosamy, R; Olajuyigbe, O. 2021. Chemical composition, antioxidant activities and antibacterial activities of essential oil from *Erythrina caffra* Thunb. growing in South Africa. *Heliyon*, 7:e07244. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07244>.
- Wood, J; Richardson, R; Nute, G; Fisher, A; Campo, M; Asapidou, E; Shear, P; Enser, M. 2003. Effects of fatty acids on meat quality: a Review. *Meat Science* 66(1):21- 32.
- Xu, J., Wei, R., Jia, Z., & Song, R. 2020. Characteristics and bioactive functions of chitosan/gelatin-based film incorporated with ϵ -polylysine and astaxanthin extracts derived from by-products of shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Hydrocolloids*, 100, 105436. <https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2019.105436>
- Yalta, M. 2019. Efecto de aceites esenciales de huacatay (*Tagetes minuta* L.) y mariasacha (*Tagetes elliptica* Sm.) como conservante en la carne de cerdo. Tesis para optar el Título profesional de ingeniería Agroindustrial. Escuela Profesional de Ingeniería Agroindustrial de la Facultad de Ingeniería y Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas. Chachapoyas-Perú.
- Zabot, G.L; Schaefer, F; Polano, L; Vinícius, M; Herrera, E; Palacin, H; Córdova, J.S; Best, I; Olivera, L. 2022. Encapsulation of Bioactive Compounds for Food and Agricultural Applications. *Polymers*, 14: 4194. <https://doi.org/10.3390/polym14194194>
- Zanetti, M; Carniel, T; Dalcanton, F; Silva dos Anjos, R; Riella, H; Araújo, P; de Oliveira, D; Fiori, M. 2018. Use of encapsulated natural compounds as antimicrobial additives in food packaging: A brief review, *Trends in Food Science & Technology*, 81: 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.09.003>.
- Zeng, L; Lin, X; Li, P; Liu, F; Guo, H; Li, W. 2021. Recent advances of organogels: from fabrications and functions to applications, *Progress in Organic Coatings*, 159: 106417, <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2021.106417>.

- Zhang, H; Li, X; Kang, H. 2019. Chitosan coatings incorporated with free or nano-encapsulated *Paulownia Tomentosa* essential oil to improve shelf-life of ready-to-cook pork chops. *Lwt*, 116. <https://doi:10.1016/j.lwt.2019.108580>
- Zhang, L; Gao, F; Ge, J; Li, H; Xia, F; Bai, H; Piao, X; Shi, L. 2022. Potential of Aromatic Plant-Derived Essential Oils for the Control of Foodborne Bacteria and Antibiotic Resistance in Animal Production: A Review. *Antibiotics*, 11: 1673. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111673>
- Zhong, X; Wang, X; Zhou, N; Li, J; Liu, J; Yue, J; Hao, X; Gan, M; Lin, P; Shang, X. 2021. Chemical characterization of the polar antibacterial fraction of the ethanol extract from *Rosmarinus officinalis*, *Food Chemistry*, 344, 128674.

VIII. ANEXOS

Anexo 1: Identificación de planta *Tagetes elliptica* Sm.

Para el análisis genético se usaron muestras de ADN genómico de *T. elliptica* de 15 muestras de Huancayo que tengan una alta calidad y concentración de ADN.



Material vegetal de *T. elliptica*. A) Muestra individual. B) Muestras provenientes Huancayo.

| MUESTRA | ESPECIE | CÓDIGO | 260/280 | ng/ μ l |
|---------|---------------------|--------|---------|-------------|
| 1 | <i>T. elliptica</i> | P1-H1 | 1.744 | 47.804 |
| 2 | <i>T. elliptica</i> | P1-H2 | 1.5025 | 102.518 |
| 3 | <i>T. elliptica</i> | P1-H3 | 1.355 | 280.171 |
| 4 | <i>T. elliptica</i> | P1-H4 | 1.8 | 654.1715 |
| 5 | <i>T. elliptica</i> | P1-H5 | 1.5145 | 831.604 |
| 6 | <i>T. elliptica</i> | P2-M1 | 2.098 | 224.28 |
| 7 | <i>T. elliptica</i> | P2-M2 | 2.034 | 281.6015 |
| 8 | <i>T. elliptica</i> | P2-M3 | 2.1305 | 422.561 |
| 9 | <i>T. elliptica</i> | P2-M4 | 1.9815 | 292.706 |
| 10 | <i>T. elliptica</i> | P2-M5 | 2.0865 | 95.832 |
| 11 | <i>T. elliptica</i> | P3-D1 | 2.047 | 1347.7725 |
| 12 | <i>T. elliptica</i> | P3-D2 | 1.9765 | 1474.174 |
| 13 | <i>T. elliptica</i> | P3-D3 | 2.008 | 640.852 |
| 14 | <i>T. elliptica</i> | P3-D4 | 2.069 | 898.225 |
| 15 | <i>T. elliptica</i> | P3-D5 | 2.0185 | 749.7965 |

Cuantificación y relación A260/A280 del ADN genómico de *T. elliptica* con los protocolos de Palomino (2011).

Anexo 2: Diseño experimental de Box-Behnken de 3 factores y 2 niveles para optimizar las cápsulas de quitosano cargadas de aceite esencial de chincho.

D:\francis 10.11.20\Articulo encapsulación\Box Behnken-optimización.dpx - Design-Expert 11

File Edit View Display Options Design Tools Help

Design Layout Column Info Pop-Out View

Navigation Pane

- Design (Actual)
 - Information
 - Notes
 - Summary
 - Graph Columns
 - Evaluation
 - Analysis
 - R1:Tamaño partícula (Er
 - R2:Potencial Z (Empty)
 - R3:EE (Empty)
 - Optimization
 - Numerical
 - Graphical
 - Post Analysis
 - Point Prediction
 - Confirmation
 - Coefficients Table

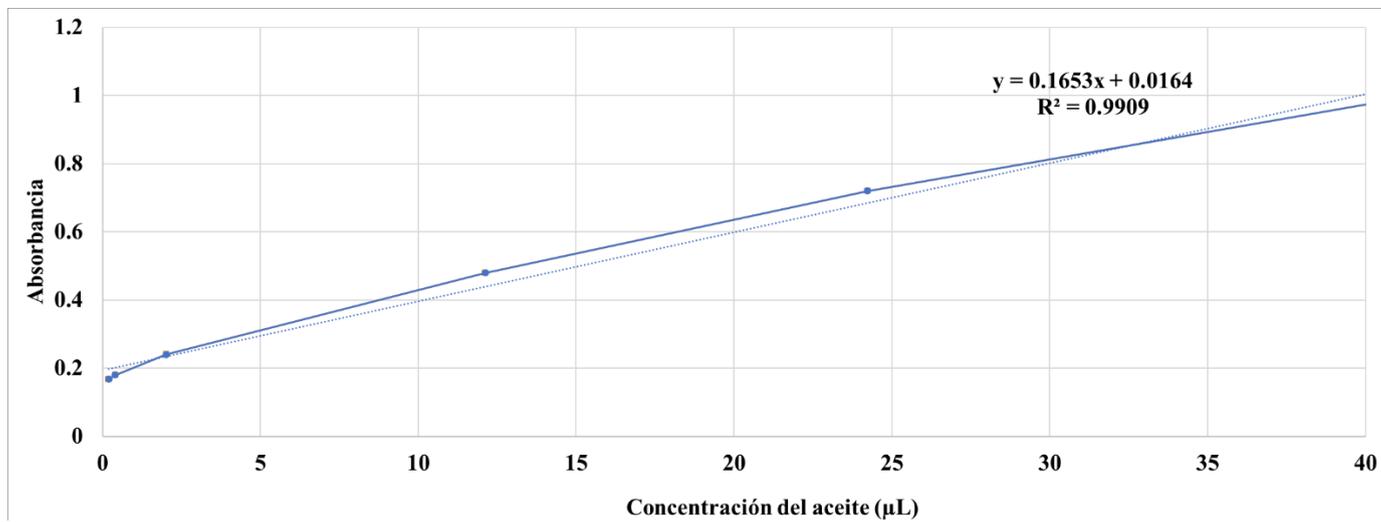
| Std | Run | Factor 1 A:pH | Factor 2 B:Q:TPP | Factor 3 C:Q:Ae | Response 1 Tamaño partícula nm | Response 2 Potencial Z mV | Response 3 EE % |
|-----|-----|------------------|---------------------|--------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 5 | 1 | -1 | 0 | -1 | | | |
| 4 | 2 | 1 | 1 | 0 | | | |
| 17 | 3 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 10 | 4 | 0 | 1 | -1 | | | |
| 2 | 5 | 1 | -1 | 0 | | | |
| 7 | 6 | -1 | 0 | 1 | | | |
| 1 | 7 | -1 | -1 | 0 | | | |
| 13 | 8 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 11 | 9 | 0 | -1 | 1 | | | |
| 15 | 10 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 14 | 11 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 16 | 12 | 0 | 0 | 0 | | | |
| 8 | 13 | 1 | 0 | 1 | | | |
| 6 | 14 | 1 | 0 | -1 | | | |
| 3 | 15 | -1 | 1 | 0 | | | |
| 12 | 16 | 0 | 1 | 1 | | | |
| 9 | 17 | 0 | -1 | -1 | | | |

