

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS



TESIS
**“PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y ENSAYOS IN
VITRO DE LA LIBERACIÓN CONTROLADA DE HUMO
LÍQUIDO CARGADO EN NANOPARTÍCULAS DE
QUITOSANO PARA SU APLICACIÓN EN LA
CONSERVACIÓN DEL FILETE DE TRUCHA *Onchorynchus
Mykiss*”**

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON MENCIÓN EN QUÍMICA

ELABORADA POR:

TARILA TUESTA CHAVEZ

ASESORA:

Dra. ANA CECILIA VALDERRAMA NEGRÓN

LIMA – PERÚ

2025

DEDICATORIA

A mi padre, Salvador Tuesta Castillo, por su confianza, ejemplo, dedicación y fortaleza. A mi mamita Orfelinda Chavez de Tuesta, tu amor genuino queda immortalizado en mi mente y en mi corazón a través de la frase célebre “Valiente soldado”. El constante apoyo y motivación nos han impulsado a seguir formándonos y explorando nuevas ideas, siempre con el propósito de aportar al bienestar de nuestra comunidad. Su compromiso con la excelencia y su espíritu de superación han dejado una huella imborrable en mi vida, inspirándome a avanzar con determinación y profundo agradecimiento. ¡Shalvita y Orfelinda! esta tesis es una manera de honrar y dar continuidad al legado que nos han venido transmitiendo al involucrarnos en la crianza de truchas, una valiosa fuente de proteínas que contribuye a la seguridad alimentaria y nutricional de nuestro país.

A mis hermanos, Emerson, María y Segundo, quienes han sido y siguen siendo un ejemplo a seguir. Su esfuerzo, perseverancia y valores han sido una fuente de inspiración en mi vida, demostrando que con trabajo y dedicación se pueden superar los desafíos y alcanzar nuestras metas. Gracias por estar en cada etapa de mi formación, su apoyo incondicional ha sido fundamental, brindándome aliento en los momentos difíciles y compartiendo conmigo la alegría de cada triunfo.

A mis suegros, Sra. Nérida Rojas y Sr. Alberto Monge por acogerme con cariño como miembro de su familia. Su generosidad, consejos y palabras de aliento han sido un pilar fundamental en mi camino. Su ejemplo de dedicación, trabajo y amor incondicional me inspira cada día, y les estaré eternamente agradecida por su confianza y por el respaldo inquebrantable que me han brindado a lo largo de esta etapa.

A mi amado esposo Percy Monge Rojas y a mis hijos Luis Alberto Salvador y Elena Victoria, por ser mi soporte incondicional y mi mayor fuente de inspiración. Su amor, paciencia y comprensión han sido el motor que me impulsó a seguir adelante, incluso en los momentos más desafiantes. Gracias por su confianza en mí, por su sacrificio silencioso y por brindarme siempre un refugio de amor y tranquilidad. Su presencia en mi vida me ha recordado, una y otra vez, la importancia de perseverar, de no rendirme ante las dificultades y de luchar con determinación. Esta etapa no habría sido posible sin su apoyo inquebrantable, les dedico este logro con gratitud y amor infinito.

AGRADECIMEINTOS

A mi asesora, Dra. Ana Valderrama Negrón, por su valiosa orientación, paciencia y compromiso durante todo el proceso de esta investigación. Su guía no solo ha fortalecido este trabajo, sino que también ha sido una fuente de inspiración para mi desarrollo académico y profesional.

A los miembros del jurado Dr. Hugo Alarcón, Dra. Yesenia Pastrana y Dr. Adolfo La Rosa-Toro por su tiempo y dedicación. Su retroalimentación ha sido fundamental para enriquecer y fortalecer esta investigación.

Al Dr. Alejandro Aranda Aguirre y al Mg. Clemente Luyo Caycho, por su paciencia y valioso apoyo en la realización de las medidas del DLS y SEM, cuya precisión y rigor han sido esenciales para la solidez de este estudio.

A los miembros del grupo de investigación en alimentos GIA-FIQT-UNI , quienes han sido un pilar trascendental en este camino. En especial, a mi maestro Gilberto García Galloza, José Monteza, Katherina Changanaqui, José Espinoza, Henry Linares, Carlos Salazar, Emanuel Arismendiz y Angie Castillo Barzola, por su constante apoyo, su disposición para compartir conocimientos científicos y tecnológicos en cada etapa del trabajo y su inquebrantable espíritu de equipo han sido clave para el desarrollo de esta investigación.

A los diferentes laboratorios de la Universidad Nacional de Ingeniería: LIBIPMET, GISMA, CEMAT y a nuestros aliados estratégicos de las distintas instituciones. Mi más sincero agradecimiento a los investigadores de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Dr. César Fuertes, Mag. Gustavo Ruiz y Dra. Ana María Osorio; de la Universidad Nacional Agraria La Molina, Dr. Marcial Silva; y de la Universidad Estatal Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Dra. Pilar Taboada. Su generosidad al compartir sus conocimientos, infraestructura y experiencia ha enriquecido significativamente este trabajo.

Finalmente, al sector productivo, cuyo respaldo ha permitido acercar esta investigación a la realidad de la acuicultura. Agradezco profundamente al Ing. Flavio Ventura, al Sr. Julio Mantari de Acuícola Shaga, al Dr. Juan Battaglia y a Piscigranja Don Shalvita, quienes nos han brindado su experiencia y guía en este fascinante mundo de la acuicultura. Su conocimiento práctico y su disposición para compartir su trayectoria han sido determinantes para la aplicación de este estudio, desde sus inicios hasta la consolidación del proyecto.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ABREVIATURAS	XII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Descripción del problema	3
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos.....	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
1.4. Estado del arte	5
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1. Ahumado	14
2.1.1. Técnicas de ahumado convencional	14
2.1.2. Beneficios.....	15
2.2. Humo líquido.....	16
2.3. Agentes encapsulantes.....	16
2.3.1. Biopolímeros	17
2.3.2. Quitosano	18
2.4. Agentes reticulantes.....	22
2.4.1. Tripolifosfato de sodio (TPP).....	23
2.5. Técnicas de preparación de nanopartículas.....	24
2.5.1. Nanopartículas de quitosano producidas por gelificación basado en la emulsificación	24
2.5.2. Nanopartículas de quitosano por gelificación iónica	25
2.5.3. Método de secado por atomización o desecación por atomización	26
2.6. Métodos de caracterización	27
2.6.1. Barrido dinámico de luz (DLS).....	27
2.6.2. Potencial Z.....	28
2.6.3. Espectrofotometría UV-Vis.....	29
2.6.4. Espectroscopía de infrarrojo.....	29
2.6.5. Microscopía electrónica de barrido	30
2.6.6. Espectroscopía de energía de rayos-X dispersados (EDS).....	31
2.7. Ensayos de cinética de liberación controlada.....	31
2.8. Actividad biológica	33
2.8.1. Actividad antioxidante	33
2.8.2. Actividad antimicrobiana	35

3. DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.....	38
3.1. Reactivos y materiales	38
3.2. Caracterización del quitosano	38
3.2.1. Grado de desacetilación por FT-IR	38
3.2.2. Determinación del peso molecular por viscosimetría	39
3.2.3. Porcentaje de humedad.....	40
3.2.4. Contenido de cenizas.....	41
3.3. Caracterización del humo líquido	41
3.3.1. Análisis del contenido de benzo (a) pireno por HPLC.....	41
3.3.2. Análisis de benzo[a]pireno por espectrofotometría UV-Vis.....	41
3.3.3. Determinación de ácidos carboxílicos totales	42
3.4. Preparación de nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido.....	42
3.4.1. Diseño experimental.....	42
3.4.2. Preparación de la nanopartícula	44
3.5. Caracterización de nanopartículas de quitosano.....	45
3.5.1. Determinación del diámetro hidrodinámico mediante DLS e índice de polidispersidad	45
3.5.2. Potencial Z.....	45
3.5.3. Análisis por espectrofotometría de infrarrojo	45
3.5.4. Análisis por espectrofotometría UV-Vis.....	45
3.5.5. Análisis por microscopía electrónica de barrido y EDS	46
3.6. Determinación de la capacidad de carga y eficiencia de carga	46
3.7. Estudio de liberación controlada de humo líquido cargado en nanopartículas de quitosano.....	47
3.8. Actividad biológica de las nanopartículas preparadas	47
3.8.1. Actividad antimicrobiana	47
3.8.2. Actividad antioxidante y determinación de fenoles totales.....	48
3.9. Aplicación de las NP CS-LS en el filete de trucha	50
3.9.1. Recolección y tratamiento de las truchas	50
3.9.2. Determinación de la estabilidad microbiológica	51
4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	52
4.1. Caracterización de materia prima e insumos	52
4.1.1. Caracterización de quitosano	52
4.1.2. Caracterización del humo líquido	55
4.2. Diseño experimental	60
4.3. Caracterización de las nanopartículas de quitosano con humo líquido	62
4.3.1. Análisis del diámetro de partícula, potencial Z e índice de polidispersidad	62
4.3.2. Análisis por espectrofotometría de infrarrojo	67
4.3.3. Análisis por microscopía electrónica de barrido	72
4.3.4. Análisis por espectroscopia de energía de rayos-X dispersados	74

4.4. Determinación de la capacidad de carga y eficiencia de carga	74
4.5. Estudio de la cinética de la liberación controlada	75
4.6. Determinación de actividades biológicas.....	80
4.6.1. Estudio de capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido.	80
4.6.2. Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido.....	83
4.7. Determinación de la estabilidad microbiológica.....	85
5. CONCLUSIONES.....	102
6. RECOMENDACIONES	104
7. REFERENCIAS.....	105
8. ANEXOS.....	120

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructuras de (a) quitina, (b) quitosano y (c) celulosa.	19
Figura 2 Estructura química del quitosano en función del pH del medio	21
Figura 3 Estructura del tripolifosfato de sodio.....	23
Figura 4 Interacción de los grupos hidroxilo del TPP con los grupos amino del quitosano y la posterior formación de la nanopartícula.	24
Figura 5 Esquema ilustrativo de la técnica de emulsificación.	25
Figura 6 Mecanismo de la gelificación iónica.	26
Figura 7 Diagrama de la instrumentación del DLS.....	28
Figura 8 Esquema de funcionamiento de un equipo de microscopía electrónica de barrido. .	30
Figura 9 Fundamento del análisis por EDS. Los electrones acelerados impactan sobre los electrones cercanos al núcleo.	31
Figura 10 (a) Reacción química del ABTS, (b) Estructura química del TROLOX.....	34
Figura 11 Reacción química con el DPPH.....	34
Figura 12 Reacción en el método de Folin Ciocalteu.	35
Figura 13 Grupos funcionales asociados al grado de desacetilación en la estructura del quitosano.	39
Figura 14 Esquema descriptivo del método de microdilución en caldo para determinar la actividad antimicrobiana.	48
Figura 15 Espectro infrarrojo del quitosano grado alimentario obtenido por reflectancia difusa.	52
Figura 16 Viscosidad reducida vs concentración de quitosano a 25 °C.	54
Figura 17 Cromatograma obtenido para la curva de calibración del benzo(a)pireno.	55
Figura 18 Curva de calibración para el análisis de benzo[a]pireno por HPLC.....	56
Figura 19 Cromatograma obtenido del humo líquido a 10 ppm en acetonitrilo.	57
Figura 20 Espectros obtenidos por UV-Vis de benzo[a]pireno a distintas concentraciones (0.5; 1; 5; 10 y 20 ppm) y humo líquido (10 ppm).	58
Figura 21 <i>Espectro UV-Vis referencial del benzo(a)pireno. (3,20 µM) en buffer tris-HCl pH= 7,40.</i>	58
Figura 22 Curva de titulación potenciométrica de una solución de humo líquido con 0.1 M de NaOH.	59
Figura 23 Primera de derivada de la curva de titulación potenciométrica de la solución de humo líquido con 0.1 M de NaOH.	60
Figura 24 Diagrama de Pareto sobre variables que afectan el tamaño de partícula (Y1).	64
Figura 25 Diagrama de Pareto sobre variables que afectan el potencial Z (Y2).....	65
Figura 26 Diagrama de pareto sobre variables que afectan el índice de polidispersidad (Y3).	66
Figura 27 <i>Espectro Infrarrojo del Humo líquido concentrado en solución acuosa.</i>	68
Figura 28 Espectro infrarrojo del quitosano grado alimentario, previamente secado. Método por ATR.....	69

