

BIOPELÍCULAS A BASE DE QUITOSANO Y ACEITE ESENCIAL DE *Minthostachys Mollis* (MUÑA) CON PROPIEDADES ANTIOXIDANTE Y ANTIMICROBIANA

Kaysser A. Villar Calero^a, Gustavo A. Ruiz Pacco^a, César M. Fuertes Ruitón^{a*}

RESUMEN

Las películas comestibles con fines de empaquetamiento y reemplazo del material plástico son producidas a base de materias primas biodegradables como polisacáridos y agentes con propiedades biológicas, haciendo que el producto final se constituya en una alternativa para la protección y extensión de la vida útil de alimentos. La presente investigación tuvo como objetivo central evaluar la actividad antioxidante y antimicrobiana de biopelículas de quitosano funcionalizadas con aceite esencial de muña. Para tal fin se formularon 12 biopelículas con 3 concentraciones de quitosano (1, 2 y 3%) y 3 de aceite esencial (0.5, 2 y 5%) incluyendo blancos de solo quitosano. La actividad antioxidante evaluada en biopelículas con mayor contenido de aceite esencial de muña presenta más del 60% de captación de radical libre DPPH, mientras en la actividad antimicrobiana evaluada por placas petri cultivadas con cepas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* y *Aspergillus niger* que las biopelículas presentaron inhibición por en zona de contacto directo. Finalmente, las biopelículas con solo quitosano presentaron propiedades tensiles.

Palabras clave: Biopelícula, quitosano, funcionalizar, aceite esencial, antioxidante.

EDIBLE FILMS BASED ON CHITOSAN AND ESSENTIAL OIL OF *Minthostachys Mollis* (MUÑA) WITH ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL PROPERTIES

ABSTRACT

Edible films for packaging and plastic material replacement purposes are produced based on biodegradable raw materials such as polysaccharides and agents with biological properties, making the final product an alternative for the protection and extension of the shelf life of foods. The main objective of the present research was to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity of chitosan biofilms functionalized with muña essential oil. For this purpose, 12 edible films were formulated with 3 concentrations of chitosan (1, 2 and 3%) and 3 of essential oil (0.5, 2 and 5%) including chitosan-only blanks. The antioxidant activity

^a Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales Juan de Dios Guevara, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Jr Puno 1002 – La Victoria, Lima- Perú. Email: cfuertesr@unmsm.edu.pe

evaluated in biofilms with a higher content of muña essential oil presents more than 60% of DPPH free radical uptake, while in the antimicrobial activity evaluated by petri dishes grown with *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Aspergillus niger* strains that the biofilms showed inhibition by the area of direct contact. Finally, the edible films with only chitosan showed tensile properties.

Key words: edible film, chitosan, functionalize, essential oil, antioxidant.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad ante la problemática de la acumulación y contaminación por plásticos y microplásticos que tardan muchos años en degradarse^{1,2}, se están planteando alternativas ecológicas para paliar el impacto de estos productos al medio ambiente, dentro de estas propuestas destaca el empleo de biopolímeros que puedan sustituirlos³. Se está viendo por la generación de productos biodegradables y que además tengan un rol biológico, tales como las biopelículas o películas alimenticias funcionalizadas con diversos tipos de compuestos bioactivos, destacando los aceites esenciales⁴.

Las biopelículas constituyen una estrategia para asegurar la calidad alimentaria⁵, están formadas por polímeros del tipo polisacárido, influyen en los parámetros físicos y químicos, entre los que se incluyen la resistencia mecánica, elasticidad, permeabilidad de gases, humedad y transmisión de la luz. Estos parámetros se dividen en mecánicas de barrera, ópticas y estructurales⁶. Dentro de los polímeros más empleados en estas películas biodegradables, destaca el quitosano, polisacárido obtenido por desacetilación de la quitina de crustáceos, *per se* tiene capacidad antibacteriana, reduce la pérdida de agua al crear una barrera semipermeable que controla el intercambio de gases, entre otras propiedades fisicoquímicas⁷.

Las especies vegetales, especialmente las aromáticas, contiene una mezcla compleja de moléculas de naturaleza terapéutica, entre estas se encuentran compuestos con actividad antimicrobiana^{8,9}. En nuestro país destaca la “muña” (*Minthostachys mollis*) una planta utilizada tradicionalmente como condimento, carminativo y digestivo en infusiones y tisanas, es conocida como “la menta de los andes”¹⁰. Uno de sus componentes más estudiados es su aceite esencial, rico en terpenos que le brindan propiedades antioxidantes¹¹ y antimicrobianas^{12,13}.