Design Properties

Run 1

| | |
|------------|--------|
| Comment | |
| Row Status | Normal |

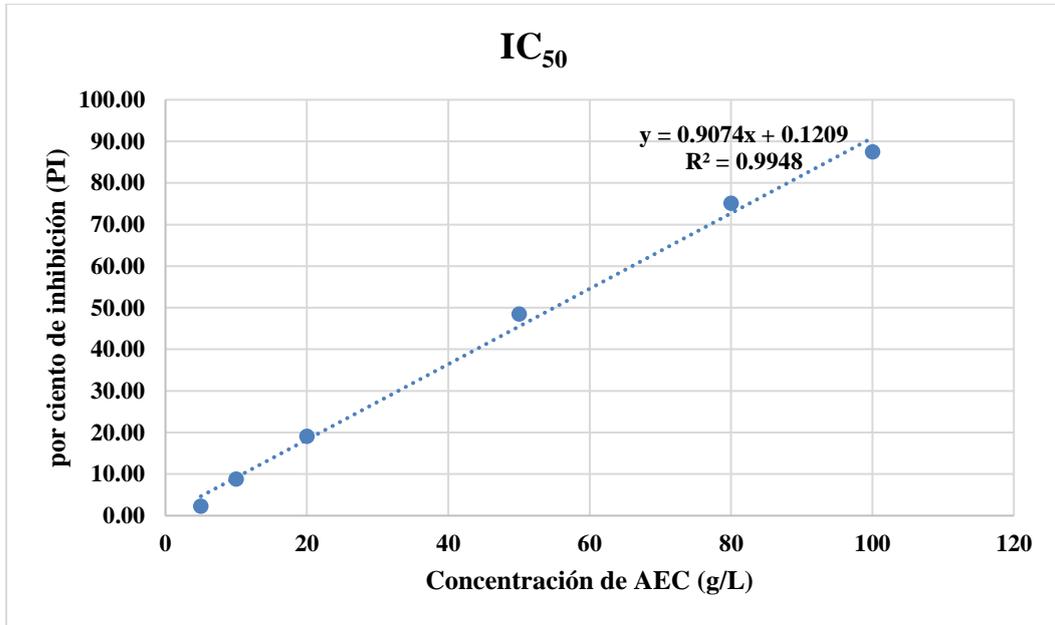
Anexo 3: Curva de calibración para concentración de AEC



Anexo 4: Cálculo de IC₅₀

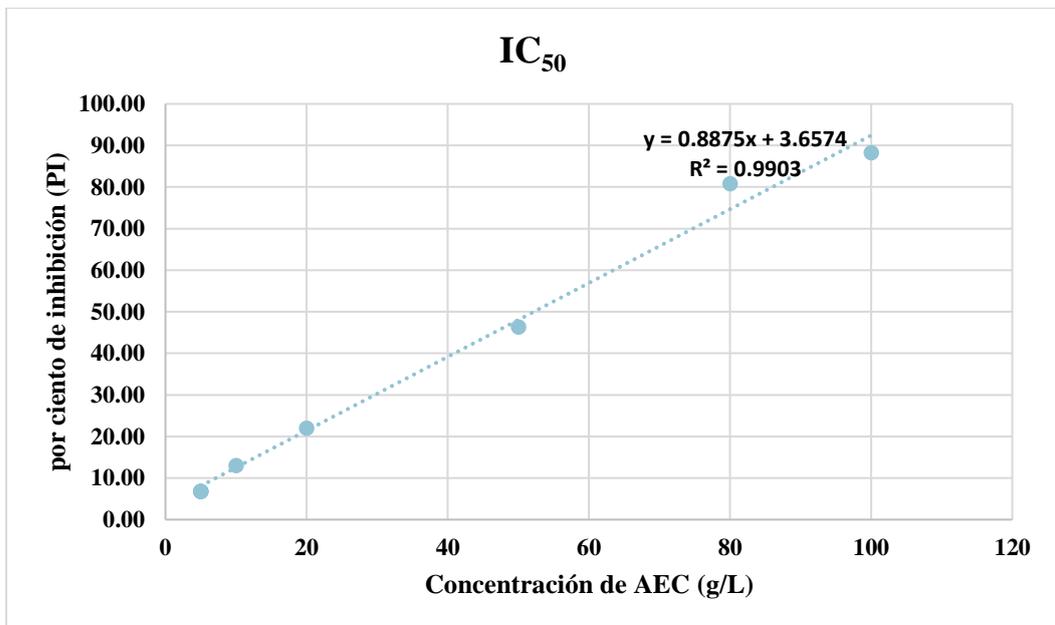
Determinación de IC₅₀ (Concentración inhibitoria media máxima) en el aceite de las hojas para la capacidad antioxidante DPPH.

R₁



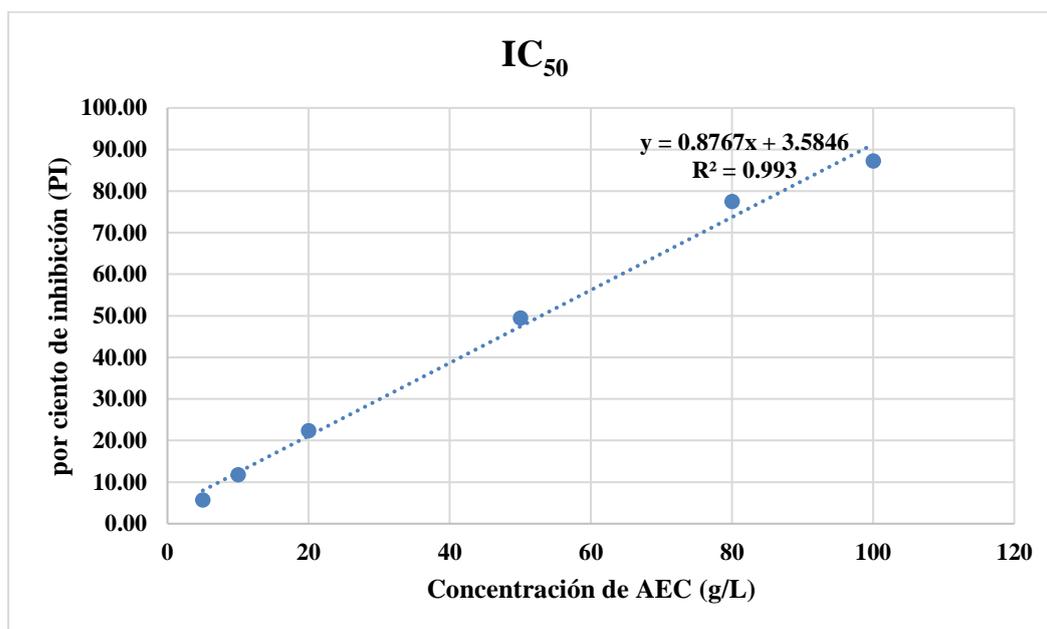
$$IC_{50} = ((50 - 0.1209) / 0.9074) = 54.96$$

R₂



$$IC_{50} = ((50 - 3.6574) / 0.8875) = 52.22$$

R₃



$$IC_{50} = ((50 - 3.5846) / 0.8767) = 52.94$$

Promedio $IC_{50} = 53.38 \pm 1.43$

*R= Repetición

Se siguió la misma metodología para todo los análisis de capacidad antioxidante.

Anexo 5: Resultados de análisis estadístico

1. Resultados de análisis estadístico de capacidad antioxidante de las hojas y mezcla de hojas con tallo del AEC

Aceite esencial de hojas de chincho

ABTS

Prueba de normalidad

| | Concentración | Shapiro-Wilk | | | |
|------|---------------|--------------|-------------|----|------|
| | | Estadístico | Estadístico | gl | Sig. |
| ABTS | 5.0 | .286 | .931 | 3 | .493 |
| | 10.0 | .261 | .957 | 3 | .601 |
| | 20.0 | .193 | .997 | 3 | .889 |
| | 50.0 | .365 | .797 | 3 | .107 |
| | 80.0 | .298 | .916 | 3 | .438 |
| | 100.0 | .203 | .994 | 3 | .848 |

Prueba de homogeneidad de varianzas

ABTS

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 1.306 | 5 | 12 | .325 |

ANOVA

ABTS

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Entre grupos | 1284.170 | 5 | 256.834 | 206.043 | .000 |
| Dentro de grupos | 14.958 | 12 | 1.247 | | |
| Total | 1299.128 | 17 | | | |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | N | Subconjunto | | | |
|---------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5,0 | 3 | 16,095811696603 390 | 24,241366590051 356 | 34,623875599443 830 | 37,817811639851 310 |
| 10,0 | 3 | | | | |
| 20,0 | 3 | | | | |
| 50,0 | 3 | | | | |
| 80,0 | 3 | | | | |

| | | | | |
|-------|---|-------|------|-----------------|
| 100,0 | 3 | | | 40,494381544224 |
| Sig. | | 1,000 | ,086 | 060 ,100 |