Figura 29 Espectro infrarrojo del tripolifosfato de sodio. Método por ATR. Muestra sólida.	70
Figura 30 Espectros infrarrojos de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido: Formulación optima, LS, blanco, quitosano y TPP. Método por ATR.	71
Figura 31 Micrografía SEM para las muestras optimizadas F'1 hasta F'4 y el blanco.	73
Figura 32 Resultados de la composición elemental de las muestras optimizadas F'1 hasta F'4 y el blanco.	74
Figura 33 Curva de calibración de humo líquido en agua desionizada.	75
Figura 34 Perfiles de la liberación controlada de LS para las formulaciones F'1-F'4, en agua desionizada.	77
Figura 35 Perfiles de la liberación controlada para las formulaciones F'1-F'4, según modelo de Korsmeyer - Pepas.	79
Figura 36 ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS en el día "0".	87
Figura 37 a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 13.	88
Figura 38 a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 13.	90
Figura 39 a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 20.	91
Figura 40 a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 20.	93
Figura 41 a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de E. Coli en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 13.	94
Figura 42 ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de E. Coli en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS.	95
Figura 43 ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de ácido lácticas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS.	97
Figura 44 a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de ácido lácticas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 13.	98
Figura 45 a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de ácido lácticas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 20.	99
Figura 46 ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de ácido lácticas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS.	101

Figura 47 Curva analítica obtenida de la aplicación del método de Folin Ciocalteau, que se utilizó para el cálculo del contenido de fenoles en humo líquido.	121
--	------------

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Grupos funcionales encontrados en el humo líquido.	6
Tabla 2 Investigaciones realizadas sobre la capacidad antimicrobiana del humo líquido.	8
Tabla 3 Aplicaciones del quitosano en diversas áreas.	9
Tabla 4 Investigaciones realizadas por diversos autores sobre el encapsulado de compuestos bioactivos en quitosano.	12
Tabla 5 Materiales empleados como encapsulantes.	16
Tabla 6 Tipos de biopolímeros.	17
Tabla 7 Agentes reticulantes empleados en la síntesis de nanopartículas por gelificación iónica.	22
Tabla 8 Modelos matemáticos de liberación controlada.	32
Tabla 9 Factores en la superficie de respuesta múltiple utilizando el modelo de Box y Behnken para nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido.	43
Tabla 10 Formulaciones obtenidas mediante el diseño experimental Box Behnken.	43
Tabla 11 Formulaciones catalogadas como óptimas después del diseño experimental Box-Behnken.	44
Tabla 12 Viscosidad relativa (rel), específica (sp) y reducida (red) obtenidas en el ensayo. .	53
Tabla 13 Datos ANOVA relacionados con los modelos de respuesta de todas las variables.	62
Tabla 14 Resultados obtenidos para las formulaciones propuestas en el diseño experimental.	63
Tabla 15 Valores buscados en la optimización de las respuestas tamaño de nanopartícula (Y1), potencial Z (Y2) e índice de polidispersidad (Y3).	66
Tabla 16 Resultados obtenidos para las formulaciones consideradas óptimas.	67
Tabla 17 Tamaño de partícula obtenido a partir de la microscopía electrónica de barrido. ...	72
Tabla 18 Eficiencia y capacidad de carga para las formulaciones óptimas según ecuaciones 13 y 14.	75
Tabla 19 Resultados de la liberación controlada de las formulaciones F'1-F'4.	76
Tabla 20 Masa liberada de humo líquido en las muestras F'1-F'4 luego de 24 horas.	77
Tabla 21 Parámetros obtenidos según el modelo de Korsmeyer- Pepas para la liberación controlada de las formulaciones F'1-F'4.	78
Tabla 22 Actividad promedio de las formulaciones F'1-F'4 en las bacterias <i>St. Aureus</i>	80
Tabla 23 Actividad promedio de las formulaciones F'1-F'4 en las bacterias <i>Bacillus Cereus</i>	80
Tabla 24 Actividad promedio de las formulaciones F'1-F'4 en las bacterias <i>E. Coli</i>	81
Tabla 25 Actividad promedio de las formulaciones F'1-F'4 en la bacteria <i>Salmonella</i>	81
Tabla 26 Resumen de la concentración mínima inhibitoria determinada para cada formulación óptima.	81
Tabla 27 Resultados del análisis de capacidad antioxidante y contenido de fenoles en las muestras F'1-F'4.	83

Tabla 28 Anova general del recuento de aerobias mesófilas durante 20 días al 95 % de nivel de confianza.	86
Tabla 29 Anova del recuento de aerobias mesófilas en el día cero de tratamiento.....	87
Tabla 30 Anova del recuento de aerobias mesófilas en el día 1 de tratamiento.....	88
Tabla 31 Anova del recuento de aerobias mesófilas en el día 13.....	89
Tabla 32 Anova del recuento de bacterias <i>aerobias mesófilas</i> en el día 20.....	90
Tabla 33 Anova general del recuento de <i>E. Coli</i> durante 20 días de tratamiento ($\alpha = 0.05$) ..	92
Tabla 34 Anova del recuento de las bacterias <i>E. Coli</i> en el día 7.	92
Tabla 35 Anova del recuento del microorganismo <i>E. Coli</i> en el día 13.....	93
Tabla 36 Anova del recuento de bacterias <i>E. Coli</i> en el día 20.....	95
Tabla 37 Anova general del recuento ácido lácticas durante 20 días de tratamiento.....	96
Tabla 38 Anova del recuento de bacterias ácido lácticas en el día 1.	96
Tabla 39 Anova del recuento de bacterias ácido lácticas en el día 13 de tratamiento.	97
Tabla 40 Anova del recuento de bacterias ácido lácticas en el día 20 de tratamiento.	99
Tabla 41 Anova del recuento de bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> en el día 1 de tratamiento.	100
Tabla 42 Resultado del recuento de bacterias <i>sp. Salmonella</i>	101
Tabla 43 Constantes de ecuación MHS para quitosanos con variación de DA (%) y solventes de diferentes pH y fuerza iónica (μ).	120

ABREVIATURAS

%CRL	% de captación de radicales libre	EDS	Espectroscopía de energía de Rayos-X Dispersados
[η] red	Viscosidad reducida	FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
[η] rel	Viscosidad relativa	HAP's	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
[η] sp	Viscosidad específica	HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
ABTS	Ácido 2, 2'-azino-bis-(3- etilbenzotiazolina)-6-sulfónico	IR	Espectroscopia infrarroja
ATR	Reflectancia total atenuada	LS	Humo líquido
CAA	Concentración de ácido acético	MHS	Ecuación de Mark-Houwink-Sakurada
CC	Capacidad de carga	NP CS-LS	Nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido
CHL	Concentración de humo líquido	NP	Nanopartículas
CMI	Concentración mínima inhibitoria	PDI	Índice de polidispersidad
CQ	Concentración de quitosano	ppm	Partes por millón
CTPP	Concentración de TPP	RSM	Metodología de superficie de respuesta
DH	Diámetro hidrodinámico de la partícula	SEM	Microscopía electrónica de barrido
DLS	Dispersión de luz dinámica	TPP	Tripolifosfato de sodio
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcroman-2-carboxílico
EC	Eficiencia de carga	ACN	Acetonitrilo

RESUMEN

El objetivo del presente proyecto es preparar y caracterizar nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido, así como la liberación controlada *in vitro* de este para su aplicación en la conservación del filete de trucha (*Onchorynchus Mykiss*).

Con asistencia del diseño experimental Box-Bhenken (Minitab 18) fueron preparadas 26 formulaciones diferentes y aleatorias, de las cuales se lograron obtener 4 formulaciones optimizadas. Se determinó mediante DLS que el tamaño de las nanopartículas optimizadas estaba en el rango entre 180 a 200 nm, además presentaban una alta estabilidad con un potencial Z mayor a +40 mV y polidispersidad en el rango entre 0.36 – 0.45. También se realizó la caracterización por espectroscopia de infrarrojo, UV-Vis y microscopía electrónica de barrido infiriendo que el cargado y formación de las nanopartículas fue exitosa. Además, se determinó la capacidad de carga y eficiencia de cargado de estas 4 formulaciones optimizadas. Las dos formulaciones con altos porcentajes de capacidad de carga y eficiencia de cargado fueron: F'2 (21.6 % y 40.3 %) y F'3 (26.1 % y 49.3 %).

El estudio de liberación controlada señaló que el mecanismo de liberación de las 4 formulaciones es similar al modelo de liberación de Korsmeyer-Peppas (mecanismo no Fickiano), el cual depende de la difusión y relajación del polímero. La formulación F'2 presentó la menor velocidad de liberación ($K = 0.0471 \text{ min}^{-1}$), permitiendo así a la dosificación del humo líquido cargado y a la conservación de los filetes de trucha. Por otro lado, las pruebas antimicrobianas y antioxidantes demostraron que las 4 formulaciones presentan buena actividad biológica.

Por los resultados mostrados tanto en tamaño de partícula, potencial Z, eficiencia y capacidad de cargado, actividad antimicrobiana y antioxidante, la F'2 es la más prometedora formulación para realizar el cargado de humo líquido y emplearlo en la conservación de filetes de trucha.

Finalmente, los resultados de la estabilidad microbiológica mostraron que los filetes de trucha tratados con las matrices QGA-LS, QGA y LS tienen un efecto positivo de inhibición, en el tiempo, frente a las bacterias *Aéreo mesófilas*, *E. coli*, *ácido lácticas o lactobacillus*, *Staphylococcus aureus* y *salmonella*; siendo las matrices de QGA-LS y QGA las que presentaron mejor efecto de conservación en el filete de trucha.

ABSTRACT

The objective of this project is to prepare and characterize chitosan nanoparticles loaded with liquid smoke, as well as the controlled release in vitro of this for its application in the conservation of trout fillet (*Onchorynchus Mykiss*).

With the assistance of the Box-Bhenken experimental design (Minitab 18), 26 different and random formulations were prepared, which 4 optimized formulations were obtained. The size of the optimized nanoparticles was determined by DLS, that was in the range between 180 to 200 nm, they also had high stability since their Z potential was greater than +40 mV and the polydispersity was in the range between 0.36 - 0.45. Characterization was also carried out by infrared spectrophotometry, UV-Vis and scanning electron microscopy, indicating that the loading and formation of the nanoparticles was successful. In addition, the loading capacity and loading efficiency of these 4 optimized formulations were determined. The two formulations with high percentages of loading capacity and loading efficiency were: F'2 (21.6% and 40.3%) and F'3 (26.1% and 49.3%).

The controlled release study indicated that the release mechanism of the 4 formulations is like the Korsmeyer-Peppas release model (non-Fickian mechanism), which depends on polymer diffusion and relaxation. Formulation F'2 presented the lowest release rate ($K = 0.0471 \text{ min}^{-1}$), allowing thus to dose the loaded liquid smoke and preserve the trout fillet. On the other hand, the antimicrobial and antioxidant tests showed that the 4 formulations have good biological activity.

Due to the results shown in particle size, Z potential, efficiency and loading capacity, antimicrobial and antioxidant activity, F'2 is the most promising formulation to carry out the loading of liquid smoke and use it in the conservation of trout fillets.

Finally, the results of microbiological stability showed that trout fillets treated with the QGA-LS, QGA and LS matrices have a positive inhibition effect, over time, against mesophilic aerial, *E. coli*, lactic acid or lactobacillus, *Staphylococcus aureus* and salmonella bacteria; being QGA-LS and QGA those have the best preservation effect on the trout fillet.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del problema

El tiempo de vida útil del pescado (en este caso la trucha) es generalmente corta; por lo cual es necesario el uso de nuevos métodos que mejoren sustancialmente la conservación de la carne. Existen diferentes técnicas para lograr dicho objetivo, tales como: seco salado, empaque al vacío o el ahumado (técnica más usada). Sin embargo, dentro de esta última técnica de aplicación, se suelen generar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), los cuales son perjudiciales para la salud del consumidor.