Existe evidencia del empleo de diversos tipos de aceites esenciales funcionalizados a matrices de quitosano para la obtención de películas alimenticias o biopelículas con rol biológico¹⁴, sin embargo, hasta el momento no hay estudios sobre la asociación quitosano – aceite esencial de muña, lo que motivó la presente investigación.

PARTE EXPERIMENTAL

Recolección de material biológico e identificación taxonómica

Las hojas de la especie *Minthostachys mollis* (muña) fue colectada en el poblado de Pomacochas, Bongará del departamento de Amazonas e identificados en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, siguiendo el sistema Cronquist (1988).

Obtención y caracterización química del aceite esencial

El aceite esencial de muña fue obtenido por el método de arrastre de vapor¹⁵ y caracterizado químicamente por CG-MS en la Unidad de Investigación en Productos Naturales de la UPCH. El aceite esencial fue caracterizado empleando el equipo CG-MS marca Agilent Technologies 7890 con detector de masas y columna de 60 m x 250 μm s x 0.25 μm . Tiempo de corrida: 54 min; volumen de inyección: 1 μL ; Split: 100 -1; gas portador: helio (1 ml/min)

Formulación y preparación de biopelículas

El quitosano de peso molecular medio se obtuvo de Sigma Aldrich, con grado de desacetilación entre 75% - 85% con respecto a la quitina proveniente de los caparazones de cangrejo.

La preparación de las soluciones se utilizaron tres concentraciones distintas de quitosano: 1%, 2% y 3% y tres concentraciones de aceite esencial de *Minthostachys mollis* "Muña": 0,5%, 2% y 5%. Como medio para disolución se usó solución de ácido acético al 1% v/v. Adicionalmente se emplearon propilenglicol y glicerina como agentes plastificantes. El total de fórmulas experimentales preparadas se pueden observar en la tabla 1.

Tabla 1. Diseño de experimental de fórmulas para biopelículas de quitosano con aceite esencial de muña.

	QUIT %	AE %	PPG %	GLI %	AA 1% (csp)
F1	3	5	2	5	100
F2	2	0.5	2	5	100
F3	1	2	2	5	100
F4	1	0.5	2	5	100
F5	3	0.5	2	5	100
F6	3	2	2	5	100
F7	1	5	2	5	100
F8	2	5	2	5	100
F9	2	2	2	5	100
B1	1	-	2	5	100
B2	2	-	2	5	100
B3	3	-	2	5	100

QUIT: quitosano; AE: aceite esencial; PPG: propilenglicol; GLI: glicerina; AA: ácido acético

Una vez preparada la solución se vierten 20 mL en una placa Petri de plástico de 90 mm de diámetro y se deja secar en una estufa de aire circulante por 24 horas a 40 °C hasta la formación de una película plástica que posteriormente será sometida a evaluación de sus propiedades mecánicas, antioxidante y antimicrobiana.

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante de las biopelículas se determinó según el método DPPH¹⁶; éste es un reactivo captador de radicales libres y reacciona con agentes con propiedades antioxidantes. Fueron evaluadas tanto para las biopelículas funcionalizadas con aceite esencial como para las biopelículas sin aceite esencial (blanco). La muestra de biopelículas fue disuelta en metanol hasta la concentración de 10 mg/mL. Interaccionan 0.8 ml de la muestra problema con 1.2 ml de DPPH (0.05 mM) por 30 minutos en oscuridad. La medida de la absorbancia del progreso de la reacción se hizo a 517 nm en un espectrofotómetro UV-visible. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron en porcentaje de captación de radical libre (% CRL).

$$\% \text{ CRL} = [1 - (\text{abs DPPH} - \text{abs muestra}) / \text{abs DPPH}] \times 100\%$$

Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana de las biopelículas formuladas se evaluó por el método de Kirby Bauer de difusión en agar frente a las cepas ATCC cultivadas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Aspergillus niger*.

El inóculo de cada bacteria fue preparado transfiriendo la cepa pura a tubos concentrado 10 ml de caldo Mueller Hinton. La cepa de *Aspergillus niger* se trabajó en caldo Sabouraud dextrosa. El caldo inoculado se incubó a 37°C durante 24 horas.