DPPH

Prueba de normalidad

| | Concentración | Shapiro-Wilk | | |
|------|---------------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. |
| DPPH | 5.0 | .919 | 3 | .448 |
| | 10.0 | .952 | 3 | .577 |
| | 20.0 | .834 | 3 | .197 |
| | 50.0 | .952 | 3 | .576 |
| | 80.0 | .991 | 3 | .822 |
| | 100.0 | .923 | 3 | .461 |

Prueba de homogeneidad de varianzas

DPPH

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 1.129 | 5 | 12 | .397 |

ANOVA

DPPH

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Entre grupos | 18484.034 | 5 | 3696.807 | 910.089 | .000 |
| Dentro de grupos | 48.744 | 12 | 4.062 | | |
| Total | 18532.778 | 17 | | | |

| Concentración | N | Subconjunto | | | |
|---------------|---|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5,0 | 3 | 4,900467821816 140 | | | |
| 10,0 | 3 | | 11,17559095087 1857 | | |
| 20,0 | 3 | | | 21,14115597261 6655 | |
| 50,0 | 3 | | | | 48,09647281557 3950 |
| 80,0 | 3 | | | | |
| 100,0 | 3 | | | | |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | Subconjunto | |
|---------------|--------------------|--------------------|
| | 5 | 6 |
| 5,0 | 77,778463733519910 | 87,637019659491570 |
| 10,0 | | |
| 20,0 | | |
| 50,0 | | |
| 80,0 | | |
| 100,0 | | |
| Sig. | 1,000 | 1,000 |

FRAP

Prueba de normalidad

| | Concentración | Shapiro-Wilk | | |
|------|---------------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. |
| FRAP | .3125 | .777 | 3 | .060 |
| | .6250 | .972 | 3 | .676 |
| | 1.2500 | .985 | 3 | .765 |
| | 3.1250 | .996 | 3 | .872 |
| | 5.0000 | .899 | 3 | .381 |

Prueba de homogeneidad de varianzas

FRAP

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 5.528 | 4 | 10 | .013 |

ANOVA

FRAP

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Entre grupos | 158.325 | 4 | 39.581 | 431.181 | .000 |
| Dentro de grupos | .918 | 10 | .092 | | |
| Total | 159.243 | 14 | | | |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | N | Subconjunto | | |
|---------------|---|------------------|-------------------|-------------------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| ,3125 | 3 | ,063846405171897 | 2,317416680682910 | 8,725643152243471 |
| ,6250 | 3 | ,233539613770331 | | |
| 1,2500 | 3 | ,785586275294486 | | |
| 3,1250 | 3 | | | |
| 5,0000 | 3 | | | |
| Sig. | | ,089 | 1,000 | 1,000 |

FIC-AEC

Prueba de normalidad

| | Concentración | Shapiro-Wilk | | |
|-----|---------------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. |
| FIC | 1.25 | .991 | 3 | .818 |
| | 2.50 | .984 | 3 | .758 |
| | 5.00 | .928 | 3 | .480 |
| | 12.50 | .833 | 3 | .195 |
| | 20.00 | .801 | 3 | .117 |
| | 25.00 | .998 | 3 | .909 |

Prueba de homogeneidad de varianzas

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 2.277 | 5 | 12 | .113 |

ANOVA

FIC

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Entre grupos | 8671.522 | 5 | 1734.304 | 314.351 | .000 |
| Dentro de grupos | 66.205 | 12 | 5.517 | | |
| Total | 8737.727 | 17 | | | |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | N | Subconjunto | | | |
|---------------|---|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1,25 | 3 | -17,214903217714962 | | | |
| 2,50 | 3 | | -3,977740111522678 | | |
| 5,00 | 3 | | | 7,877914402739494 | |
| 12,50 | 3 | | | | 27,486747385379676 |
| 20,00 | 3 | | | | |
| 25,00 | 3 | | | | |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | Subconjunto | |
|---------------|-------------|--------------------|
| | 5 | |
| 1,25 | | |
| 2,50 | | |
| 5,00 | | |
| 12,50 | | |
| 20,00 | | 39,903829272886540 |
| 25,00 | | 40,880560681731050 |
| Sig. | | ,995 |

RANCIMAT- AEC
Pruebas de normalidad

| | Concentración | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| IIA AEC | 5 | .255 | 3 | . | .963 | 3 | .630 |
| | 10 | .195 | 3 | . | .996 | 3 | .882 |
| | 20 | .341 | 3 | . | .848 | 3 | .234 |
| | 50 | .176 | 3 | . | 1.000 | 3 | .983 |
| | 80 | .178 | 3 | . | 1.000 | 3 | .960 |
| | 100 | .176 | 3 | . | 1.000 | 3 | .985 |

Prueba de homogeneidad de varianzas

IIA AEC

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| .113 | 5 | 12 | .987 |

ANOVA

IIA AEC

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Entre grupos | .027 | 5 | .005 | 2.856 | .063 |
| Dentro de grupos | .023 | 12 | .002 | | |
| Total | .049 | 17 | | | |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | N | Subconjunto | | | |
|---------------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5.0 | 3 | 22.128922510386 900 | | | |
| 10.0 | 3 | | 30.951531136377 135 | | |
| 20.0 | 3 | | | 38.415842976703 416 | |
| 50.0 | 3 | | | | 45.6640140304886 60 |
| 80.0 | 3 | | | | |
| 100.0 | 3 | | | | |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Aceite esencial de mezcla de hojas y tallos de chincho

Pruebas de normalidad

| | Concentración | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| ABTS | 5.0 | .216 | 3 | . | .988 | 3 | .793 |
| | 10.0 | .305 | 3 | . | .905 | 3 | .403 |
| | 20.0 | .260 | 3 | . | .958 | 3 | .606 |
| | 50.0 | .372 | 3 | . | .781 | 3 | .069 |
| | 80.0 | .176 | 3 | . | 1.000 | 3 | .980 |
| | 100.0 | .181 | 3 | . | .999 | 3 | .939 |

Prueba de homogeneidad de varianzas

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 3.177 | 5 | 12 | .047 |

ANOVA

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Entre grupos | 2880.765 | 5 | 576.153 | 148.840 | .000 |
| Dentro de grupos | 46.452 | 12 | 3.871 | | |
| Total | 2927.216 | 17 | | | |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | N | Subconjunto | | | |
|---------------|---|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5.0 | 3 | 22.12892251030 | 30.951531136377 | 38.415842976703 | 45.664014030488 |
| 10.0 | 3 | | | | |
| 20.0 | 3 | | 416 | | |
| 50.0 | 3 | | | | |
| 80.0 | 3 | | | | |
| 100.0 | 3 | | | | |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

| Concentración | Subconjunto | |
|---------------|--------------------|--------------------|
| | 5 | 6 |
| 5.0 | 52.992228880612370 | 59.244011026728366 |
| 10.0 | | |
| 20.0 | | |
| 50.0 | | |
| 80.0 | | |
| 100.0 | | |
| Sig. | 1.000 | 1.000 |

DPPH- AEC-HOJA Y TALLO

Pruebas de normalidad

| | Concentración | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| DPPH | 5.0 | .385 | 3 | . | .750 | 3 | .000 |
| | 10.0 | .319 | 3 | . | .884 | 3 | .337 |
| | 20.0 | .308 | 3 | . | .902 | 3 | .392 |
| | 50.0 | .368 | 3 | . | .791 | 3 | .094 |
| | 80.0 | .263 | 3 | . | .955 | 3 | .593 |
| | 100.0 | .260 | 3 | . | .959 | 3 | .609 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 3.784 | 5 | 12 | .027 |

ANOVA

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|----------|------|
| Entre grupos | 21492.059 | 5 | 4298.412 | 1694.999 | .000 |
| Dentro de grupos | 30.431 | 12 | 2.536 | | |
| Total | 21522.490 | 17 | | | |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | N | Subconjunto | | | |
|---------------|---|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 5.0 | 3 | 7.150927064826210 | 13.746981914263591 | 25.154434877682117 | 67.448407817411500 |
| 10.0 | 3 | | | | |
| 20.0 | 3 | | | | |
| 50.0 | 3 | | | | |
| 80.0 | 3 | | | | |
| 100.0 | 3 | | | | |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | Subconjunto | |
|---------------|--------------------|--------------------|
| | 5 | 6 |
| 5.0 | | |
| 10.0 | | |
| 20.0 | | |
| 50.0 | | |
| 80.0 | 86.740239624618480 | |
| 100.0 | | 91.862785294519610 |
| Sig. | 1.000 | 1.000 |

FRAP-AEC HOJA Y TALLO

Pruebas de normalidad

| | Concentración | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| FRAP | .3125 | .175 | 3 | . | 1.000 | 3 | 1.000 |
| | .6250 | .175 | 3 | . | 1.000 | 3 | 1.000 |
| | 1.2500 | .253 | 3 | . | .964 | 3 | .637 |
| | 3.1250 | .283 | 3 | . | .935 | 3 | .507 |
| | 5.0000 | .343 | 3 | . | .842 | 3 | .220 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

FRAP

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 7.967 | 4 | 10 | .004 |

ANOVA

FRAP

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|-----------|------|
| Entre grupos | 108.864 | 4 | 27.216 | 16015.181 | .000 |
| Dentro de grupos | .017 | 10 | .002 | | |
| Total | 108.881 | 14 | | | |