1.2. Justificación

En los últimos años, el consumo de productos ultra-procesados (cereales, enlatados, carnes reconstituidas, etc.) ha incrementado sustancialmente, en parte debido principalmente a la facilidad de consumo, cierto aporte nutricional y bajo costo. Sin embargo, según la organización mundial de la salud (OMS), muchos contienen carbohidratos refinados, grasas saturadas, sales, acrilamidas e incluso bisfenol o carragenina, siendo la mayoría asociados a problemas de salud como la obesidad, enfermedades cardiovasculares, efectos cardio metabólicos, cáncer, diabetes, entre muchos otros (Pagliai et al., 2021; Srouer et al., 2019). Ante ello, surge la necesidad de promover el consumo de alimentos más saludables y naturales. Dentro de estos productos se encuentran las carnes de trucha, la cual, aparte de contener muchos nutrientes para la salud humana, representa el 43 % de extracción acuífera con 101911 TM según estadísticas de la Oficina de Estudios Económicos del Ministerio de la Producción del Perú, para el año 2022 (Periodo de enero-septiembre). Por otra parte, durante años, muchos productos cárnicos han sido comercializados en los mercados usando preservantes artificiales como la formalina o nitritos, compuestos químicos asociados con enfermedades degenerativas como el cáncer. En consecuencia, existe un gran interés en los preservante naturales como alternativa para sustituir aquellos preservantes sintéticos (Desvita et al., 2020). El humo líquido es un buen conservante de alimentos que contiene componentes Gras; es decir, compuestos químicos generalmente reconocidos como seguros, así mismo también es conocido por proporcionarle el olor y sabor característico a ahumado a las carnes y comidas en general (Food and Drug Administration (FDA), 2017). Por otro lado, el quitosano es un biopolímero que durante los últimos años ha sido muy utilizado en diferentes áreas de investigación tales como áreas industriales, farmacéuticas, alimentaria, medicina, entre otras. Esto debido a sus remarcadas propiedades biodegradables, biocompatible, no toxico y antimicrobial(Garavand et

al., 2022). Así mismo, actualmente la aplicación de mayor interés es en forma de nanopartícula, debido a sus propiedades de protección, conservación, efectividad antibacterial, antioxidante, etc. Por otra parte, permiten también encapsular diversos componentes bioactivos como el humo líquido, debido a la alta área superficial que provee, así mismo facilitan una dosificación más prolongada y controlada del compuesto bioactivo cargado (Chandrasekaran et al., 2020a). Por lo tanto, el uso de nanopartículas de quitosano aplicadas a la conservación de alimentos permitirá un mayor tiempo de almacenamiento, así mismo conservar el sabor y las propiedades fisicoquímicas del producto, ya que se ha reportado que la calidad de los alimentos suele verse afectada por procesos químicos y microbiológicos (Desvita et al., 2020; Garavand et al., 2022). Finalmente, sobre la base de lo antes mencionado, en el presente trabajo se pretende desarrollar un potencial aditivo alimentario a partir de quitosano y humo líquido para su aplicación en la conservación del filete de trucha y así promover su consumo de forma más saludable.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Preparar, caracterizar y desarrollar ensayos *in vitro* de la liberación controlada de humo líquido cargado en nanopartículas de quitosano para su aplicación en la conservación del filete de trucha.

1.3.2. Objetivos específicos

- ✓ Caracterizar el quitosano de partida y el humo líquido.
- ✓ Preparar nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido mediante la técnica de gelificación iónica.
- ✓ Caracterizar las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido mediante las técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS), potencial zeta, espectroscopía infrarroja (IR), y microscopía electrónica de barrido (SEM).
- ✓ Desarrollar ensayos *in vitro* de la liberación controlada del humo líquido.
- ✓ Evaluar el contenido de polifenoles totales mediante el método de Folin Ciocalteu y la capacidad antioxidante de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido mediante las pruebas de ABTS y DPPH.
- ✓ Evaluar la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido contra las bacterias *St. Aureus*, *Bacillus Cereus*, *E. coli* y *Salmonella*.
- ✓ Evaluar el efecto conservante de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido sobre filetes de trucha, a través de la estabilidad microbiológica en el tiempo.

1.4. Estado del arte

Los productos alimenticios hoy en día pueden sufrir procesos de descomposición u oxidación lipídica debido a diferentes factores físicos, químicos o biológicos que pueden estar relacionados a la contaminación por manipulación o esporas (Deliephan et al., 2023a). Frente a este problema la nanotecnología se ha presentado como una alternativa que permite garantizar la calidad y seguridad de los alimentos hasta que pueda ser consumido y reducir además las enfermedades transmitidas por estos (Lin et al., 2022). La nanotecnología es una nueva herramienta que permite diseñar, preparar y aplicar aditivos alimentarios, como conservantes, antioxidantes, antimicrobianos, antifúngicos, entre otros; en diferentes matrices alimentarias, las mismas que suelen ser más estables y facilitar la conservación de sus características originales (Swastawati & Romadhon, 2020)

Los conservantes naturales son una alternativa actual en productos alimenticios, entre ellos se encuentra el humo líquido, un derivado de ingredientes naturales como la hemicelulosa, el cual no solo actúa como agente colorante y saborizante en productos alimenticios proteicos, sino que también posee propiedades antibacterianas y antioxidantes (Deliephan et al., 2023b). No obstante, estas propiedades se deben en gran medida a la presencia de diversos compuestos orgánicos tales como alcoholes, cetonas, aldehídos y entre otros (Widayat et al., 2018). La **Tabla 1** muestra los grupos y estructuras químicas de los componentes que se pueden encontrar en el humo líquido.

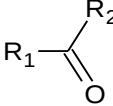
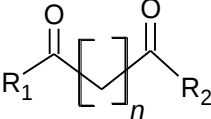
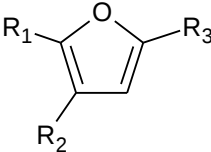
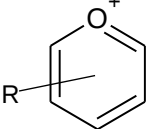
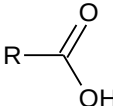
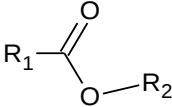
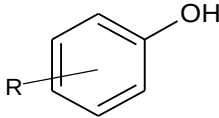
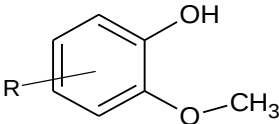
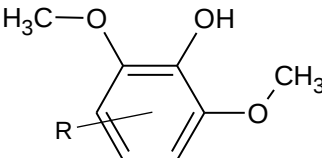
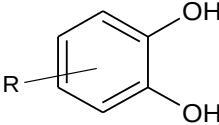
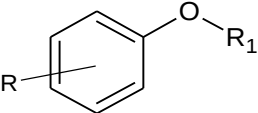
Por otro lado, muchos investigadores han venido utilizando el humo líquido por sus características preservantes, su baja toxicidad, mejor aroma y textura, también, debido a la menor concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) como el benzo (a) pireno, presentes respecto al proceso de ahumado convencional y que llegan a ser cancerígenos, además de sus propiedades antifúngicas, bacterianas y antioxidantes (Desvita et al., 2023; Mansur et al., 2023).

En la **Tabla 2** se listan algunas investigaciones realizadas respecto al uso del humo líquido, han mostrado que dentro de los principales componentes descritos como bioactivos, se encuentran los polifenoles, cetonas, alcoholes y ácidos carboxílicos con fuertes propiedades antioxidantes y antimicrobianas (Muriady, 2022). Los sustratos sobre los cuales se aplica el humo líquido han sido principalmente en derivados cárnicos (pescado y bovino) o quesos. También se observado que la inhibición de las bacterias *E. coli* es un indicador de calidad microbiológica; por ello las evaluaciones realizadas en estas investigaciones fueron llevadas a

cabo principalmente a condiciones de temperatura ambiente y en almacenamiento de 8 °C. No obstante, bajo estas condiciones de temperatura se ha encontrado que existen bacterias que pueden sobrevivir, denominadas psicrófilas.

Tabla 1

Grupos funcionales encontrados en el humo líquido.

Grupo Funcional	Estructura General	Grupo Funcional	Estructura General
Aldehídos		Cetonas	
Dicetonas		Furanos	
Píranos		Ácidos Carboxílicos	
Ésteres		Fenoles	
Eugenoles		Siringoles	
Pirocatecoles		Alquil aril éteres (R2= C _n H _{2n+1})	

Modificado de (Muriady, 2022; Sokamte tegang et al., 2020a)

Según Hera Desvita y colaboradores, sostienen que el humo líquido (LS) derivado de la cáscara de la vaina de cacao permite mantener fresco las albóndigas hasta por 48 horas a medida que la concentración de humo líquido en cada tratamiento incrementa. Además, el estudio antibacterial mostro que el conteo de colonias para microorganismos está por debajo del límite ($<1.80 \times 10^5$ CFU/g), indicando un consumo seguro de las albóndigas. No obstante, estos resultados dependen de la temperatura de pirolisis a las que ha sido obtenido el humo líquido. Por otra parte, las pruebas del número más probable mostro que no todas las muestras de albóndigas tratadas con LS presentan microorganismos *E.Coli* durante las primeras 24 h, tiempo

posterior a la cual todas las muestras mostraron un crecimiento bacterial hasta las 60 h donde la contaminación supero el límite permisible y no seguro para consumo (Desvita et al., 2023).

Deliephan y colaboradores estudiaron el efecto del humo líquido en el tiempo de vida útil sobre alientos de mascotas, encontrando que en diferentes dosis (entre 0.5 a 4 % de LS) el tiempo de vida se extiende en promedio entre 11.6 a 24.1 días en comparación a otras muestras sin tratar. Además, los tratamientos lograron inhibir el crecimiento de la *Aspergillus Flavus* inoculados en los alimentos e incubados a 25 °C, así como también de la *Fusarium graminearum*, sugiriendo una alta susceptibilidad antibacterial del LS (Deliephan et al., 2023a).

Botutihe y colaboradores evaluaron el efecto de la utilización de humo líquido sobre la calidad y las características organolépticas del atún, encontrando que el aumento en la concentración del LS sobre el pescado presenta un bajo contenido de agua, además probablemente sea debido al contenido fenólico. Por otra parte, el alto contenido de agua fue asociado a la degradación proteica del pescado atún y una mayor actividad bacterial (Botutihe et al., 2023). Mientras tanto, Swastawati y Romadhon, refieren que la encapsulación del LS en goma arábica y maltodextrina representa una excelente alternativa para la preservación de filetes de pescado, con resultados que remarcan la inhibición del crecimiento bacteriano y los procesos de degradación del producto ya que los tratamientos mostraron que los filetes son seguros para consumo aun después de 48 h de almacenamiento y con indicadores de recuentos bacterianos inferiores a lo máximo permitido (5.7 log(ufc/g)) (Swastawati & Romadhon, 2020).

Por otra parte, Pasaribu y colaboradores, sostienen que el humo liquido obtenido desde las cascaras de grano de cacao poseen baja actividad antibacteriana y fúngica, debido principalmente al bajo contenido de polifenoles (0.17 g / 100 mL), saponinas (0.46 g / 100 mL) y taninos (0.047 g / 100 mL), compuestos que generalmente inhiben fuertemente la proliferación de las bacterias como la *E. Coli* y *C. utilis*. No obstante, Fronthea y coinvestigadores afirman que la calidad y productividad del pescado chano y pez gato son mejoradas cuando son procesados para empaque con 5 % de humo líquido, ya que encontraron bajo conteo de colonias bacterianas inferiores al límite establecido (10^5 colonias/ g de muestra), además, los tratamientos mostraron baja actividad del agua (Swastawati et al., 2022). En resumen, según lo descrito en las investigaciones, se puede destacar del humo liquido sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes, en parte debido a su contenido de polifenoles, ácido carboxílicos y aldehídos. No obstante, estas propiedades aun requieren ser estudiadas para alcanzar una mejor comprensión del mecanismo de acción, que en el tiempo permita aplicarlo más óptimamente como preservante para alimentos como los filetes de trucha.

Tabla 2

Investigaciones realizadas sobre la capacidad antimicrobiana del humo líquido.

Procedencia del humo líquido	Componente bioactivo	Inhibe	Aplicado en	Autor
Cáscara de la vaina de cacao	Fenoles y ácido acético	<i>E. coli.</i>	Albóndigas	(Desvita et al., 2023)
Preparación en laboratorio	Polifenoles, compuestos de carbonilo y orgánicos	<i>Aspergillus Flavus</i> <i>Fusarium graminearum</i>	Alimentos de animales	(Deliephan et al., 2023a)
Cascaras de coco	Compuestos carbonilo y fenoles	Degradación por actividad bacteriana	Pescado de atún	(Botutihe et al., 2023)
Cáscara de coco	Polifenoles y compuestos carbonilo	Degradación por actividad bacteriana	filetes de pargo blanco	(Swastawati & Romadhon, 2020)
Cáscara de grano de cacao	Fenoles, saponinas y taninos	<i>E. coli</i> <i>Candida utilis</i>	Ensayo <i>invitro</i>	(Pasaribu et al., 2022)
Humo Comercial	Acido orgánicos y fenoles	<i>B. Cereus</i>	Pez chano y pez gato	(Swastawati et al., 2022)

El quitosano (CS), un biopolímero derivado de la quitina, ha mostrado poseer considerable actividad antibacteriana y también actividad antioxidante, propiedades que lo convierten en un potencial material, útil para prevenir el daño oxidativo de sistemas biológicos como el causado por patógenos en filetes de pescado (Pradhan et al., 2024). Además, por su naturaleza catiónica, tiene alta facilidad para entrecruzarse con polianiones como los fosfatos. Así mismo, debido a su alta biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja inmunogenicidad, naturaleza no tóxica, propiedades antibacterianas y mucoadhesividad, ha atraído mucha atención en diferentes áreas como la medicina, industria farmacéutica e industria alimentaria (Barik et al., 2024; Saeedi et al., 2022; Thambiliyagodage et al., 2023).