Para la evaluación de zonas de inhibición se cortaron tiras de biopelículas de 1.5 cm de lado que fueron colocadas asépticamente en placas petri con agar Mueller Hinton y Sabouraud dextrosa donde previamente se habían sembrado los microorganismos. Finalmente, luego de incubación a 37 °C por 48 horas, se evaluó la zona de inhibición de crecimiento presente en las placas petri¹⁷.

Evaluación de la fuerza de tracción¹⁸

Para este ensayo se empleó un equipo de tracción en láminas, texturómetro digital AEL 200 y se aplicó el método ASTM D882. Las biopelículas fueron recortadas en tiras de 1.5 cm x 8 cm y presentar La fuerza de tensión fue medida en condiciones ambientales de 25°C, con una tasa de humedad relativa de 60%.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cromatograma de gases - masas del aceite esencial de *Minthostachys mollis* mostró 29 componentes terpénicos, de los cuales el mentona y pulegona se encontraron en mejor porcentaje (32 y 40% respectivamente, ver tabla 2), estos compuestos se encuentran en similares proporciones en otros ejemplares de muña y los asocian a notables actividades biológicas¹⁹.

Las biopelículas preparadas se pueden observar en la figura 1, la serie F corresponde a las que llevan incorporado quitosano y aceite esencial de muña en las diferentes concentraciones de trabajo, mientras la serie B trata de los blancos de biopelículas que únicamente tenían quitosano en su composición. Cada una de estas fue sometida a los ensayos de actividad antioxidante, antimicrobiana y evaluación de propiedades mecánicas.

Tabla 2. Composición química del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (“muña”).

Nº	Compuesto	t _R (min)	Abundancia relativa (%)
1	α -Pino	13.38	0.56
2	Sabineno	14.63	0.25
3	β -Pino	14.87	0.73
4	β -Mirce	15.01	0.42
5	3-Octanol	15.22	0.35
6	p-Cimeno	16.30	0.54
7	D-Limoneno	16.46	1.92
8	cis-Ocimeno	16.85	0.33
9	γ -Terpino	17.36	1.04
10	β -Linalool	18.55	1.66
11	Mentona	20.56	32.72
12	Isopulegona	21.11	1.09
13	trans-Dihidrocarvona	21.79	1.85
14	Pulegona	23.05	40.94
15	D-Carvona	23.15	3.67
16	Piperitona	23.47	1.42
17	Isotimol	24.51	0.53
18	Metileugenol	25.14	0.39
19	Acetato de Timol	25.81	0.32
20	Eucarvona	25.88	0.74
21	Carvacrol	26.35	0.99
22	Acetato de Geraniol	26.58	0.97
23	β -Cariofileno	28.22	2.77
24	Metiliso Eugenol	28.87	0.55
25	α -Cariofileno	29.17	0.40
26	Germacreno D	29.82	0.71
27	Biciclogermacreno	30.22	1.07
28	Elemicino	30.57	0.34
29	Isoelemicino	33.74	0.73

La actividad antioxidante de las biopelículas se evaluó por el porcentaje de captación de radical libre DPPH de acuerdo al diseño experimental visto en la tabla 1 (tanto quitosano como aceite esencial a tres concentraciones y el blanco corresponde a biopelículas sin aceite esencial), los resultados se observan en la Figura 2, la tendencia indica que la incorporación del aceite esencial de muña a las biopelículas tiene una relación directa con la actividad antioxidante, destacando la fórmula que lleva 5% de aceite esencial que presenta porcentaje de captación de radical libre DPPH mayor al 60% a diferencia de las biopelículas blanco que poseen una actividad antioxidante reducida (menor al 20 %). La actividad antioxidante de las biopelículas con solo quitosano se debe a la interacción de grupos amino en C2 e hidroxilos a lo largo de la molécula^{20,21}. Las biopelículas funcionalizadas con aceite esencial de *M. mollis* (muña) aumenta la capacidad antioxidante por los compuestos terapéuticos del aceite esencial, esta observación está de acuerdo con Granados y col²².