FRAP-AEC HOJA Y TALLO

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | N | Subconjunto | | | |
|---------------|---|----------------------|------------------|----------------------|-----------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| .3125 | 3 | .0546633491668 55 | | | |
| .6250 | 3 | | .195599092907394 | | |
| 1.2500 | 3 | | | .606758342564 721 | |
| 3.1250 | 3 | | | | 1.95686090280 0736 |
| 5.0000 | 3 | | | | |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

HSD Tukey^{a,b}

| | |
|--|----------------------------|
| Concentración | Subconjunto |
| .3125 .6250 1.2500 3.1250 5.0000 | 5 |
| Sig. | 7.225421792261875 1.000 |

FIC

Pruebas de normalidad

| | Concentración | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| FIC | 1.25 | .298 | 3 | . | .916 | 3 | .438 |
| | 2.50 | .198 | 3 | . | .995 | 3 | .868 |
| | 5.00 | .356 | 3 | . | .818 | 3 | .158 |
| | 12.50 | .310 | 3 | . | .899 | 3 | .381 |
| | 20.00 | .246 | 3 | . | .970 | 3 | .666 |
| | 25.00 | .326 | 3 | . | .873 | 3 | .305 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| Estadístico de | df1 | df2 | Sig. |
|----------------|-----|-----|------|
| Levene | | | |
| 5.181 | 5 | 12 | .009 |

ANOVA

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Entre grupos | 8119.463 | 5 | 1623.893 | 150.319 | .000 |
| Dentro de grupos | 129.636 | 12 | 10.803 | | |
| Total | 8249.099 | 17 | | | |

HSD Tukeya,b

| Concentración | N | Subconjunto | | | |
|---------------|---|----------------|----------------|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1.25 | 3 | - | | | |
| | | 14.29838867230 | | | |
| | | 9889 | | | |
| 2.50 | 3 | - | | | |
| | | 12.86066220839 | | | |
| | | 1101 | | | |
| 5.00 | 3 | - | | | |
| | | | 3.269783116915 | | |
| | | | 084 | | |

| | | | | | |
|-------|---|------|-------|----------------|----------------|
| 12.50 | 3 | | | 15.77955668211 | |
| 20.00 | 3 | | | 4162 | 32.64145138018 |
| 25.00 | 3 | | | | 9770 |
| | | | | | 39.53572083017 |
| | | | | | 7134 |
| Sig. | | .993 | 1.000 | 1.000 | .179 |

FIC HOJA Y TALLO

RANCIMAT-AEC HOJA Y TALLO

Pruebas de normalidad

| | Concentración | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| IIA | 5 | .217 | 3 | . | .988 | 3 | .789 |
| | 10 | .349 | 3 | . | .831 | 3 | .190 |
| | 20 | .320 | 3 | . | .883 | 3 | .334 |
| | 50 | .363 | 3 | . | .801 | 3 | .117 |
| | 80 | .266 | 3 | . | .952 | 3 | .580 |
| | 100 | .204 | 3 | . | .993 | 3 | .843 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

IIA

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 1.874 | 5 | 12 | .173 |

ANOVA

IIA

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Entre grupos | .083 | 5 | .017 | 21.850 | .000 |
| Dentro de grupos | .009 | 12 | .001 | | |
| Total | .092 | 17 | | | |

Rancimat

HSD Tukey^{a,b}

| Concentración | N | Subconjunto | | | |
|---------------|---|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 100 | 3 | .842400530235 712 | | | |
| 80 | 3 | .902418996793 541 | .902418996793 541 | | |
| 50 | 3 | | .961249734497 815 | .961249734497 815 | |
| 20 | 3 | | .975786776969 072 | .975786776969 072 | |
| 10 | 3 | | | .992904842034 172 | .992904842034 172 |
| 5 | 3 | | | | 1.05688519648 8905 |
| Sig. | | .155 | .059 | .724 | .117 |

2. Actividad antibacteriana

Staphylococcus aureus

Pruebas de normalidad

| | Concentracion | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------------------|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| diámetro inhibición | 12.5 | .369 | 3 | . | .787 | 3 | .085 |
| | 25.0 | .369 | 3 | . | .789 | 3 | .089 |
| | 50.0 | .385 | 3 | . | .750 | 3 | .000 |
| | 100.0 | .385 | 3 | . | .750 | 3 | .000 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

diámetro inhibición

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 1.148 | 3 | 8 | .387 |

ANOVA

diámetro inhibición

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Entre grupos | 48.737 | 3 | 16.246 | 15.927 | .001 |
| Dentro de grupos | 8.160 | 8 | 1.020 | | |
| Total | 56.897 | 11 | | | |

diámetro inhibición

HSD Tukey^{a,b}

| Concentracion | N | Subconjunto | | |
|---------------|---|-------------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 12,5 | 3 | 14,300 | | |
| 25,0 | 3 | 15,567 | 15,567 | |
| 50,0 | 3 | | 17,333 | 17,333 |
| 100,0 | 3 | | | 19,667 |
| Sig. | | ,462 | ,219 | ,085 |

Escherichia coli

Pruebas de normalidad

| | Concentracion | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------------------|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| diámetro inhibición | 12.5 | .175 | 3 | . | 1.000 | 3 | 1.000 |
| | 25.0 | .182 | 3 | . | .999 | 3 | .935 |
| | 50.0 | .356 | 3 | . | .818 | 3 | .157 |
| | 100.0 | .353 | 3 | . | .824 | 3 | .174 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

diámetro inhibición

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| .720 | 3 | 8 | .568 |

ANOVA

Diámetro inhibición

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Entre grupos | 10.809 | 3 | 3.603 | 4.110 | .049 |
| Dentro de grupos | 7.013 | 8 | .877 | | |
| Total | 17.822 | 11 | | | |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentracion | N | Subconjunto | |
|---------------|---|-------------|--------|
| | | 1 | 2 |
| 12,5 | 3 | 10,000 | |
| 25,0 | 3 | 10,867 | 10,867 |
| 50,0 | 3 | 11,200 | 11,200 |
| 100,0 | 3 | | 12,633 |
| Sig. | | ,445 | ,174 |

Salmonella infantis

Pruebas de normalidad

| | Concentracion | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------------------|---------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|-------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| diámetro inhibición | 12.5 | .353 | 3 | . | .824 | 3 | .174 |
| | 25.0 | .253 | 3 | . | .964 | 3 | .637 |
| | 50.0 | .385 | 3 | . | .750 | 3 | .000 |
| | 100.0 | .175 | 3 | . | 1.000 | 3 | 1.000 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

diámetro inhibición

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| .330 | 3 | 8 | .804 |

ANOVA

diámetro inhibición

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| Entre grupos | 10.220 | 3 | 3.407 | 6.779 | .014 |
| Dentro de grupos | 4.020 | 8 | .503 | | |
| Total | 14.240 | 11 | | | |

HSD Tukey^{a,b}

| Concentracion | N | Subconjunto | |
|---------------|---|-------------|--------|
| | | 1 | 2 |
| 12,5 | 3 | 10,633 | |
| 25,0 | 3 | 11,233 | 11,233 |
| 50,0 | 3 | 12,333 | 12,333 |
| 100,0 | 3 | | 13,000 |
| Sig. | | ,073 | ,062 |

3. Liberación *in vitro*

pH 3

Pruebas de normalidad

| | Tiempo | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------|--------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| pH 3 | 1.0 | .373 | 3 | . | .779 | 3 | .066 |
| | 2.0 | .184 | 3 | . | .999 | 3 | .927 |
| | 3.0 | .332 | 3 | . | .864 | 3 | .278 |
| | 4.0 | .351 | 3 | . | .826 | 3 | .179 |
| | 5.0 | .286 | 3 | . | .931 | 3 | .491 |
| | 6.0 | .295 | 3 | . | .919 | 3 | .450 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 1.539 | 5 | 12 | .250 |

ANOVA

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| Entre grupos | 132.861 | 5 | 26.572 | 92.888 | .000 |
| Dentro de grupos | 3.433 | 12 | .286 | | |
| Total | 136.294 | 17 | | | |

pH 3

HSD Tukey^{a,b}

| Tie mpo | N | Subconjunto | | | | |
|---------|---|------------------------|------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1.0 | 3 | 12.5027329349 63971 | | | | |
| 2.0 | 3 | | 14.27956685208849 7 | | | |
| 3.0 | 3 | | | 16.5647739186 16010 | | |
| 4.0 | 3 | | | 17.3671347529 85457 | 17.367134752985457 | |
| 5.0 | 3 | | | | 18.411304772867428 | |
| 6.0 | 3 | | | | | 20.87448676847864 0 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .480 | .233 | 1.000 |

pH 7

Pruebas de normalidad

| | Tiempo | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|------|--------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| pH 7 | 1.0 | .291 | 3 | . | .924 | 3 | .468 |
| | 2.0 | .239 | 3 | . | .975 | 3 | .699 |
| | 3.0 | .256 | 3 | . | .962 | 3 | .626 |
| | 4.0 | .213 | 3 | . | .990 | 3 | .806 |
| | 5.0 | .261 | 3 | . | .957 | 3 | .602 |
| | 6.0 | .252 | 3 | . | .965 | 3 | .640 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------------|-----|-----|------|
| 3.636 | 5 | 12 | .031 |