La **Tabla 3** muestra algunas aplicaciones del quitosano en diversas áreas como los alimentos y bebidas. Dentro estas aplicaciones se mencionan la capacidad antibacteriana y preservante para extender la vida útil de productos alimentarios (Thambiliyagodage et al., 2023). Así mismo, debido a sus propiedades antifúngicas, antibacterianas y biocompatibles aún sigue siendo de mucho interés para diversos investigadores, sobre todo para la conservación de alimentos como las carnes, frutas y otros productos perecibles (Chaudhari et al., 2023; Fernando et al., 2024; Yang et al., 2023).

Tabla 3*Aplicaciones del quitosano en diversas áreas.*

Área	Aplicaciones
Agricultura	Libración controlada de fertilizantes. Incrementar la disponibilidad de agua en las plantas. Controlar el estrés de calor y sequía en las plantas Prevenir el estrés abiótico en la flora
Agua y tratamiento de residuos	Floculante para clarificar el agua y remover colorantes Eliminación de iones metálicos. Polímero ecológico (eliminar polímeros sintéticos y fármacos) Reducir los olores fétidos Purificación de aguas residuales
Alimentos y bebidas	Aditivo alimentario Extender la vida útil de los alimentos Preservante alimentario como agente antimicrobiano y antifúngico Ingrediente funcional alimentario Protectora en empaques y recubrimientos alimentarios Agente emulsificante
Cosméticos y artículos de Tocador	Mantener la humedad de la piel. Acondicionador y gel para el cabello Mejorar la flexibilidad del cabello en champús y ceras Reduce la electricidad estática en el cabello Tonificar la piel en cremas Cuidado bucal (pasta de dientes, chicle)
Biomédico	Ingeniería de tejidos y matrices para liberación de fármacos Hemostáticos y anticoagulantes en gasas para heridas Curación bacteriostática como hidrogeles o nanopartículas Eficiente contra las bacterias, virus y hongos

Adaptado de (Y. Chen et al., 2023; Thambiliyagodage et al., 2023).

La **Tabla 4** muestra diversos trabajos de investigación sobre el uso del quitosano como matriz para el encapsulado de componentes bioactivos. Por ejemplo, Mingcheng y colaboradores, cargaron aceite esencial de comino en nanocápsulas de quitosano, reportando una alta eficiencia de encapsulación (52 %), así mismo una eficiente inhibición de crecimiento de la *E. coli* y *L. monocytogenes*, en parte debido a las propiedades fisicoquímicas como el potencial Z mayor +25 mV y polidispersidad (PDI) entre 0.14 – 0.36. Resultados que sus los autores convierten a las nanocápsulas en un potencial agente preservante para alimentos (M. Zhang et al., 2024). Por otra parte, Lin y colaboradores, sostienen que las nanopartículas

ternarias basadas en polisacáridos de nisina y *Lycium barbarum* cargadas con agentes antibacteriales como el aceite esencial de romero (AER), han mostrado ser una estrategia efectiva para controlar las enfermedades transmitidas por los alimentos. En parte, debido a su efectiva actividad contra la *S. aureus* y *E. coli* O157:H7, resultados asociados a la alta eficiencia de cargado del AER (86.6 %), estabilidad térmica y física de las nanopartículas con un tamaño entre 167 – 387 nm y PDI entre 0.22 a 0.1 (Lin et al., 2022).

Las nanopartículas (NPs) de quitosano por su alta área superficial y propiedades fisicoquímicas y biológicas únicas, según Elham y colaboradores son una prometedora matriz portadora de compuestos bioactivos debido a su alta estabilidad térmica y física con tamaños promedios de 359 nm, PDI de 0.32 y P_z de + 30.2 mV (Alehosseini et al., 2022a). Características que según Mohamed y coinvestigadores, hacen de las nanopartículas cargadas con monoterpenos un efectivo preservante para la carne picada contra cambios oxidativos y el crecimiento de microorganismos como la *Escherichia coli* (ATCC 8739) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 1402), además, también presentan actividad antioxidante (Badawy et al., 2020).

Maria Mondejar y colaboradores, sostienen que las nanopartículas de quitosano cargadas con aceite esencial de ajo inhiben el crecimiento de microorganismos como la *Aspergillus versicolor*, *A. niger* y *Fusarium oxysporum*, permitiendo la germinación saludable de semillas vegetales y la preservación de esta. No obstante, los resultados encontrados son correspondientes con los compuestos bioactivos presentes en el aceite esencial de ajo y la eficiencia (32.8 %) y capacidad (19.8 %) de carga (Mondéjar-López et al., 2022). Por otro lado, nanopartículas basadas en quitosano y pectina de zeína cargadas con aceite esencial de orégano han probado mejorar la calidad de la salchicha roja de Harbin durante el almacenamiento. Los resultados mostraron inhibición al crecimiento de bacterias *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, así mismo una reducción considerable a la oxidación lipídica; lo cual ha extendido el periodo de conservación a 9 días. También, del análisis sensorial se ha observado que las características del producto como color, sabor y frescura son preservadas cuando las salchichas son tratadas con 3 % de las Nps cargadas con el aceite esencial (X. Fan et al., 2024).

Larissa y colaboradores, manifiestan en su trabajo que las nanopartículas basadas en nanopartículas de lactoferrina-quitosano-gelano, inhiben el crecimiento de microorganismos como la *Staphylococcus aureus*, preservando las características de la fresa y siendo un potencial

material para conservación de otros productos alimentarios. Además, los destacados resultados han sido relacionados con el tamaño de la nanopartícula (53.53 nm), alto potencial Z (+ 57.90 mV) y compuestos bioactivos presentes en los componentes de la nanopartícula (Duarte & Picone, 2022). Parichart y coinvestigadores manifiestan en su trabajo que las nanopartículas de quitosano o derivados cargados con agentes bacteriales, han mostrado fuerte actividad de inhibición de crecimiento contra *E. coli* (95.33 %) y *S.aureus* (> 98 %), también actividad antioxidante (30 – 80 %). En resumen, las NPs se perfilan como un potencial aditivo para bioplásticos que se utilicen posteriormente en la elaboración de envases de alimentos activos de base biológica (Kongkaoroptham et al., 2021a).

Tabla 4

Investigaciones realizadas por diversos autores sobre el encapsulado de compuestos bioactivos en quitosano.

Matriz Polimérica	Agente reticulante	Principio Bioactivo	Método	Condiciones	Tamaño (nm) /Pot. Z (mV) /Índice de Polidispersidad	Eficiencia de Encapsulado (%) /Capacidad de Carga (%)	Aplicación y Condiciones de Aplicación	Autor
Quitosano (1% en acético/ 280 kDa/ 90% G.D.)	TPP	Aceite esencial de comino	Emulsión - liofilización	Agitación a 60 °C, 2 h	584 – 811/ > +25	37 – 52	Antibacterial y potencial preservante	(M. Zhang et al., 2024)
Polisacáridos de nisina y Lycium barbarum	No utiliza	Aceite esencial de romero	Interacción electrostática e hidrofóbica	Ultrasonificado (600 Watts), sonicado (30 min)	167 – 387 / No reporta/ 0.22-0.31	86.6/No reporta	Antibacterial y preservante de Beef	(Lin et al., 2022)
Quitosano (50 – 190 kDa en Ac. Acético 1 %v/v)	TPP	No utiliza	Gelificación iónica	Agitación a 800 rpm	359/ + 30.2/ 0.32	No reporta	Estabilización de emulsiones Pickering	(Alehosseini et al., 2022a)
Quitosano (2 %, Bajo peso molecular en ácido acético 1 % v/v)	TPP	Monoterpenos (limoneno, linalol, timol)	Gelificación iónica	Monoterpenos en DMSO, agitación 2h, ultrasonificado	34 – 54 /-0.17 a -0.33 /No reporta	No Reporta /No reporta	Antibacterial y preservación de carne molda	(Badawy et al., 2020)

Tabla 4

Investigaciones realizadas por diversos autores sobre el encapsulado de compuestos bioactivos en quitosano (continuación).

Matriz Polimérica	Agente reticulante	Principio Bioactivo	Método	Condiciones	Tamaño (nm) /Pot. Z (mV) /Índice de Polidispersidad	Eficiencia de Encapsulado (%) /Capacidad de Carga (%)	Aplicación y Condiciones de Aplicación	Autor
Quitosano (1 % v/v ácido acético/ 50 – 190 kDa)	TPP	Aceite esencial de ajo	Emulsificación - gelificación iónica	Agitación por una noche, uso de Tween 80	172 – 353 / 0.01 - 0.42/ 19 – 50 mV	23 – 33 / 5 - 20	Actividad antifúngica contra <i>Aspergillus versicolor</i> , <i>A. niger</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	(Mondéjar-López et al., 2022)
Quitosano (1 % w/v en acético 1 %v/v) + Zeína en etanol.	No utiliza	Aceite esencial de orégano	No reportado	Agitación / diálisis	253.4 / + 36.5/0.22	89.77/ No reporta	Preservación de salchicha roja Harbin	(X. Fan et al., 2024)
Lactoferrina, gelano, quitosano (150 kDa, en ácido acético pH 4)	No utiliza	No utiliza	Complejación iónica	-	53.53 / + 57.90 / No reporta	-	Recomienda el uso para preservación de alimentos: Fresa	(Duarte & Picone, 2022)
Quitosano (700 kDa, en ácido acético 2 % v/v)	EDC/ irradiación gama	No utiliza	Precipitación/ copolimerización	Obtención coloidal de CS por agitación e irradiación gama	25 53/No reporta	-	Antibacterial y preservación de alimentos como el pan en empaques plásticos	(Kongkaoroptham et al., 2021a)

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Ahumado

Es un método de procesamiento por el cual se somete los alimentos a la acción de humos procedentes de una combustión incompleta generada por maderas o materia vegetal, que arde sin llama. Este procedimiento se caracteriza porque va desde la etapa de salazón hasta el ahumado pudiendo realizarse en cámara de ahumado, además permite extender el tiempo de vida de los alimentos, así como también reducir la carga de microorganismos (Iko Afé et al., 2021).

Durante el ahumado, las capas superficiales del alimento se impregnan con constituyentes bactericidas que se generan en el humo tales como aldehídos, fenoles y ácidos carboxílicos (Rodríguez González & López Heras, 2016).

El ahumado se realiza suspendiendo el alimento, sobre el humo generado por el quemado de madera, generalmente se prefieren maderas duras como el roble, nogal americano, fresno y olmo, aunque también se suelen usar maderas de coníferas. No obstante, las maderas inadecuadas son aquellas que son blandas o resinosas dado que producen sabores desagradables (Sikorski, 2016)

2.1.1. Técnicas de ahumado convencional

✓ Ahumado en frío

Durante este proceso, la temperatura no debe elevarse al nivel en que la carne sea cocida, es decir; en esta etapa la proteína no se desnaturaliza. En la práctica, el promedio de temperatura está entre 15 y no sobrepasar los 30 °C. El tiempo del ahumado es variable de acuerdo con el producto; preferentemente será mayor en los pescados de mayor volumen incluidos las truchas arcoíris. Un producto ahumado en frío tiene las condiciones óptimas para el almacenamiento sin refrigeración, además el humo penetra más profundamente en el músculo; así puede decirse que todas las porciones quedan impregnadas de los componentes del humo (S. K. Kumar & Priya E.R., 2017)

✓ Ahumado en caliente

Es un proceso mediante el cual la carne de pescado es cocida al ser sometida al humo y al calor, cuya temperatura fluctúa entre 70 y 95 °C, pudiendo alcanzar 110 °C. En general el producto ahumado en caliente es consumido sin previa cocción. Este tipo de ahumado

cocinará el pescado, destruirá enzimas y reducirá el número total de bacterias (Lozano Vázquez & Gabancho Osoreo, 2014).

Las bacterias termorresistentes más peligrosas aún con el pescado cocido podrían sobrevivir, por lo cual es muy importante tener cuidados posteriores al ahumado. Se recomienda que inmediatamente después de ser sacado del ahumador se enfríe rápidamente entre 0 – 2 °C, manteniéndolo a esa temperatura hasta su consumo. El cocido, si bien disminuye la carga bacteriana existente en el producto, no evita la multiplicación bacteriana que se produce posterior al tratamiento debido a que el coeficiente de actividad del agua continúa siendo alto mientras los tiempos de ahumado y penetración del humo son menores. Esto hace que los productos ahumados en frío tengan siempre un período mayor de conservación que los ahumados en caliente (Fernández et al., 1995).

2.1.2. Beneficios

El humo aporta color a las carnes, esto debido a que suceden reacciones amino-carbonilo que se originan entre los grupos aminos y los compuestos carbonilos. Sin embargo, hay quienes sugieren que los componentes fenólicos contribuyen con la formación del color para el producto ahumado. El aroma y el sabor son proporcionados por los derivados fenólicos como guayacol, siringol y eugenol (Sikorski, 2016; Soldera et al., 2008). El humo tiene propiedades antioxidantes por la presencia de fenoles los cuales inhiben la reacción de auto oxidación al actuar como catalizadores negativos (inhibidores), estos fenoles también contribuyen en su color y sabor (Soldera et al., 2008).