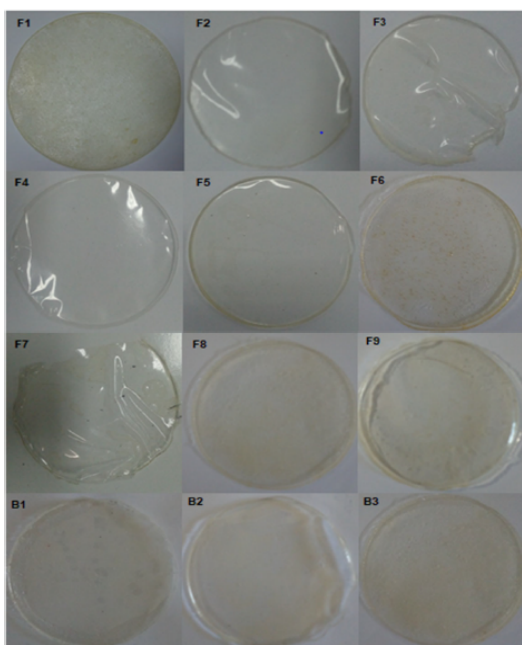


Figura 1. Biopelículas formuladas. La serie F (F1 a F9) son las biopelículas de quitosano con aceite esencial de muña, mientras que la serie B (B1 a B3) son las biopelículas de quitosano sin aceite esencial añadido.

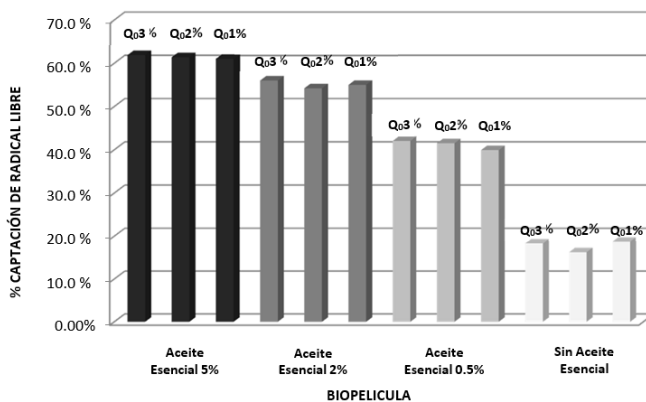


Figura 2. Actividad antioxidante de biopelículas por captación del radical libre DPPH. En cuanto a la actividad antimicrobiana, según el método Kirby Bauer que evalúa diámetro de halo de inhibición en zonas de crecimiento de microorganismos frente a las muestras de biopelículas, se observan los resultados en la figura 3.

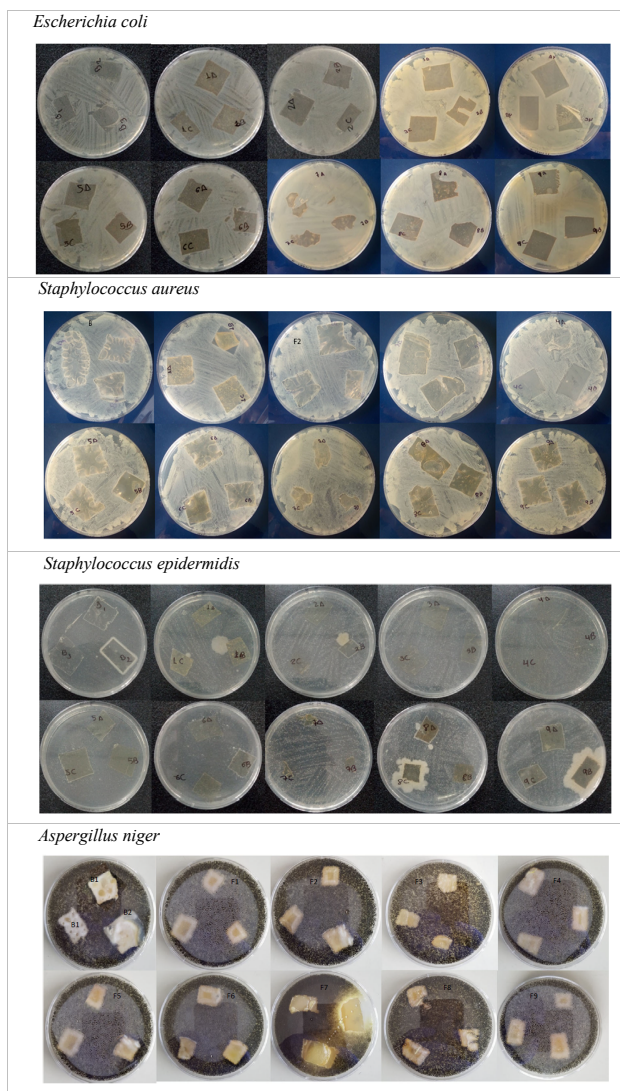


Figura 3. Actividad antimicrobiana de biopelículas frente a cepas de bacterias y fúngica. De acuerdo a los resultados en ninguno de los casos se observó halos de inhibición para medición, por lo que se adoptó el criterio de inhibición en zona de aplicación, porque la muestra de biopelícula sólida difícilmente puede difundir sus componentes^{17,23} por medio de agar al encontrarse sólida y no en forma líquida. En las placas con cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* se observa inhibición en zona de contacto tanto para biopelículas con aceite esencial como los blancos, mientras en las placas con cepa fúngica de *Aspergillus niger* se observa que debajo de la zona de aplicación solo las biopelículas con aceite esencial inhibían crecimiento, mas esto no sucedió en los blancos de biopelículas de quitosano.