ANOVA

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Entre grupos | 100.504 | 5 | 20.101 | 142.882 | .000 |
| Dentro de grupos | 1.688 | 12 | .141 | | |
| Total | 102.193 | 17 | | | |

HSD Tukey^{a,b}

| Tiempo | N | Subconjunto | | | |
|--------|---|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 1.0 | 3 | 12.0207502533 11654 | | | |
| 2.0 | 3 | | 15.7288981496 10155 | | |
| 3.0 | 3 | | | 17.0028387310 36128 | |
| 4.0 | 3 | | | 17.3498332246 83650 | |
| 6.0 | 3 | | | | 18.8053259247 24908 |
| 5.0 | 3 | | | | 19.0923537166 33507 |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | .859 | .929 |

4. Efecto de tratamiento y tiempo sobre los cambios de color

L*

Pruebas de normalidad

| | Grupo | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-------------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| sin recubrimiento | .0 | .320 | 3 | . | .883 | 3 | .334 |
| | 4.0 | .180 | 3 | . | .999 | 3 | .947 |
| | 7.0 | .229 | 3 | . | .981 | 3 | .739 |
| | 10.0 | .212 | 3 | . | .990 | 3 | .813 |
| | 13.0 | .197 | 3 | . | .996 | 3 | .873 |
| quitosano | .0 | .293 | 3 | . | .922 | 3 | .458 |
| | 4.0 | .292 | 3 | . | .923 | 3 | .463 |
| | 7.0 | .320 | 3 | . | .883 | 3 | .334 |
| | 10.0 | .261 | 3 | . | .957 | 3 | .602 |
| | 13.0 | .375 | 3 | . | .776 | 3 | .057 |
| quitosano+AEC | .0 | .250 | 3 | . | .967 | 3 | .651 |
| | 4.0 | .334 | 3 | . | .860 | 3 | .266 |
| | 7.0 | .207 | 3 | . | .992 | 3 | .833 |
| | 10.0 | .290 | 3 | . | .926 | 3 | .473 |
| | 13.0 | .318 | 3 | . | .887 | 3 | .344 |
| quitosano+NQAEC | .0 | .343 | 3 | . | .842 | 3 | .220 |
| | 4.0 | .353 | 3 | . | .822 | 3 | .169 |
| | 7.0 | .270 | 3 | . | .948 | 3 | .561 |
| | 10.0 | .225 | 3 | . | .984 | 3 | .757 |
| | 13.0 | .354 | 3 | . | .821 | 3 | .167 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| | Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-------------------|-----------------------|-----|-----|------|
| sin recubrimiento | 1.896 | 4 | 10 | .188 |
| quitosano | 1.941 | 4 | 10 | .180 |
| quitosano+AEC | 4.714 | 4 | 10 | .021 |
| quitosano+NQAEC | 1.032 | 4 | 10 | .437 |

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------------|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| sin recubrimiento | Entre grupos | 76.403 | 4 | 19.101 | 33.226 | .000 |
| | Dentro de grupos | 5.749 | 10 | .575 | | |

| | | | | | | |
|-----------------|------------------|--------|----|--------|--------|------|
| | Total | 82.152 | 14 | | | |
| quitosano | Entre grupos | 42.784 | 4 | 10.696 | 33.827 | .000 |
| | Dentro de grupos | 3.162 | 10 | .316 | | |
| | Total | 45.946 | 14 | | | |
| quitosano+AEC | Entre grupos | 5.853 | 4 | 1.463 | 4.308 | .028 |
| | Dentro de grupos | 3.397 | 10 | .340 | | |
| | Total | 9.250 | 14 | | | |
| quitosano+NQAEC | Entre grupos | 27.229 | 4 | 6.807 | 20.265 | .000 |
| | Dentro de grupos | 3.359 | 10 | .336 | | |
| | Total | 30.588 | 14 | | | |

sin recubrimiento

quitosano

HSD Tukey^{a,b}

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto | | | Grupo | N | Subconjunto | | |
|-------|---|-------------|---------|---------|-------|---|-------------|---------|---------|
| | | 1 | 2 | 3 | | | 1 | 2 | 3 |
| .0 | 3 | 35.5200 | | | .0 | 3 | 38.8900 | | |
| 4.0 | 3 | | 37.6533 | | 4.0 | 3 | 39.3100 | | |
| 7.0 | 3 | | 39.0633 | 39.0633 | 7.0 | 3 | | 41.4533 | |
| 10.0 | 3 | | | 40.6200 | 10.0 | 3 | | 41.6233 | |
| 13.0 | 3 | | | | 13.0 | 3 | | | 43.5233 |
| Sig. | | 1.000 | .229 | .16 | Sig. | | .885 | .995 | 1.000 |

quitosano+AEC

quitosano+NQAEC

HSD Tukey^{a,b}

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|-------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| .0 | 3 | 40.4033 | |
| 10.0 | 3 | 40.5400 | |
| 4.0 | 3 | 40.9367 | 40.9367 |
| 7.0 | 3 | 41.4267 | 41.4267 |
| 13.0 | 3 | | 42.1100 |
| Sig. | | .272 | .175 |

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|-------------|----------|
| | | 1 | 2 |
| 4.0 | 3 | 40.68667 | |
| 10.0 | 3 | 40.95000 | |
| .0 | 3 | 41.20000 | |
| 7.0 | 3 | | 43.31567 |
| 13.0 | 3 | | 43.97000 |
| Sig. | | .810 | .651 |

a*

Pruebas de normalidad

| | Grupo | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-------------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| sin recubrimiento | .0 | .349 | 3 | . | .832 | 3 | .194 |
| | 4.0 | .286 | 3 | . | .930 | 3 | .490 |
| | 7.0 | .364 | 3 | . | .800 | 3 | .115 |

| | | | | | | | |
|-----------------|------|------|---|---|-------|---|------|
| | 10.0 | .341 | 3 | . | .847 | 3 | .232 |
| | 13.0 | .358 | 3 | . | .812 | 3 | .144 |
| quitosano | .0 | .351 | 3 | . | .827 | 3 | .181 |
| | 4.0 | .321 | 3 | . | .881 | 3 | .328 |
| | 7.0 | .364 | 3 | . | .800 | 3 | .114 |
| | 10.0 | .175 | 3 | . | 1.000 | 3 | .992 |
| | 13.0 | .249 | 3 | . | .968 | 3 | .656 |
| quitosano+AEC | .0 | .278 | 3 | . | .940 | 3 | .526 |
| | 4.0 | .241 | 3 | . | .974 | 3 | .688 |
| | 7.0 | .233 | 3 | . | .979 | 3 | .722 |
| | 10.0 | .309 | 3 | . | .900 | 3 | .387 |
| | 13.0 | .259 | 3 | . | .959 | 3 | .612 |
| quitosano+NQAEC | .0 | .359 | 3 | . | .810 | 3 | .140 |
| | 4.0 | .340 | 3 | . | .849 | 3 | .238 |
| | 7.0 | .383 | 3 | . | .755 | 3 | .011 |
| | 10.0 | .324 | 3 | . | .877 | 3 | .316 |
| | 13.0 | .260 | 3 | . | .958 | 3 | .606 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| | Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-------------------|-----------------------|-----|-----|------|
| sin recubrimiento | 5.649 | 4 | 10 | .012 |
| quitosano | 1.511 | 4 | 10 | .271 |
| quitosano+AEC | .345 | 4 | 10 | .842 |
| quitosano+NQAEC | 1.266 | 4 | 10 | .346 |

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------------|------------------|-------------------|----|------------------|-------|------|
| sin recubrimiento | Entre grupos | 2.425 | 4 | .606 | 6.436 | .008 |
| | Dentro de grupos | .942 | 10 | .094 | | |
| | Total | 3.366 | 14 | | | |
| quitosano | Entre grupos | 5.748 | 4 | 1.437 | 4.138 | .031 |
| | Dentro de grupos | 3.473 | 10 | .347 | | |
| | Total | 9.221 | 14 | | | |
| quitosano+AEC | Entre grupos | 3.057 | 4 | .764 | 2.858 | .081 |
| | Dentro de grupos | 2.674 | 10 | .267 | | |
| | Total | 5.731 | 14 | | | |
| quitosano+NQAEC | Entre grupos | 6.046 | 4 | 1.512 | 3.489 | .050 |
| | Dentro de grupos | 4.332 | 10 | .433 | | |
| | Total | 10.378 | 14 | | | |

sin recubrimiento

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|-------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 4.0 | 3 | 15.2300 | |
| 7.0 | 3 | 15.6633 | 15.6633 |
| .0 | 3 | 15.8167 | 15.8167 |
| 10.0 | 3 | 15.9133 | 15.9133 |
| 13.0 | 3 | | 16.4733 |
| Sig. | | .119 | .055 |