El poder de inhibición que posee el humo generado por la madera se da por la acción de los fenoles. Los más activos son aquellos fenoles que poseen puntos de ebullición más bajo. Por ejemplo, se observó que el crecimiento la bacteria *Staphylococcus aureus* fue inhibida usando humo que contenía una fracción fenólica. Por otro lado, los compuestos que contienen carbonilo imparten un aroma dulce y tienden a suavizar el fuerte aroma del ahumado asociado con los compuestos fenólicos con algunos aromas y sabores "típicos curados al humo" (Sikorski, 2016; Simon et al., 2005)

El humo producido generalmente por aserrín, tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, la acción combinada entre el humo y el calor forma una capa en la superficie del producto que esta actúa como una barrera física y química, de esta manera se reduce la proliferación de microorganismos en la superficie, y por eso se dice que el ahumado posee un efecto preservante (Fernández et al., 1995).

2.2. Humo líquido

El humo líquido se prepara comúnmente por pirólisis de aserrín de madera, este humo se captura en el agua a contracorriente. El humo se recoge hasta alcanzar la concentración deseada. Se procede a filtrar a través de un filtro de pasta de celulosa, aunque estas soluciones de humo líquido se pueden usar sin refinado adicional. El producto final se compone principalmente de la fase de vapor y contiene fenol, ácidos orgánicos y compuestos carbonilo (Deliephan et al., 2023b; Dewi et al., 2019).

2.3. Agentes encapsulantes

Independientemente del método para preparar las cápsulas, el primer paso para encapsular un principio activo, es la selección de una matriz de encapsulación adecuada. A continuación, se presentarán algunas consideraciones importantes.

Entre los agentes encapsulantes utilizados destacan las proteínas (gelatina, caseinatos, suero de leche, zeína, etc.), como se muestra en la **Tabla 5**. En el tema de carbohidratos es extensivamente utilizada la técnica de secado por aspersión sobre todo para ingredientes alimenticios como soporte de encapsulamiento.

Tabla 5

Materiales empleados como encapsulantes.

Tipo de encapsulaste	Encapsulante específico
Gomas	Agar, alginato de sódio, carragenina, goma arábica
Carbohidratos	Quitano , almidón, sacarosa, jarabes de maíz
Celulosas	Etilcelulosa, metilcelulosa, acetilcelulosa, nitrocelulosa, carboximetil-celulosa
Lípidos	Ceras, parafinas, diglicéridos, monoglicéridos, aceites, grasas, ácido esteárico, triestearina
Proteínas	Gluten, caseína, albúmina
Materiales Inorgánicos	Sulfato de calcio, silicatos

2.3.1. Biopolímeros

La palabra biopolímero consta de dos partes, primero el prefijo “bio” que significa proveniente de materia viva y pueden ser obtenidos de origen animal, marino, agrícola y origen microbiológico, segundo, la palabra “polímero” que se refiere a una cadena larga o entrecruzada de una estructura base llamada “monómero”; el cual se repite secuencialmente en todo el polímero. Este monómero puede ser ácidos nucleicos de nucleótidos, aminoácidos, proteínas o sacáridos derivados de azúcares (George et al., 2020; Villada et al., 2007). En la **Tabla 6**, se observan los diferentes tipos de polímeros, además se deduce que el quitosano presenta más propiedades que pueden ser aprovechadas, por ejemplo, su biocompatibilidad, su capacidad antimicrobiana y no toxicidad. Además, puede ser utilizado en diferentes presentaciones: microcápsulas, perlas o nanopartículas; lo que lo vuelve muy versátil en una investigación (Bulmer et al., 2012).

Tabla 6

Tipos de biopolímeros.

Nombre Común	Ventajas	Desventajas
Alginato de Sodio	Económico y fácil de manipular	Se contrae al enfriarse
Almidones	Material resistente a temperaturas	Insoluble en agua a temperatura ambiente
Carboximetil Celulosa	No es inflamable	Se utiliza en concentraciones de 5 – 15%.
Quitosano	Comestible, antimicrobiano, biocompatible, biodegradable y no tóxico, diversidad de peso molecular.	Baja solubilidad en agua

Fuente: (Baxter, Dillon, Taylor, et al., 1992; Deng et al., 2006; Heinze & Koschella, 2005; Le Corre et al., 2010)

2.3.2. Quitosano

Polímero natural y catiónico que se obtiene por desacetilación de la quitina, uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza. La quitina forma parte de la estructura de soporte de numerosos organismos vivos, tales como artrópodos (crustáceos e insectos), moluscos y hongos (Barik et al., 2024). La quitina y el quitosano son biopolímeros que en los últimos años han encontrado gran cantidad de aplicaciones, especialmente en la industria alimentaria en la clarificación de jugos de fruta, en la biotecnológica, así como también en la síntesis de nanoesferas y nanocápsulas (Divya & Jisha, 2018; Flores-Belmont & Jiménez-Munguía, 2013).

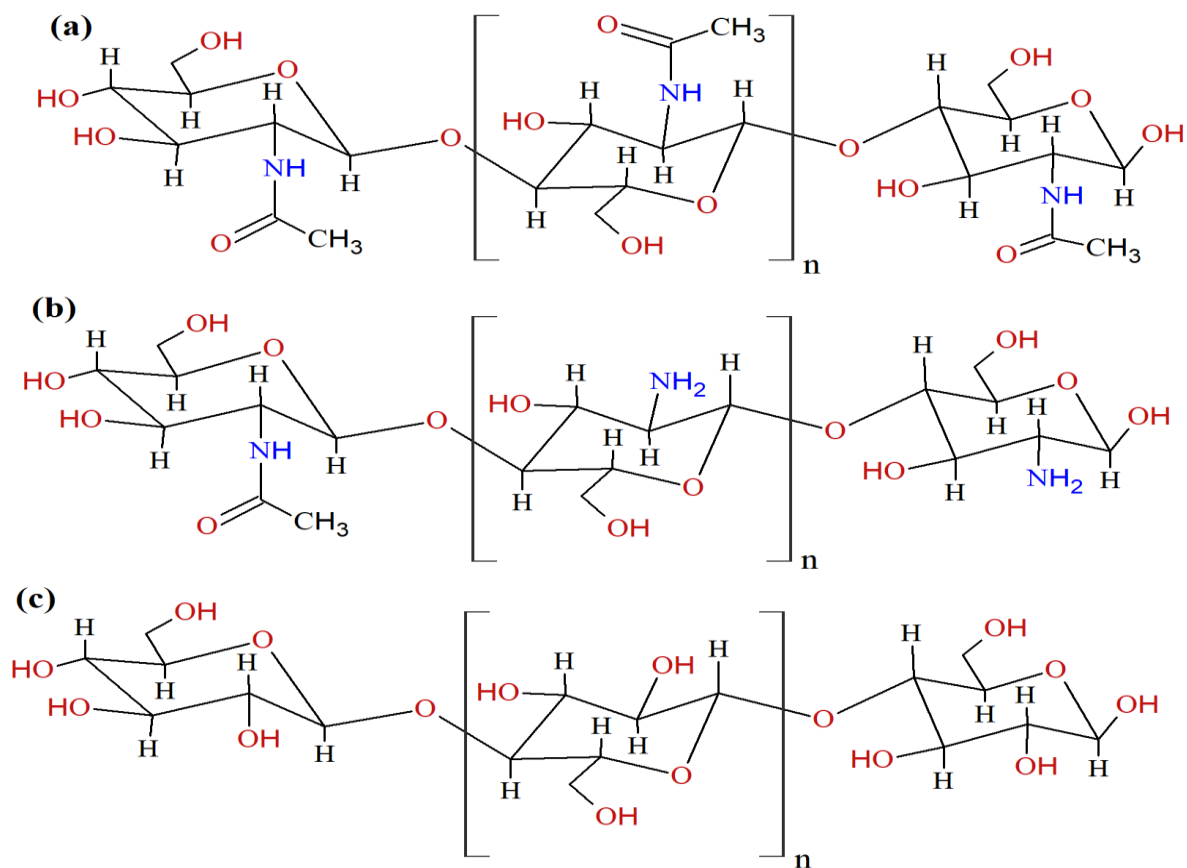
✓ Estructura química

Al igual que la quitina, el quitosano está formado por cadenas lineales de monómeros de glucopiranosas que están unidas por enlaces β -(1-4), siendo nombrada químicamente: 2-Amino-2-Desoxi- β -D-Glucopiranososa. La diferencia se encuentra en el carbono número dos (C2), en donde la quitina posee un grupo acetamido, mientras que en el quitosano el grupo está desacetilado convirtiéndose a un grupo amino (Khan & Alamry, 2021; Morin-Crini et al., 2019)

Cabe mencionar que tanto el quitosano como la quitina son estructuralmente similares a la celulosa (biopolímero formado solo por moléculas de glucosas) tal como se observa en la **Figura 1**, por lo cual también tienen propiedades similares a esta. La configuración β -(1,4)-2-acetamido-2-desoxi- β -D-glucopiranososa hacen que su estructura sea rígida y no tengan ramificaciones (Morin-Crini et al., 2019).

Figura 1

Estructuras de (a) quitina, (b) quitosano y (c) celulosa.



Modificado de (Baxter, Dillon, Anthony Taylor, et al., 1992).

Por otra parte, tanto la fuente de quitina (algas, cutículas de insectos, crustáceos, en algunos arácnidos, paredes celulares de hongos zigomicetos, etc.) así como el método de obtención, determinan la composición de las cadenas de quitosano y su tamaño. Por lo cual, el grado de desacetilación y el peso molecular promedio son dos parámetros de obligatorio conocimiento para poder realizar la caracterización del mencionado polímero. Las principales propiedades fisicoquímicas del quitosano que determinan sus propiedades funcionales son su grado de desacetilación y su peso molecular promedio, también se puede considerar su cristalinidad, su contenido de agua, cenizas y proteínas que son características fisicoquímicas a considerar para la aplicación de un quitosano específico (Castro et al., 2015).

El quitosano se puede encontrar a diferentes pesos moleculares siendo el rango de valores: quitosano de bajo peso molecular de 50 a 190 kDa, quitosano de peso molecular medio de 190 a 310 kDa y quitosano de alto peso molecular de 310 a 375 kDa (Hernández et al., 2011).

Entre estos tres tipos de pesos moleculares, el bajo peso molecular se destaca por presentar mejor solubilidad acuosa, bioactividad y menor toxicidad. Además, luego de preparar las nanopartículas, estas muestran menores tamaños, mejor estabilidad, buen porcentaje de encapsulamiento y liberación de fármacos o preservantes (Bulmer et al., 2012; Fàbregas et al., 2013; W. Fan et al., 2012), propiedades de interés en esta investigación.

El grado de desacetilación del quitosano queda determinado por el porcentaje de grupos aminos que quedan libres en la mencionada molécula. Y dicha propiedad está vinculada con la solubilidad. Además, es denominado quitosano cuando el grado de desacetilación de la quitina es mayor al 50 % (Rinaudo, 2006).

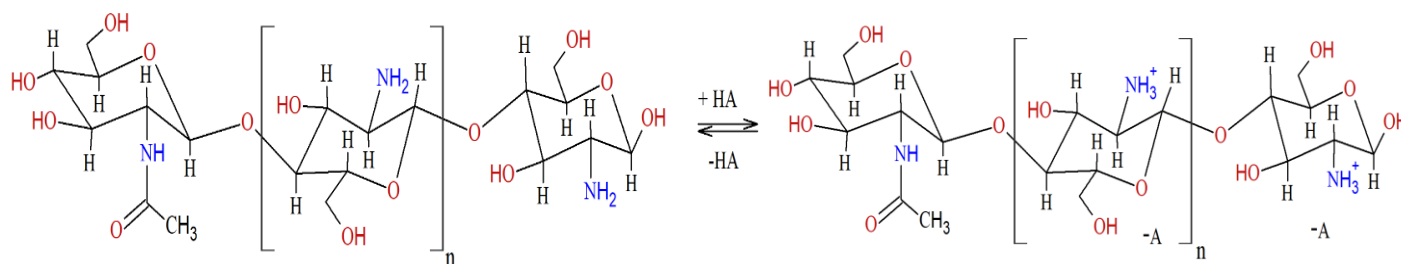
Como consecuencia de la hidrólisis del grupo N-acetilo, aumenta la capacidad hidrofílica del quitosano y pasa a ser soluble en soluciones ácidas diluidas (acético, fórmico, clorhídrico, entre otros) ya que el pKa del grupo amino del quitosano tiene un valor de alrededor de 6.5 (Expósito Harris, 2010). Además, la protonación de los grupos amino del quitosano en medio ácido le confiere un carácter altamente reactivo (Castro et al., 2015).