Un criterio cualitativo adicional a considerar fue el índice de severidad²⁴ que evalúa el compromiso y/o afectación de las biopelículas al estar en contacto con microorganismos; en los enfrentamientos microbianos vistos se observó que las cepas bacterianas presentaron un índice de severidad tal como 1 (1 – 24 % de afectación de biopelícula).

Recomienda Nevena Hromis y col¹⁷ se emplee el método ASTM E2149 que mediante contacto dinámico de biopelículas permite evaluar la actividad antimicrobiana cuantitativamente, esto debido a la baja tasa de difusión del activo en la matriz de quitosano.

Tabla 3. Evaluación de fuerza de tracción a biopelículas.

Muestras	Fuerza de tracción (MPa)
B1 (1% Q)	17.73
B2 (2% Q)	12.93
B3 (3% Q)	12.53

*F1-F9 (No evidenciaron resultados en texturómetro)

La fuerza de tracción (MPa) se determinó dividiendo la carga máxima (N) por el área de sección transversal inicial de la biopelícula (el área de la biopelícula fue $7.5 \times 10^{-5} \text{ m}^2$). Todas las biopelículas analizadas presentaron semejante espesor (+/- 5%) al ser sometidas a este ensayo. La incorporación de aceite esencial a la biopelícula ocasiona la disminución a la tensión, en comparación cuando la biopelícula que solo tiene quitosano (ver tabla N° 3), donde si se observaron resultados del texturómetro digital AEL 200 (figura 4) con valores de 17.73, 12.93 y 12.53 MPa para las concentraciones de quitosano de 1, 2 y 3 % respectivamente. La fuerza de tensión obtenida para los blancos es menor a lo reportado en la literatura (30–100 MPa)²⁵, probablemente por la influencia del propilenglicol empleado en la formulación con agente emulsificante para facilitar la incorporación del aceite esencial de muña. En estudios previos se ha encontrado que la interrupción de las agregaciones de la cadena de quitosano facilita el desplazamiento de la cadena durante el estiramiento, lo que le da a la biopelícula una mayor capacidad de deformarse sin romperse²⁶.



Figura 4. Texturómetro digital AEL 200 para evaluación de fuerza de tracción.

CONCLUSIONES

Los principales componentes del aceite esencial de muña fueron la mentona y pulegona cuyo porcentaje de abundancia determinado por CG-MS fue de 32.72 y 40.94 respectivamente, los cuáles en parte son responsables de la actividad antioxidante. Las biopelículas formuladas con aceite esencial mostraron notable captación de radicales libres, mientras que su rol antimicrobiano fue principalmente en zona de contacto. Finalmente, solo las biopelículas blanco con quitosano presentaron propiedades tensiles.

AGRADECIMIENTOS

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM porque a través del financiamiento al proyecto de código A18040761 ratificado con RR03202-R-18 se pudo llevar a cabo la presente investigación. Además, a los docentes y alumnos del GI NATURE (ex ASEDIREN) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por la colaboración constante.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thompson RC. Microplastics in the Marine Environment: Sources, Consequences and Solutions. En: Bergmann M, Gutow L, Klages M, editores. Marine Anthropogenic Litter [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2015 [citado 3 de enero de 2022]. p. 185-200. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_7