quitosano

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|-------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| 10.0 | 3 | 17.9667 | |
| 7.0 | 3 | 18.6000 | 18.6000 |
| 4.0 | 3 | 18.7700 | 18.7700 |
| .0 | 3 | 19.0133 | 19.0133 |
| 13.0 | 3 | | 19.8700 |
| Sig. | | .263 | .135 |

quitosano+AEC

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|-------------|---------|
| | | 1 | 2 |
| .0 | 3 | 17.4967 | |
| 4.0 | 3 | 18.0367 | 18.0367 |
| 10.0 | 3 | 18.1667 | 18.1667 |
| 7.0 | 3 | 18.2933 | 18.2933 |
| 13.0 | 3 | | 18.9000 |
| Sig. | | .382 | .313 |

quitosano+NQAEC

| Grupo | N | Subconjunto |
|-------|---|-------------|
| | | 1 |
| 13.0 | 3 | 17.3300 |
| 7.0 | 3 | 17.4000 |
| 10.0 | 3 | 17.4067 |
| 4.0 | 3 | 17.7900 |
| .0 | 3 | 19.0167 |
| Sig. | | .063 |

b*

Pruebas de normalidad

| | Grupo | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-------------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| sin recubrimiento | .0 | .378 | 3 | . | .767 | 3 | .039 |
| | 4.0 | .331 | 3 | . | .865 | 3 | .280 |
| | 7.0 | .380 | 3 | . | .762 | 3 | .028 |
| | 10.0 | .304 | 3 | . | .907 | 3 | .407 |
| | 13.0 | .366 | 3 | . | .795 | 3 | .104 |
| quitosano | .0 | .202 | 3 | . | .994 | 3 | .852 |

| | | | | | | | |
|-----------------|------|------|---|---|-------|---|------|
| | 4.0 | .385 | 3 | . | .750 | 3 | .000 |
| | 7.0 | .224 | 3 | . | .984 | 3 | .762 |
| | 10.0 | .257 | 3 | . | .961 | 3 | .619 |
| | 13.0 | .324 | 3 | . | .878 | 3 | .317 |
| quitosano+AEC | .0 | .213 | 3 | . | .990 | 3 | .806 |
| | 4.0 | .309 | 3 | . | .900 | 3 | .387 |
| | 7.0 | .235 | 3 | . | .978 | 3 | .714 |
| | 10.0 | .238 | 3 | . | .976 | 3 | .702 |
| | 13.0 | .177 | 3 | . | 1.000 | 3 | .972 |
| quitosano+NQAEC | .0 | .186 | 3 | . | .998 | 3 | .920 |
| | 4.0 | .322 | 3 | . | .880 | 3 | .324 |
| | 7.0 | .188 | 3 | . | .998 | 3 | .910 |
| | 10.0 | .262 | 3 | . | .956 | 3 | .598 |
| | 13.0 | .325 | 3 | . | .875 | 3 | .309 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| | Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-------------------|-----------------------|-----|-----|------|
| sin recubrimiento | 4.034 | 4 | 10 | .034 |
| quitosano | 2.107 | 4 | 10 | .155 |
| quitosano+AEC | .353 | 4 | 10 | .836 |
| quitosano+NQAEC | .706 | 4 | 10 | .606 |

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------------|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| sin recubrimiento | Entre grupos | 10.458 | 4 | 2.614 | 15.714 | .000 |
| | Dentro de grupos | 1.664 | 10 | .166 | | |
| | Total | 12.122 | 14 | | | |
| quitosano | Entre grupos | .071 | 4 | .018 | .220 | .921 |
| | Dentro de grupos | .812 | 10 | .081 | | |
| | Total | .883 | 14 | | | |
| quitosano+AEC | Entre grupos | .359 | 4 | .090 | .803 | .551 |
| | Dentro de grupos | 1.118 | 10 | .112 | | |
| | Total | 1.477 | 14 | | | |
| quitosano+NQAEC | Entre grupos | 1.489 | 4 | .372 | 1.554 | .260 |
| | Dentro de grupos | 2.395 | 10 | .239 | | |
| | Total | 3.884 | 14 | | | |

sin recubrimiento

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|-------------|--------|
| | | 1 | 2 |
| 7.0 | 3 | 1.5933 | |
| 4.0 | 3 | 1.5967 | |
| .0 | 3 | 1.7733 | |
| 10.0 | 3 | 2.6133 | |
| 13.0 | 3 | | 3.7567 |
| Sig. | | .071 | 1.000 |

quitosano+AEC

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto |
|-------|---|-------------|
| | | 1 |
| 7.0 | 3 | 5.3567 |
| 13.0 | 3 | 5.4433 |
| 10.0 | 3 | 5.6000 |
| .0 | 3 | 5.7200 |
| 4.0 | 3 | 5.7567 |
| Sig. | | .604 |

quitosano

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto |
|-------|---|-------------|
| | | 1 |
| .0 | 3 | 2.3600 |
| 13.0 | 3 | 2.4633 |
| 7.0 | 3 | 2.4733 |
| 10.0 | 3 | 2.4867 |
| 4.0 | 3 | 2.5767 |
| Sig. | | .878 |

quitosano+NQAEC

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto |
|-------|---|-------------|
| | | 1 |
| 10.0 | 3 | 7.1867 |
| 13.0 | 3 | 7.2567 |
| 4.0 | 3 | 7.4167 |
| .0 | 3 | 7.8767 |
| 7.0 | 3 | 7.9433 |
| Sig. | | .379 |

C

Pruebas de normalidad

| | Grupo | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-------------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| sin recubrimiento | .0 | .344 | 3 | . | .840 | 3 | .215 |
| | 4.0 | .210 | 3 | . | .991 | 3 | .819 |
| | 7.0 | .362 | 3 | . | .804 | 3 | .123 |
| | 10.0 | .336 | 3 | . | .856 | 3 | .256 |
| | 13.0 | .365 | 3 | . | .797 | 3 | .107 |
| quitosano | .0 | .329 | 3 | . | .869 | 3 | .293 |
| | 4.0 | .324 | 3 | . | .877 | 3 | .316 |
| | 7.0 | .369 | 3 | . | .789 | 3 | .089 |
| | 10.0 | .187 | 3 | . | .998 | 3 | .916 |
| | 13.0 | .209 | 3 | . | .992 | 3 | .825 |
| quitosano+AEC | .0 | .324 | 3 | . | .876 | 3 | .314 |
| | 4.0 | .235 | 3 | . | .978 | 3 | .715 |
| | 7.0 | .180 | 3 | . | .999 | 3 | .946 |
| | 10.0 | .259 | 3 | . | .959 | 3 | .613 |
| | 13.0 | .178 | 3 | . | .999 | 3 | .954 |

| | | | | | | | |
|-----------------|------|------|---|---|------|---|------|
| quitosano+NQAEC | .0 | .278 | 3 | . | .940 | 3 | .528 |
| | 4.0 | .381 | 3 | . | .759 | 3 | .019 |
| | 7.0 | .309 | 3 | . | .900 | 3 | .385 |
| | 10.0 | .213 | 3 | . | .990 | 3 | .808 |
| | 13.0 | .202 | 3 | . | .994 | 3 | .854 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| | Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-------------------|-----------------------|-----|-----|------|
| sin recubrimiento | 2.837 | 4 | 10 | .082 |
| quitosano | 2.065 | 4 | 10 | .161 |
| quitosano+AEC | .186 | 4 | 10 | .941 |
| quitosano+NQAEC | 1.421 | 4 | 10 | .296 |

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------------|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| sin recubrimiento | Entre grupos | 4.104 | 4 | 1.026 | 10.863 | .001 |
| | Dentro de grupos | .945 | 10 | .094 | | |
| | Total | 5.049 | 14 | | | |
| quitosano | Entre grupos | 5.637 | 4 | 1.409 | 4.086 | .032 |
| | Dentro de grupos | 3.449 | 10 | .345 | | |
| | Total | 9.086 | 14 | | | |
| quitosano+AEC | Entre grupos | 2.418 | 4 | .604 | 2.310 | .129 |
| | Dentro de grupos | 2.616 | 10 | .262 | | |
| | Total | 5.034 | 14 | | | |
| quitosano+NQAEC | Entre grupos | 6.457 | 4 | 1.614 | 6.496 | .008 |
| | Dentro de grupos | 2.485 | 10 | .249 | | |
| | Total | 8.942 | 14 | | | |

sin recubrimiento

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|------------------------|------------------------|
| | | 1 | 2 |
| 4.0 | 3 | 15.31819345 1915771 | |
| 7.0 | 3 | 15.74747648 4098854 | |
| .0 | 3 | 15.91697087 2348305 | |
| 10.0 | 3 | 16.12701392 0624090 | 16.12701392 0624090 |
| 13.0 | 3 | | 16.90362799 0154533 |
| Sig. | | .056 | .068 |

quitosano+AEC

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto |
|-------|---|------------------------|
| | | 1 |
| .0 | 3 | 18.4088257625 79802 |
| 4.0 | 3 | 18.9350397137 88925 |
| 10.0 | 3 | 19.0116383840 63527 |
| 7.0 | 3 | 19.0652809211 34363 |
| 13.0 | 3 | 19.6703809009 16470 |
| Sig. | | .076 |

quitosano

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|------------------------|------------------------|
| | | 1 | 2 |
| 10.0 | 3 | 18.13861500 2158210 | |
| 7.0 | 3 | 18.76382931 0438112 | 18.76382931 0438112 |
| 4.0 | 3 | 18.94616057 3808490 | 18.94616057 3808490 |
| .0 | 3 | 19.16171624 4566530 | 19.16171624 4566530 |
| 13.0 | 3 | | 20.02585578 0445370 |
| Sig. | | .278 | .137 |

quitosano+NQAEC

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|------------------------|------------------------|
| | | 1 | 2 |
| 13.0 | 3 | 18.7924721058 36783 | |
| 10.0 | 3 | 18.8403492142 81495 | |
| 7.0 | 3 | 19.1415185149 65050 | |
| 4.0 | 3 | 19.2779855326 56990 | 19.2779855326 56990 |
| .0 | 3 | | 20.5891006208 09333 |
| Sig. | | .756 | .056 |