✓ **Actividad bactericida**

La carga positiva que se desarrolla en el quitosano en medio ácido, $\text{pH} < 5.5$; tal como se aprecia en la **Figura 2**, esto debido a la protonación del grupo amino presente en cada una de sus unidades glucosamina, lo cual lo hace soluble en medio acuoso, diferenciándolo así de su polímero matriz, la quitina (Lárez, 2008).

Figura 2

Estructura química del quitosano en función del pH del medio



Adaptado de: (Lárez, 2008).

Los mecanismos de acción por los cuales el quitosano (con distintos grados de acetilación), y por extensión sus derivados ejercen dicha actividad, no han sido dilucidados completamente; sin embargo, hay algunos mecanismos propuestos para explicar acciones específicas, como por ejemplo: La interacción electrostática entre el quitosano cargado positivamente (polielectrolito catiónico) y algunas bacterias con membranas celulares cargadas negativamente altera significativamente las propiedades de barrera de la membrana exterior del microorganismo. Algunos autores han propuesto que la formación del complejo polielectrolito bloquea físicamente la membrana celular externa del microorganismo, impidiendo el flujo normal de nutrientes /desechos, provocando la muerte bacteriana (Goy et al., 2009).

La interacción electrostática entre los grupos -NH_3^+ del polication y los grupos fosforilos de los fosfolípidos presentes en la membrana celular de bacterias Gram negativas causa daños en ésta, provocando la salida de material intracelular (Antoniou et al., 2015a). En este sentido se han realizado estudios espectroscópicos de la salida de dicho material, el cual absorbe en la región ultravioleta (270 nm). Más recientemente (Chung et al., 2004) han determinado que la salida del material intracelular bacteriano se ve favorecida por el grado de acetilación más altos tanto en bacterias Gram negativas (*Escherichia coli*) como en Gram positivas (*S. aureus*). Para algunas bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *Bacillus cereus*) que carecen de cargas negativas en la membrana celular, el quitosano ha mostrado actividad incluso mayor, en algunos casos, que para bacterias Gram negativas. En el caso de *S. aureus* recientemente se ha planteado la posibilidad de que la membrana celular de estos microorganismos tenga poros lo suficientemente grandes como para que el quitosano logre entrar al interior de las células y alterar funciones vitales de estas (Antoniou et al., 2015a).

✓ **Quitosano como agente encapsulante**

El encapsulamiento se trata de que pequeñas gotas de líquidos, partículas sólidas, líquidas o gaseosas que se recubren como una red polimérica porosa, conteniendo a una sustancia activa. El encapsulamiento en el rubro alimentario, se da cuando se encapsula a sustancias de bajo peso molecular (Parra Huertas, 2010). Esta técnica fue referida por Lupo et al., (2012), quienes la refieren como la obtención de una barrera que aletarga reacciones químicas entre el principio activo y el medio, fomentando el aumento de la vida útil, causando de esa manera la liberación gradual y haciendo sencillo su manipulación al modificar el estado físico del compuesto activo.

En la industria, esta técnica ha logrado un importante valor por la protección que se le da al principio activo al ser encapsulado, protegiéndolo de factores ambientales (calor y humedad) y cuidando así su integridad cuando son empleados en la industria de alimentos funcionales (Flores-Belmont & Jiménez-Munguía, 2013; Parra Huertas, 2010).

2.4. Agentes reticulantes

Los agentes reticulantes, son aquellos que dan origen a uniones intermoleculares o intramoleculares de dos o más moléculas mediante un enlace covalente (Maitra et al., 2014) o interacciones electrostáticas. Existen diferentes tipos tanto de origen inorgánico como orgánico, algunos de estos y sus características se muestran en la **Tabla 7**. En el presente trabajo se utilizó como agente reticulante el TPP debido a su baja toxicidad y afinidad con el quitosano para formar nanocomplejos.

Tabla 7

Agentes reticulantes empleados en la síntesis de nanopartículas por gelificación iónica.

Agente reticulante	Descripción	Toxicidad
TPP	Polianión, agente reticulante del quitosano.	baja
CaCl ₂	Agente reticulante del alginato.	baja
Genipina	Se encuentra en el extracto de fruta, se utiliza como agente reticulante y no es tóxico.	baja
Glutaraldehído	Limpieza, desinfección y esterilización de material clínico	alta

Fuente: (Expósito Harris, 2010)

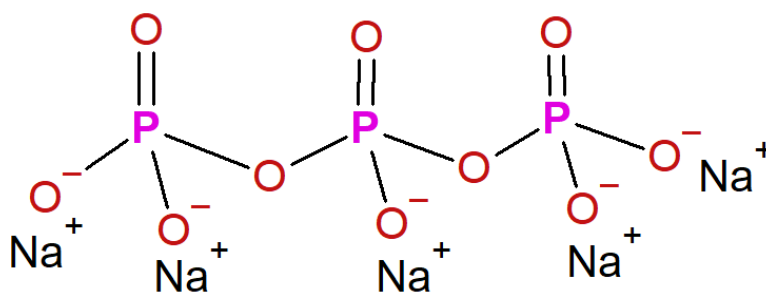
2.4.1. Tripolifosfato de sodio (TPP)

Uno de los agentes reticulantes ampliamente utilizados para la formación de nanopartículas de quitosano, es el tripolifosfato de sodio un reticulante iónico que puede intercambiar protones con los grupos aminos del quitosano, además posee propiedades multivalentes y muy baja toxicidad (Saeedi et al., 2022).

La estructura del tripolifosfato de sodio se muestra en la **Figura 3**, en la cual se observa la unión de los átomos de fósforo por medio de los oxígenos. Además, las cargas negativas sobre los oxígenos que facilitan su interacción con el quitosano; siendo el quitosano un polication.

Figura 3

Estructura del tripolifosfato de sodio

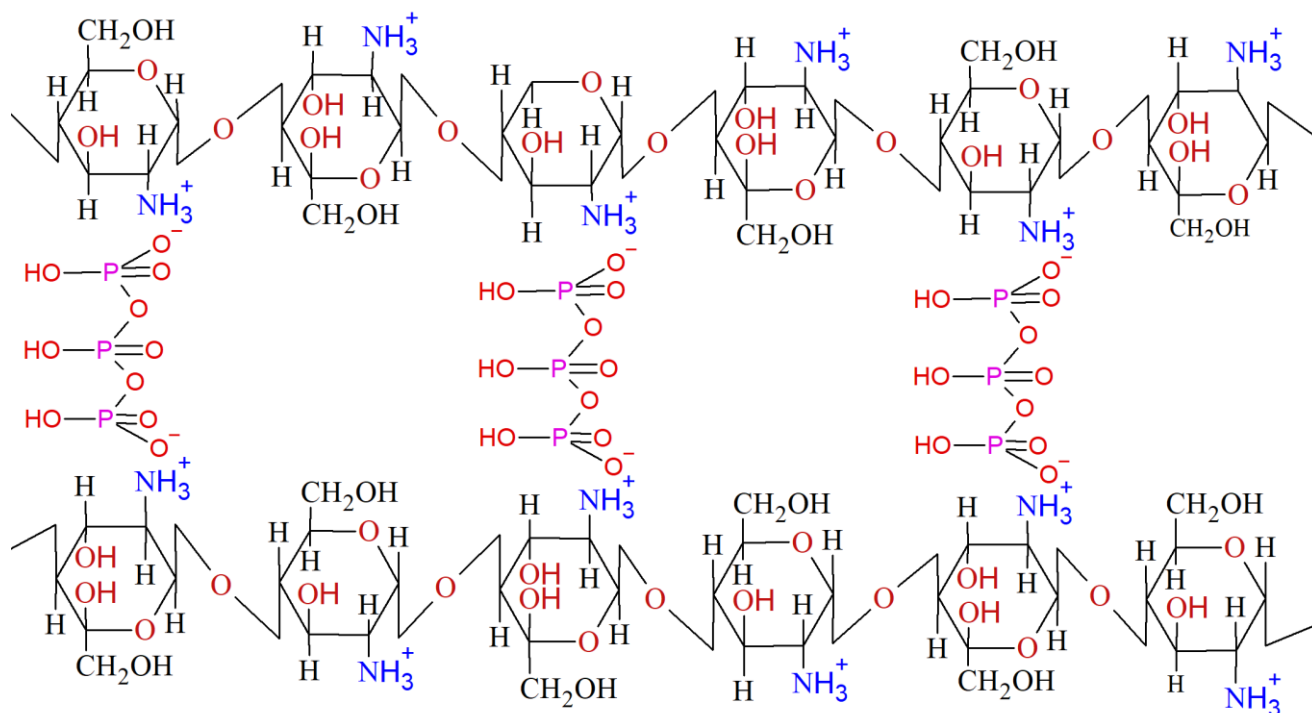


Modificado de: (Venkatesan et al., 2016)

Por otra parte, esta molécula contiene grupos fosfatos capaces de interactuar con el quitosano mediante interacciones electrostáticas bajo condiciones ácidas. Sin embargo, se ha demostrado que las moléculas de quitosano se unen de forma inmediata y selectiva con el TPP, generando varios complejos tipo intra e intermoleculares tal como se muestra en la **Figura 4** (de Pinho Neves et al., 2014).

Figura 4

Interacción de los grupos hidroxilo del TPP con los grupos amino del quitosano y la posterior formación de la nanopartícula.



Adaptado de: (Fwu-Long et al., 1999).

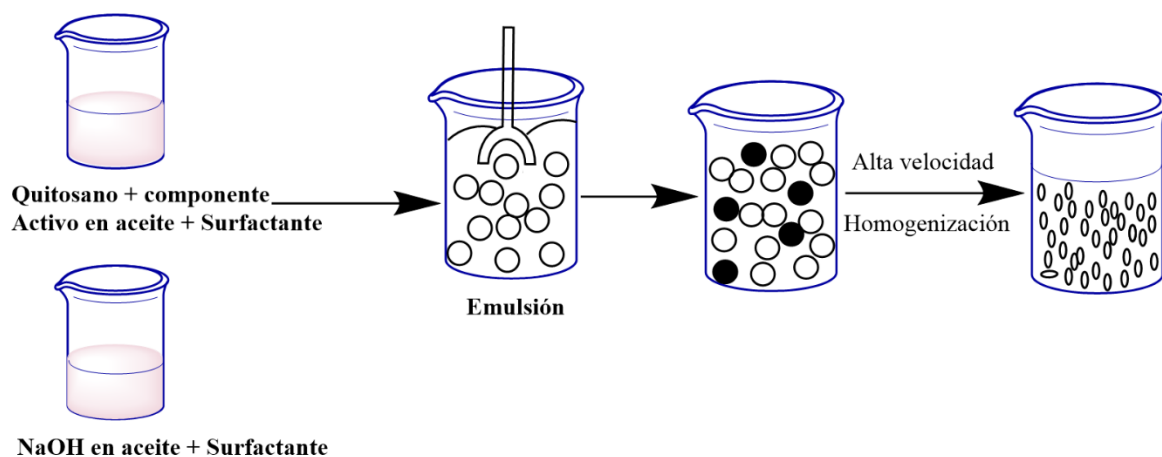
2.5. Técnicas de preparación de nanopartículas

2.5.1. Nanopartículas de quitosano producidas por gelificación basado en la emulsificación

El método propuesto para la preparación de nanopartículas de quitosano está basado en la formación espontánea de complejos entre el quitosano y polianiones como el tripolifosfato. Las nanopartículas preparadas por este método pueden tener diámetros entre 200-500 nm y muestran una forma semiesférica bajo la microscopia electrónica de barrido (SEM). Las nanopartículas de quitosano producidas por gelificación en un método basado en la emulsificación que resulta en partículas con un diámetro de 400 nm. Comparado con el método descrito a continuación, esta técnica tiene una mayor desventaja ya que involucra solventes orgánicos durante la separación de las partículas; los cuales, son difíciles de remover y pueden causar toxicidad. Un ejemplo del proceso de emulsificación se muestra en la **Figura 5**.

Figura 5

Esquema ilustrativo de la técnica de emulsificación.