2. Okunola AA, Kehinde IO, Oluwaseun A, Olufiropo EA. Public and Environmental Health Effects of Plastic Wastes Disposal: A Review. *J Toxicol Risk Assess.* 2019; 5:021. doi: 10.23937/2572-4061.1510021.
3. Stoica M, Marian Antohi V, Laura Zlati M, Stoica D. The financial impact of replacing plastic packaging by biodegradable biopolymers - A smart solution for the food industry. *J Clean Prod.* 2020; 277:124013. doi:10.1016/J.JCLEPRO.2020.124013.
4. Benbettaïeb N, Debeaufort F, Karbowiak T. Bioactive edible films for food applications: mechanisms of antimicrobial and antioxidant activities. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019;59(21):3431-3455.
5. Ali A, Maqbool M, Ramachandran S, Alderson PG. Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biol Technol.* 2010; 58(1): 42–47.
6. Peng Y, Yin L, Li Y. Combined effects of lemon essential oil and surfactants on physical and structural properties of chitosan films. *Int J Food Sci Technol.* 2013;48(1): 44–50.
7. Alvarez MV, Ponce AG, Moreira M del R. Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. *LWT - Food Sci Technol.* 2013; 50(1):78–87.
8. Randazzo W, Jim Enez-Belenguer A, Settanni L, Perdones A, Moschetti M, Palazzolo E, et al. Antilisterial effect of citrus essential oils and their performance in edible film formulations. *Food Control.* 2016;59:750-758.
9. Verlee A, Mincke S, Stevens Ch. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr Polym.* 2017; 164: 268–283.
10. Yapuchura Mamani R. Estudio de los componentes antioxidantes de las hojas de muña (*Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb.) E inca muña (*Clinopodium bolivianum* (benth.) Kuntze) [tesis]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2010.
11. Benites J, Guerrero-Castilla A, Salas F, Martínez JL, Jara-Aguilar R, Venegas-Casanova EA, et al. Chemical composition, in vitro cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of Peruvian *Minthostachys mollis* Griseb. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 2018; 17(6): 566 –574
12. Huari Guerrero GM. Efecto antibacteriano *in vitro* del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en *Streptococcus mutans*. [tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014.
13. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “Muña.” *Ciencia e Investigación.* 2006; 9(1):27–31.
14. Yuan G, Chen X, Li D. Chitosan films and coatings containing essential oils: The antioxidant and antimicrobial activity, and application in food systems. *Food Res Int.* 2016; 89:117–128.
15. Torrenegra-Alarcón M, Granados-Conde C, Durán-Lengua M, León-Méndez G, Yáñez-Rueda X, Martínez C, et al. Composición Química y Actividad Antibacteriana del Aceite Esencial de *Minthostachys mollis*. *Orinoquia.* 2016; 20(1): 69-74.
16. Moradi M, Tajik H, Razavi Rohani SM, Oromiehie AR, Malekinejad H, Aliakbarlu J, et al. Characterization of antioxidant chitosan film incorporated with *Zataria multiflora* Boiss essential oil and grape seed extract. *LWT - Food Sci Technol.* 2012;46(2):477–84.

17. Hromiš NM, Lazić VL, Markov SL, Vaštag ŽG, Popović SZ, Šuput DZ, et al. Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax. *J Food Eng.* 2015; 158: 86–93.
18. ASTM International. Standard test method for tensile properties of thin plastic sheeting. In *Standard D882 Annual book of American Standard Testing Methods*. Philadelphia: American Society for Testing and Materials; 2001. p. 162–70.
19. Olivero-Verbel J, González-Cervera T, Güette-Fernandez J, Jaramillo-Colorado B, Stashenko E. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils isolated from Colombian plants. *Rev Bras Farmacogn.* 2010; 20(4):568–574.
20. Altiok D, Altiok E, Tihminlioglu F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(7):2227–2236.
21. Ruiz-Navajas Y, Viuda-Martos M, Sendra E, Perez-Alvarez JA, Fernández-López J. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control.* 2013; 30(2):386–392.
22. Granados Conde C, Yañez Rueda X, Santafé Patiño GG. Evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial foliar de *Calycolpus moritzianus* y *Minthostachys mollis* de Norte de Santander. *Bistua* [Internet]. 2012 [cited 2021 Sep 19];10(1). Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/903/90326398005.pdf>
23. Sánchez-González L, González-Martínez C, Chiralt A, Cháfer M. Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *J Food Eng.* 2010;98(4):443–452.
24. Acosta Sánchez Á. Diseño, caracterización y evaluación de películas comestibles con actividad antifúngica elaborados con mucílago de nopal y quitosano. [Tesis de Grado]. México: Instituto Politécnico Nacional; 2013.
25. Souza VC, Monte ML, Pinto LAA. Preparation of biopolymer film from chitosan modified with lipid fraction. *Int J Food Sci Technol.* 2011; 46(9): 1856-62.
26. Bonilla J, Atarés L, Vargas M, Chiralt A. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocoll.* 2012; 26(1):9–16.