H

Pruebas de normalidad

| | Grupo | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|-------------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| sin recubrimiento | .0 | .377 | 3 | . | .770 | 3 | .046 |
| | 4.0 | .333 | 3 | . | .861 | 3 | .269 |
| | 7.0 | .379 | 3 | . | .765 | 3 | .034 |

| | | | | | | | |
|-----------------|------|------|---|---|------|---|------|
| | 10.0 | .359 | 3 | . | .811 | 3 | .141 |
| | 13.0 | .366 | 3 | . | .796 | 3 | .104 |
| quitosano | .0 | .231 | 3 | . | .980 | 3 | .731 |
| | 4.0 | .312 | 3 | . | .896 | 3 | .372 |
| | 7.0 | .211 | 3 | . | .991 | 3 | .818 |
| | 10.0 | .339 | 3 | . | .850 | 3 | .240 |
| | 13.0 | .321 | 3 | . | .881 | 3 | .328 |
| quitosano+AEC | .0 | .353 | 3 | . | .823 | 3 | .170 |
| | 4.0 | .270 | 3 | . | .949 | 3 | .563 |
| | 7.0 | .345 | 3 | . | .839 | 3 | .213 |
| | 10.0 | .314 | 3 | . | .893 | 3 | .364 |
| | 13.0 | .297 | 3 | . | .916 | 3 | .440 |
| quitosano+NQAEC | .0 | .233 | 3 | . | .979 | 3 | .725 |
| | 4.0 | .212 | 3 | . | .990 | 3 | .812 |
| | 7.0 | .276 | 3 | . | .942 | 3 | .536 |
| | 10.0 | .359 | 3 | . | .811 | 3 | .140 |
| | 13.0 | .370 | 3 | . | .786 | 3 | .083 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| | Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-------------------|-----------------------|-----|-----|------|
| sin recubrimiento | 2.702 | 4 | 10 | .092 |
| quitosano | 3.461 | 4 | 10 | .051 |
| quitosano+AEC | .809 | 4 | 10 | .547 |
| quitosano+NQAEC | .792 | 4 | 10 | .557 |

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-------------------|------------------|-------------------|----|------------------|--------|------|
| sin recubrimiento | Entre grupos | 110.044 | 4 | 27.511 | 13.356 | .001 |
| | Dentro de grupos | 20.598 | 10 | 2.060 | | |
| | Total | 130.642 | 14 | | | |
| quitosano | Entre grupos | 1.789 | 4 | .447 | .621 | .658 |
| | Dentro de grupos | 7.205 | 10 | .721 | | |
| | Total | 8.994 | 14 | | | |
| quitosano+AEC | Entre grupos | 9.054 | 4 | 2.263 | 2.125 | .152 |
| | Dentro de grupos | 10.650 | 10 | 1.065 | | |

| | | | | | | |
|-----------------|------------------|--------|----|-------|------|------|
| | Total | 19.704 | 14 | | | |
| quitosano+NQAEC | Entre grupos | 9.780 | 4 | 2.445 | .647 | .642 |
| | Dentro de grupos | 37.812 | 10 | 3.781 | | |
| | Total | 47.592 | 14 | | | |

sin recubrimiento

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|-------------|-----------|
| | | 1 | 2 |
| 7.0 | 3 | 5.836467 | |
| 4.0 | 3 | 5.917100 | |
| .0 | 3 | 6.393867 | |
| 10.0 | 3 | 9.337100 | 9.337100 |
| 13.0 | 3 | | 12.828467 |
| Sig. | | .080 | .081 |

quitosano+AEC

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto |
|-------|---|-------------|
| | | 1 |
| 13.0 | 3 | 16.062700 |
| 7.0 | 3 | 16.342933 |
| 10.0 | 3 | 17.121367 |
| 4.0 | 3 | 17.718333 |
| .0 | 3 | 18.095533 |
| Sig. | | .189 |

quitosano

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto |
|-------|---|-------------|
| | | 1 |
| 13.0 | 3 | 7.073333 |
| .0 | 3 | 7.089300 |
| 7.0 | 3 | 7.573867 |
| 4.0 | 3 | 7.810167 |
| 10.0 | 3 | 7.880900 |
| Sig. | | .770 |

quitosano+NQAEC

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto |
|-------|---|-------------|
| | | 1 |
| 10.0 | 3 | 22.433367 |
| .0 | 3 | 22.509133 |
| 4.0 | 3 | 22.658967 |
| 13.0 | 3 | 22.742900 |
| 7.0 | 3 | 24.586333 |
| Sig. | | .666 |

E

Pruebas de normalidad

| | Grupo | Kolmogorov-Smirnov ^a | | | Shapiro-Wilk | | |
|---------------|-------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| | | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | gl | Sig. |
| quitosano | .0 | .286 | 3 | . | .931 | 3 | .491 |
| | 4.0 | .210 | 3 | . | .991 | 3 | .819 |
| | 7.0 | .274 | 3 | . | .944 | 3 | .545 |
| | 10.0 | .362 | 3 | . | .804 | 3 | .124 |
| | 13.0 | .242 | 3 | . | .973 | 3 | .683 |
| quitosano+AEC | .0 | .331 | 3 | . | .865 | 3 | .281 |
| | 4.0 | .342 | 3 | . | .846 | 3 | .229 |
| | 7.0 | .268 | 3 | . | .950 | 3 | .571 |

| | | | | | | | |
|-----------------|------|------|---|---|------|---|------|
| | 10.0 | .273 | 3 | . | .945 | 3 | .547 |
| | 13.0 | .262 | 3 | . | .956 | 3 | .596 |
| quitosano+NQAEC | .0 | .378 | 3 | . | .767 | 3 | .038 |
| | 4.0 | .210 | 3 | . | .991 | 3 | .822 |
| | 7.0 | .206 | 3 | . | .993 | 3 | .837 |
| | 10.0 | .212 | 3 | . | .990 | 3 | .813 |
| | 13.0 | .190 | 3 | . | .997 | 3 | .903 |

a. Corrección de significación de Lilliefors

Prueba de homogeneidad de varianzas

| | Estadístico de Levene | df1 | df2 | Sig. |
|-----------------|-----------------------|-----|-----|------|
| quitosano | 1.420 | 4 | 10 | .297 |
| quitosano+AEC | 4.568 | 4 | 10 | .023 |
| quitosano+NQAEC | .814 | 4 | 10 | .544 |

ANOVA

| | | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|-----------------|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| quitosano | Entre grupos | 9.703 | 4 | 2.426 | 6.381 | .008 |
| | Dentro de grupos | 3.802 | 10 | .380 | | |
| | Total | 13.505 | 14 | | | |
| quitosano+AEC | Entre grupos | 24.791 | 4 | 6.198 | 24.573 | .000 |
| | Dentro de grupos | 2.522 | 10 | .252 | | |
| | Total | 27.313 | 14 | | | |
| quitosano+NQAEC | Entre grupos | 1737.860 | 4 | 434.465 | 750.191 | .000 |
| | Dentro de grupos | 5.791 | 10 | .579 | | |
| | Total | 1743.651 | 14 | | | |

quitosano

HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|-----------------------|-----------------------|
| | | 1 | 2 |
| 10.0 | 3 | 2.3544410345 41531 | |
| 7.0 | 3 | 3.9209145129 66840 | 3.920914512 966840 |
| 13.0 | 3 | | 4.033075301 138926 |
| 4.0 | 3 | | 4.089805052 037148 |
| .0 | 3 | | 4.799828134 317562 |
| Sig. | | .066 | .451 |

quitosano+AEC

HSD Tukey^{a,b}

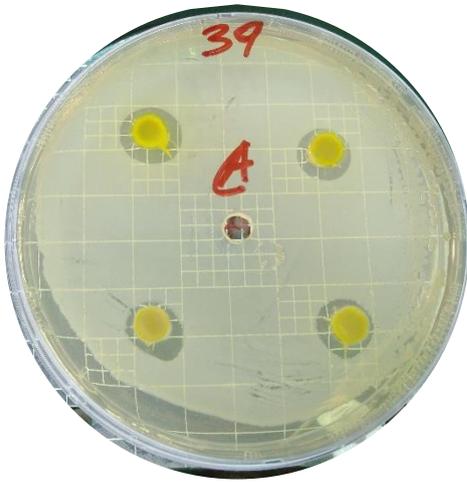
| Grupo | N | Subconjunto | |
|-------|---|-----------------------|-----------------------|
| | | 1 | 2 |
| 13.0 | 3 | 3.17178490059 5204 | |
| 10.0 | 3 | 3.78184079856 2905 | |
| 7.0 | 3 | | 5.25007566820 6685 |
| 4.0 | 3 | | 6.03620005409 9364 |
| .0 | 3 | | 6.52067481769 4651 |
| Sig. | | .591 | .067 |