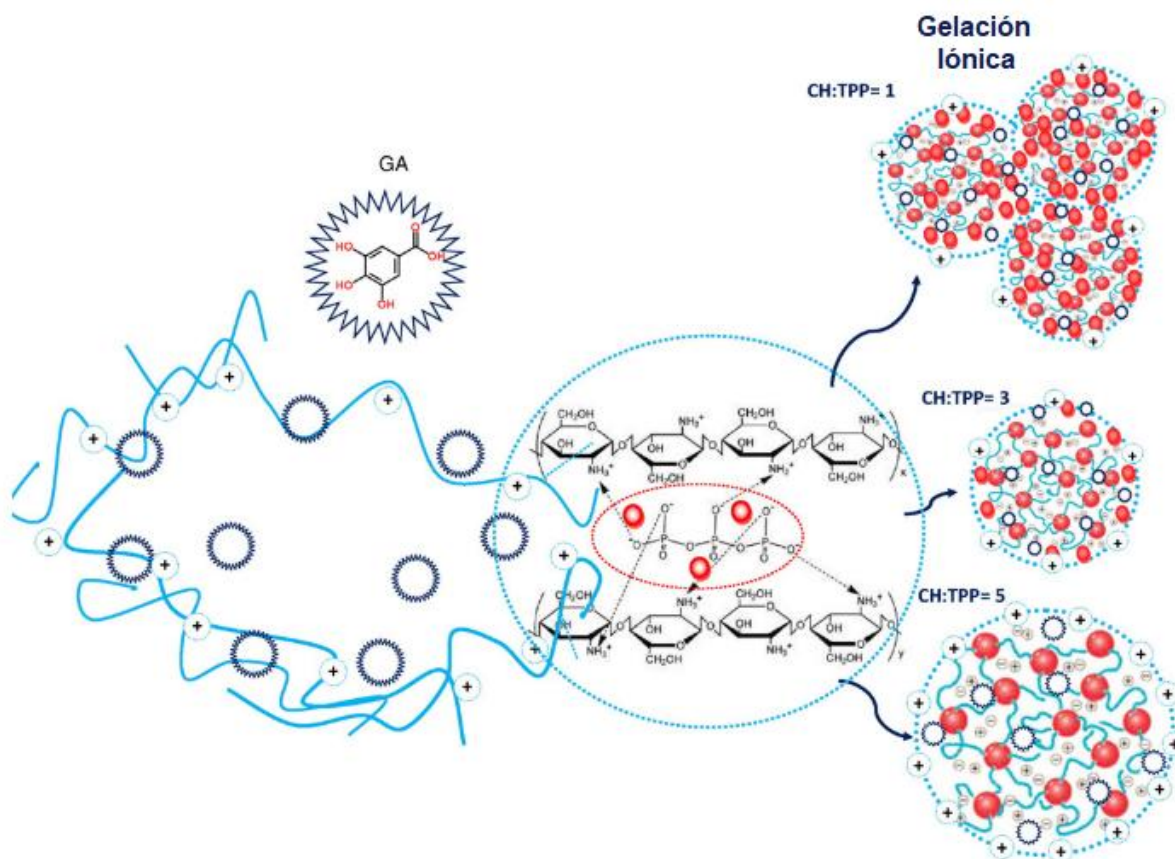
2.5.2. Nanopartículas de quitosano por gelificación iónica

Uno de los métodos más rápidos y ventajosos de obtener nanopartículas de quitosano es mediante la gelificación iónica, la cual se da a través de un amplio entrecruzamiento intermolecular, entre los grupos amino con carga positiva que presenta la estructura del quitosano con las cargas negativas de compuestos aniónicos tales como el tripolifosfato de sodio. La técnica de gelificación iónica presenta diversas ventajas ya que es un proceso no tóxico, no requiere solventes orgánicos, además puede ser fácilmente controlable (Alehosseini et al., 2022a). Sin embargo, uno de los inconvenientes de este método es la baja carga del compuesto activo durante la formación de las partículas. Además, las nanopartículas formadas son sensibles a los cambios de pH y concentración iónica, lo que podría causar su alta liberación. (Lupo et al., 2012).

Este proceso consiste en la adición de la solución que contenga al agente reticulante por medio de un proceso extruido o por goteo, dentro de una solución polimérica (Chan et al., 2006; Lupo et al., 2012). En la **Figura 6** se muestra la encapsulación del ácido gálico (GA) en nanopartículas de quitosano y TPP mediante la gelificación iónica.

Figura 6

Mecanismo de la gelificación iónica.



Fuente: (Lamarra et al., 2016)

2.5.3. Método de secado por atomización o desecación por atomización

La atomización o aspersión es un método que comúnmente se utiliza en la industria alimentaria y consiste en atomizar aire caliente en una suspensión o emulsión homogenizada del principio activo en la matriz del material encapsulante, para lograr una rápida evaporación del solvente (agua) y obtener el principio activo encapsulado en forma de partículas de polvo.

El proceso de atomización es controlado mediante la alimentación del producto, el flujo de aire y la temperatura. Se emplea una variedad de materiales para la encapsulación, aunque normalmente se utilizan polisacáridos (Pérez-Leonard et al., 2013).

Este método permite la posibilidad de establecer esta tecnología como un proceso continuo, su facilidad de manejo y su bajo costo son características idóneas y de gran ventaja para su aplicación en procesos industriales. Por otro lado, existen inconvenientes relacionados

con las altas temperaturas empleadas en el proceso para la evaporación del solvente, las cuales pueden afectar estabilidad de la sustancia activa.

No obstante, existe un gran número de investigaciones basadas en este método que reportan resultados satisfactorios con mínimas pérdidas del principio activo, lo cual indica que hay dos factores claves y determinantes para el éxito del secado por atomización: el tipo de materiales utilizados para encapsular como (maltodextrina, pectina, quitosano, etc.) y proteger la sustancia activa que involucra sus propiedades fisicoquímicas y la optimización de los parámetros utilizados en el secado (Pérez-Leonard et al., 2013).

2.6. Métodos de caracterización

En esta parte se describen los principales métodos utilizados para la caracterización de las nanopartículas empleadas en el trabajo.

2.6.1. Barrido dinámico de luz (DLS)

El barrido de luz dinámica o DLS (del inglés Dynamic Light Scattering), es un método de análisis instrumental basado en el movimiento browniano de las partículas a causa de una dispersión y lo cual se relaciona con el tamaño hidrodinámico (diámetro) de las mismas. El diagrama de funcionamiento se muestra en la **Figura 7**, en este se observa que el equipo detecta la luz dispersada por las nanopartículas en una dispersión coloidal para un intervalo de tiempo, en otras palabras, mide la velocidad con la cual las partículas se desplazan, determinando así el coeficiente de difusión. Luego, utilizando en la ecuación de Stokes-Einstein (Ecuación 1) y de donde se obtiene el diámetro hidrodinámico de la partícula (D_H) (Bhattacharjee, 2016).

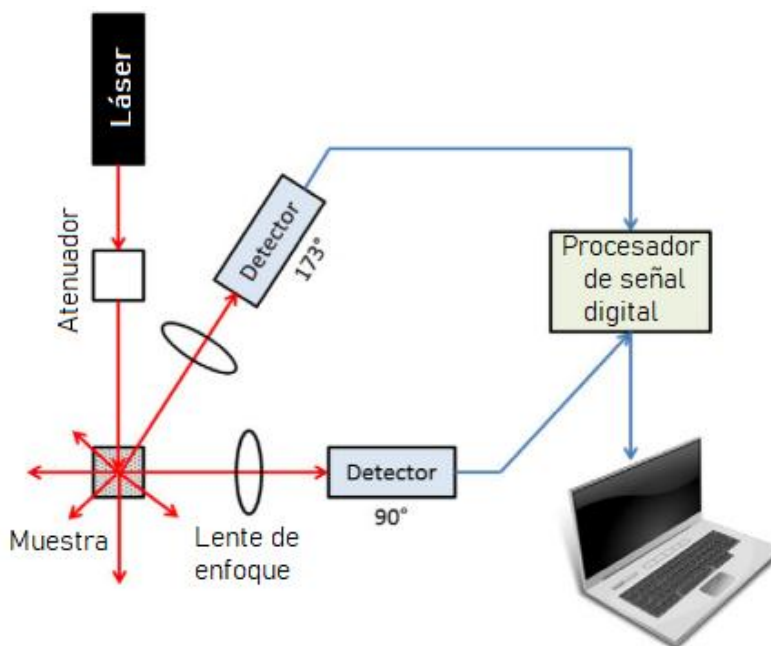
$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad \text{..... Ecuación 1}$$

Donde, k es la constante de Boltzman, T la temperatura, η la viscosidad del medio y D , el coeficiente de difusión.

En el presente trabajo esta técnica es utilizada con el fin de determinar la estabilidad de las nanopartículas a través de la medida de distribución del tamaño hidrodinámico de la partícula, potencial Z , así como también de su índice de polidispersidad. En contraste, la técnica proveerá información sobre las características fisicoquímicas de las nanopartículas como consecuencia de su interacción con la luz.

Figura 7

Diagrama de la instrumentación del DLS.



Fuente: (Bhattacharjee, 2016a).

2.6.2. Potencial Z

El potencial Z también es conocido como potencial electrocinético debido a que se refiere al potencial de una nanopartícula coloidal que se mueve bajo un campo eléctrico. El potencial Z se define como la diferencia de potencial entre la capa de dispersante del plano de deslizamiento que rodea a la nanopartícula electroforéticamente móvil con su doble capa eléctrica. Para determinar el potencial Z, se determina la movilidad electroforética y con este valor se reemplaza en la ecuación de Henry (Bhattacharjee, 2016).

$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(k\alpha)}{3\eta} \quad \text{.....} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde: U_E es la movilidad electroforética, ε es la constante dieléctrica, $f(k\alpha)$ es la función de Henry, η es la viscosidad y z es el potencial Z.

El potencial Z al igual que el DLS facilita información sobre la estabilidad de las partículas pero desde el punto de vista de su carga superficial, ya que este es un factor que influye significativamente en su comportamiento biológico (Bhattacharjee, 2016; Karmakar, 2017); por ende en el presente trabajo es usado para analizar la estabilidad de las nanopartículas de quitosano, lo cual en conjunto al DLS permitan explicar su

comportamiento fisicoquímico, tales como la toxicidad, disolución e incluso la influencia en la liberación de principios activos desde su superficie.

2.6.3. Espectrofotometría UV-Vis

La espectrofotometría por UV-Vis se basa en la interacción de la radiación electromagnética comprendida entre los 190 y 800 nm con la materia. La radiación produce la excitación de los electrones hacia un nivel superior de energía. Por lo tanto, la parte de la radiación absorbida puede ser determinada mediante la ley de Lambert-Beer, la cual relaciona la absorbancia con la concentración de la sustancia. Esta ley se muestra en la Ecuación 3.

$$A = \varepsilon C d \quad \text{..... Ecuación 3}$$

Donde A es la absorbancia, ε es la absortividad molar, C es la concentración y d es la longitud de paso de la celda utilizada (Rocha & Teixeira, 2004).

La espectrofotometría UV-vis, es una técnica de caracterización tanto cuantitativa y cualitativa que se utiliza para medir indirectamente las transiciones electrónicas producidas en las especies químicas, según la concentración química de estas y la energía absorbida (Faraldos & Goberna, 2011); además las cuales son descritas bajo la ley Lambert – Beer antes mencionada. Por ende, en el presente trabajo se utilizó para determinar diferentes sustancias o actividad química de estas, tales como fenoles totales, actividad antioxidante, benzo (a)pireno, etc.

2.6.4. Espectroscopía de infrarrojo

La espectrofotometría de infrarrojo, es una técnica que se basa en la interacción de la radiación electromagnética comprendida en el rango de 2.5 hasta 20 μm . Esta región es denominada el infrarrojo medio y donde las moléculas de una sustancia absorben la radiación y pasan a un nivel superior de energía vibracional. La representación de la absorbancia o transmitancia respecto al recíproco de la longitud de onda, permite obtener el espectro característico para la sustancia analizada (Schmitt & Flemming, 1996), además el método por reflectancia total atenuada (ATR) es una forma de ensayo no destructiva.