quitosano+NQAEC

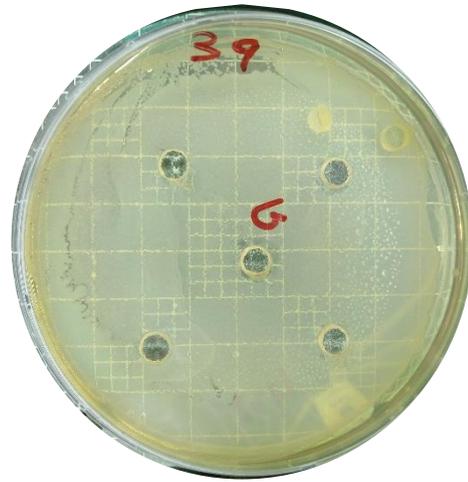
HSD Tukey^{a,b}

| Grupo | N | Subconjunto | | |
|-------|---|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 13.0 | 3 | 4.15951820279 9503 | | |
| 10.0 | 3 | 4.91159326445 9621 | | |
| 4.0 | 3 | | 7.10120380805 0216 | |
| 7.0 | 3 | | 7.92391334797 8608 | |
| .0 | 3 | | | 32.7121335575 99714 |
| Sig. | | .746 | .684 | 1.000 |

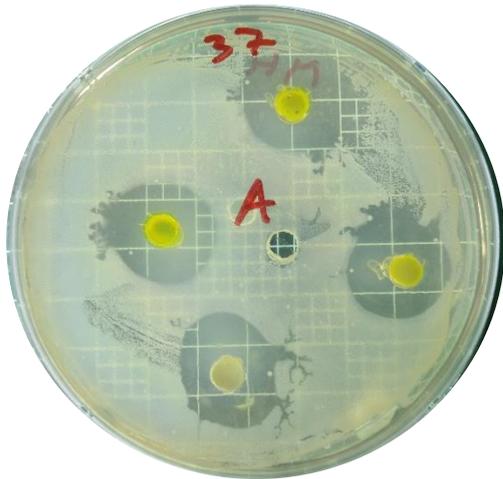
Anexo 6: Actividad antimicrobiana



Efecto antimicrobiano del aceite en *S. infantis*



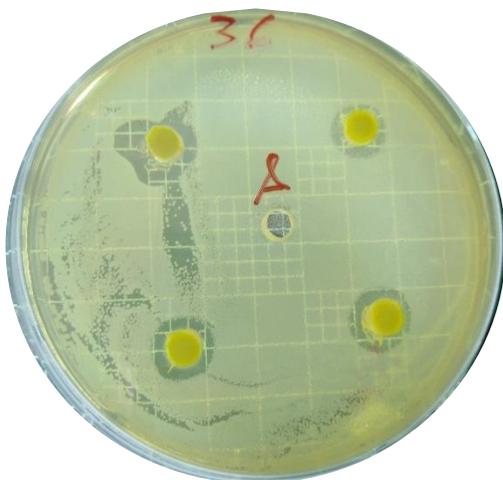
Efecto antimicrobiano del gel en *S. infantis*



Efecto antimicrobiano del aceite en *St. aureus*



Efecto antimicrobiano del gel en *St. aureus*

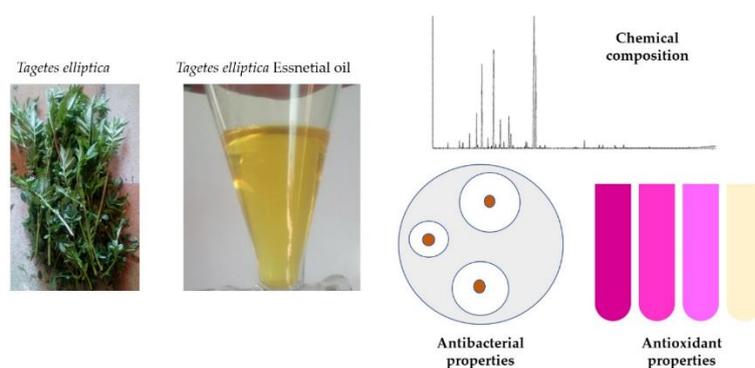


Efecto antimicrobiano del aceite en *E. coli*



Efecto antimicrobiano del gel en *E. coli*

Anexo 7: Artículos científicos publicados de *Tagetes elliptica* Sm.

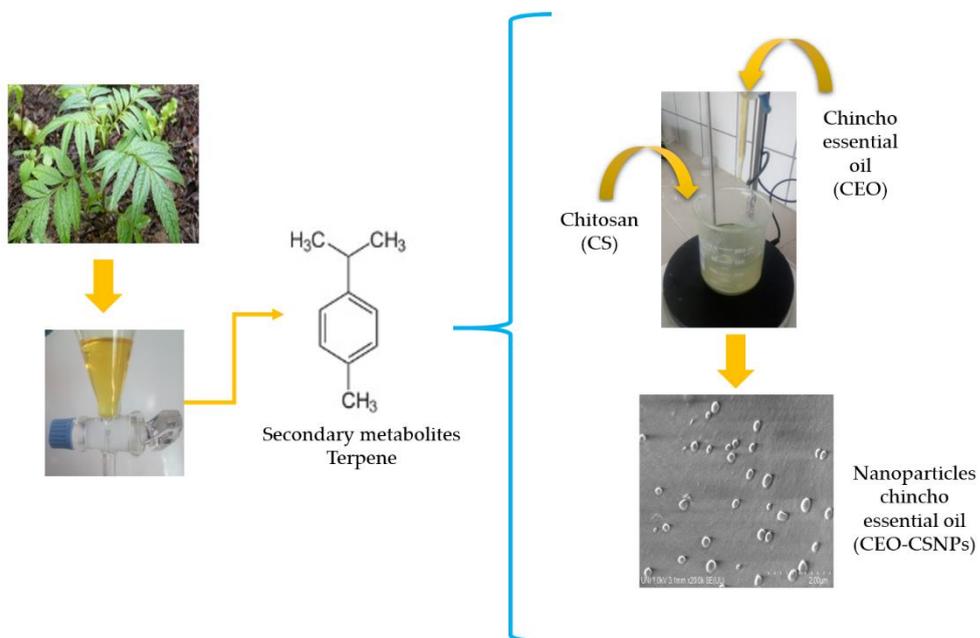


TÍTULO: Development of Chincho (*Tagetes elliptica* Sm.) Essential Oil Organogel Nanoparticles through Ionic Gelation and Process Optimization with Box–Behnken Design.

AUTORES: Cerrón-Mercado, F.; Salva-Ruíz, B.K.; Nolzco-Cama, D.; Espinoza-Silva, C.; Fernández-López, J.; Pérez-Alvarez, J.A.; Viuda-Martos, M.

REVISTA: Gels, <https://doi.org/10.3390/gels8120815>

AÑO: 2022



TÍTULO: Chemical Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities of Essential Oil Obtained from Chincho (*Tagetes elliptica* Sm) Leaves Grown in the Peruvian Andes

AUTORES: Cerrón-Mercado, F.; Perez-Alvarez, J.A.; Nolzco-Cama, D.; Salva-Ruíz, B.; Tellez-Monzon, L.; Fernández-López, J.; Viuda-Martos, M.

REVISTA: Foods, <https://doi.org/10.3390/foods12040894>

AÑO: 2023

Anexo 8: Comunicación a congresos internacionales

Autores: Cerron M Francis, Nolzco C Diana, Tellez M Lena, Pérez A Jose y Salvá R Bettit

Título: Aditivo alimentario obtenido de la optimización de nanopartículas del aceite esencial de chincho (*Tagetes elliptica*) por Box-Behnken

Nombre de congreso: 5th International Congress on Research and Innovation in Food Engineering, Science and Technology - IICTA 2020, Manizales - Colombia.

Autores: Francis Gladys Cerrón Mercado, José Ángel Pérez Álvarez, Bettit Karim Salvá Ruíz

Título: Optimización de nanopartículas por Box-Behnken mediante gelificación iónica del aceite esencial de chincho (*Tagetes elliptica*)

Nombre de congreso: I Congreso Anual de Estudiantes de Doctorado (CAED) Engineering, Orihuela - España.

Autores: Francis Gladys Cerrón Mercado, José Ángel Pérez Álvarez, Bettit Karim Salvá Ruíz

Título: Efecto del recubrimiento de quitosano en la incorporación de aceite esencial de chincho (*Tagettes elliptica*) en forma libre y nanoencapsulada en la conservación de filetes de carne de alpaca (*Vicugna pacos*)

Nombre de congreso: I Congreso Anual Internacional de Estudiantes de Doctorado (CAIED) Engineering, Orihuela - España.