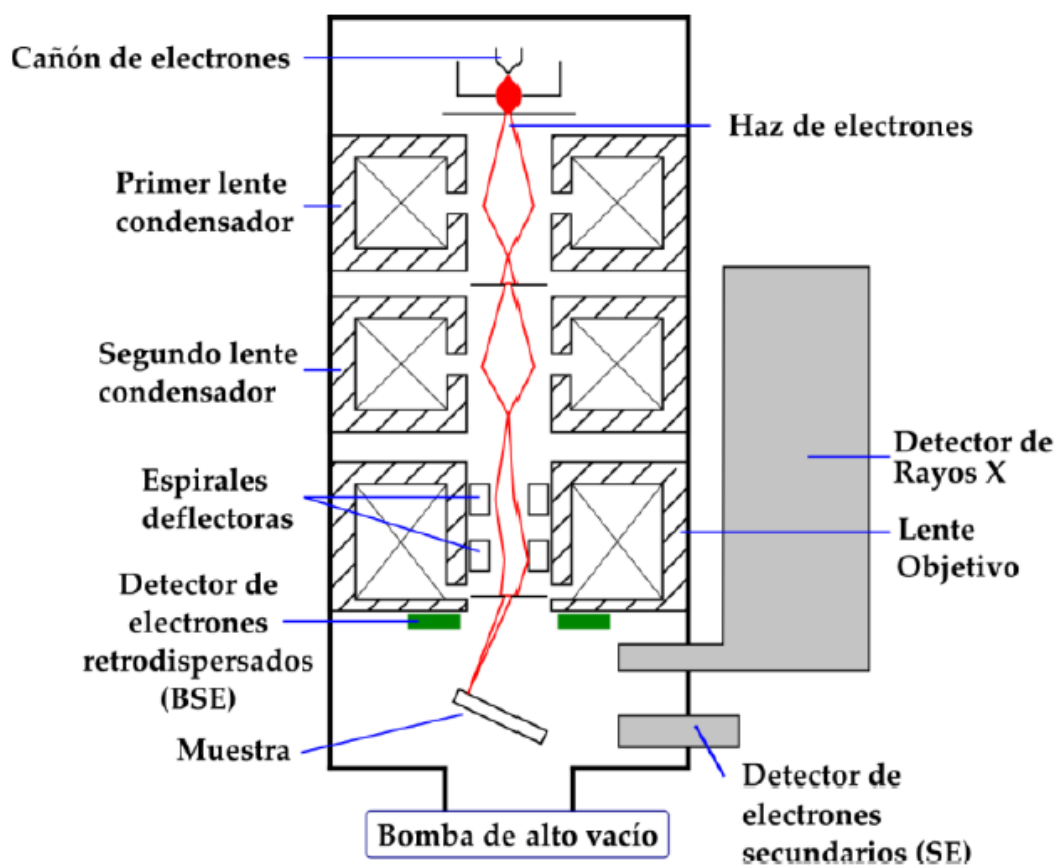
En el presente trabajo, esta técnica es utilizada con el fin de identificar todas las transiciones vibracionales, correspondientes a la presencia de los grupos funcionales en la estructura de las moléculas; además mediante comparación de las señales espectroscópicas determinar también si una muestra tiene o no la misma composición.

2.6.5. Microscopía electrónica de barrido

La microscopía electrónica de barrido o SEM, es una técnica espectroscópica que se basa en el uso de electrones acelerados entre 0.1 y 50 keV, los cuales se hacen impactar sobre la muestra. Luego del impacto se generan electrones secundario y retrodispersados, los cuales son posteriormente detectados y procesados hasta obtener una imagen (Clavijo, 2013). Esta técnica es ampliamente utilizada con el objetivo de analizar las características estructurales morfológicas y superficiales de una muestra, además de que apenas requieren una preparación. En este trabajo, la técnica es usada para analizar las características superficiales de las diferentes muestras trabajadas como las nanopartículas, etc. Un esquema del funcionamiento se muestra en la siguiente **Figura 8**.

Figura 8

Esquema de funcionamiento de un equipo de microscopía electrónica de barrido.



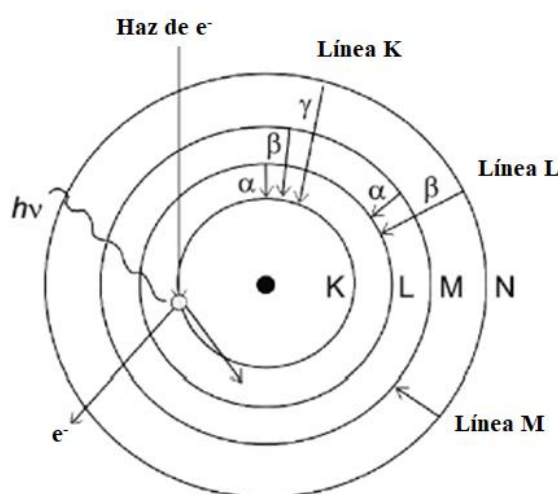
Fuente: (Clavijo, 2013).

2.6.6. Espectroscopía de energía de rayos-X dispersados (EDS)

El análisis por EDS se basa en el impacto de electrones acelerados sobre la muestra, los cuales pueden arrancar un electrón de la capa interna K del átomo. Luego un electrón de un nivel superior (L o M) llena ese espacio. Durante esta transición se libera energía en forma de rayos-X, tal como se muestra en la **Figura 9**, la cual es detectada e interpretada por el equipo (Wassilkowska et al., 2014). Además, cada elemento tiene una energía característica, la cual puede ser identificada de esta forma. Esta técnica de caracterización, es una de las más utilizadas ya que proporciona información sobre la composición elemental del material o muestra, además al igual que el SEM la muestra no requiere mucha preparación, en parte debido a que el EDS suele venir acoplado al SEM, proporcionando así información cualitativa y cuantitativa (Faraldos & Goberna, 2011).

Figura 9

Fundamento del análisis por EDS. Los electrones acelerados impactan sobre los electrones cercanos al núcleo.



Fuente: (Wassilkowska et al., 2014).

2.7. Ensayos de cinética de liberación controlada

Diversos modelos se aplican para el estudio cinético de la liberación controlada de un fármaco o aditivo alimentario que ha sido previamente encapsulado. Entre los principales modelos como se muestra en la **Tabla 8**, podemos citar modelos de orden cero, primer orden, segundo orden, pero también existen modelos más complejos como los de Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas y Baker-Lonsdale (Padmaa Paarakh et al., 2018; SUVAKANTA et al., 2017).

Tabla 8*Modelos matemáticos de liberación controlada.*

Modelo Matemático	Descripción	Aplicación
Cinética de orden cero: $Q_t = Q_0 + K_0 t$	Q_t : Masa liberada en el tiempo t . Q_0 : Masa inicial. K_0 : constante de velocidad de orden cero. t : tiempo.	Fármacos poco solubles en formas recubiertas.
Cinética de primer orden: $Q_t = Q_0 e^{-K_1 t}$	Q_t : Masa liberada en el tiempo t . Q_0 : Masa inicial. K_1 : constante de velocidad de orden uno. t : tiempo.	Fármacos solubles en agua en matrices porosas
Modelo de Higuchi: $Q = K_H t^{1/2}$	Q : Masa liberada. K_H : constante de disolución de Higuchi. t : tiempo.	Se puede utilizar para fármacos solubles en agua cargados en una matriz.
Modelo Hixson-Crowell: $W_0^{1/3} - W_t^{1/3} = K_0 t$	W_0 =Cantidad inicial de fármaco. W_t =Cantidad de fármaco en el tiempo t .	Útil para tabletas, en donde la forma de la tableta inicial es constante en el tiempo.
Modelo Korsmeyer-Peppas: $\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n$	M_t : masa liberada en el tiempo t . M_∞ : masa liberada en el tiempo infinito. K : constante cinética de liberación. n :	Útil para matrices con forma cilíndrica. “n” está relacionado con el mecanismo de liberación.
Modelo de Baker-Lonsdale: $\frac{3}{2} \left[1 - \left(1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right)^{2/3} \right] - \frac{M_t}{M_\infty} = K t$		Útil para analizar microcápsulas o microesferas.

Fuente adaptado de: (Padmaa Paarakh et al., 2018).

2.8. Actividad biológica

2.8.1. Actividad antioxidante

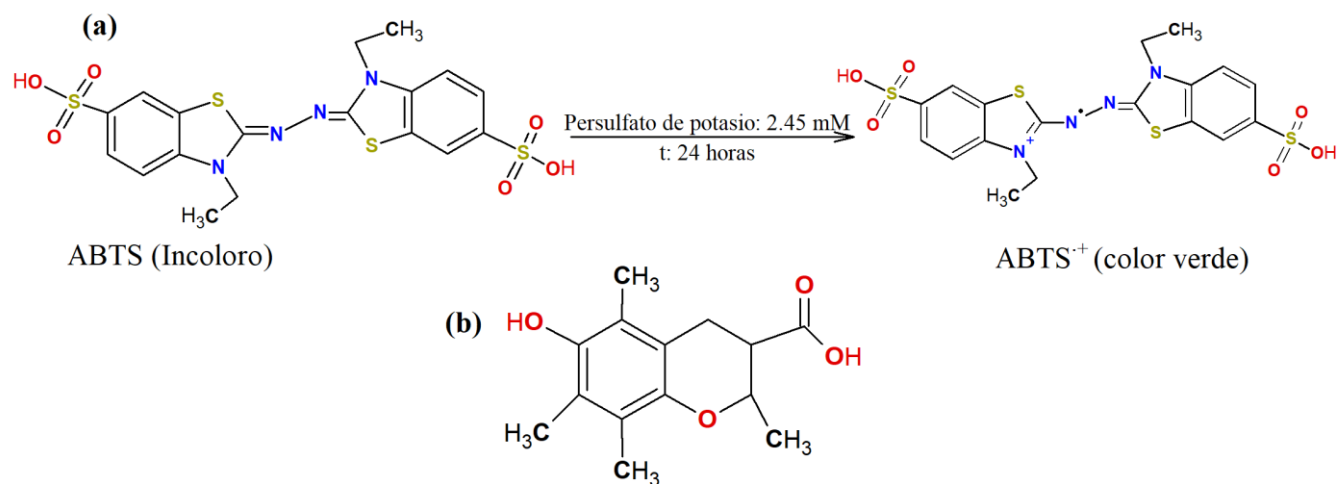
Los procesos degenerativos ocurridos en la biología molecular, sobre todo en la salud humana, es un problema de mucho interés ya que es dañino para el cuerpo. Esto debido al impacto negativo que desencadenan la presencia de radicales libres, responsables del proceso de oxidación y la causa de la degeneración en los organismos vivos. Por tanto, es de vital importancia conocer la actividad antioxidante de un material o compuesto, ya que estos son los responsables de capturar o neutralizar el estrés oxidativo de los radicales libres en las células de los organismos (Munteanu & Apetrei, 2021). Dentro de los métodos utilizados para determinar la actividad antioxidante, existen diversas metodologías tales como el ABTS, DPPH, entre otros.

✓ Método ABTS

Se utiliza el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfónico (ABTS) para formar el catión radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (solución verde-azul) el cual se obtiene por la reacción del ABTS con persulfato de potasio. Luego de formado el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, se hace reaccionar con la muestra. Si la muestra presenta actividad antioxidante, la solución del radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se decolorará hasta obtener una solución incolora (ABTS nuevamente). Este cambio de color indica que el catión radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ se redujo a ABTS, la decoloración se mide al determinar la absorbancia a 734 nm. Se utiliza una curva de calibración preparada con ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (TROLOX, **Figura 10**) (Moon & Shibamoto, 2009).

Figura 10

(a) Reacción química del ABTS, (b) Estructura química del TROLOX.

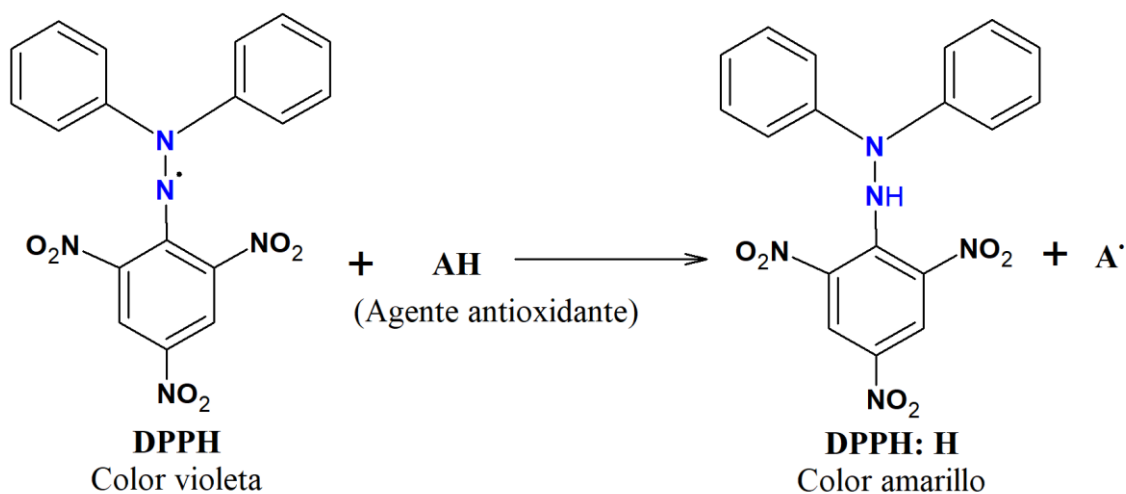


✓ Método del DPPH

Este método consiste en la reacción del 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) con la muestra a evaluar, en medio metanólico. Si la muestra presenta actividad antioxidante, la solución de DPPH (color violeta) cambiará de color a amarillo, lo que indica que el DPPH fue protonado por el agente antioxidante **Figura 11**. El DPPH absorbe a 517 nm mientras que su forma protonada no, por lo que el cálculo de la actividad antioxidante se realiza a esa longitud de onda (Brand-Williams et al., 1995). Se utiliza el ácido gálico y el ácido cítrico como control positivo.

Figura 11

Reacción química con el DPPH.

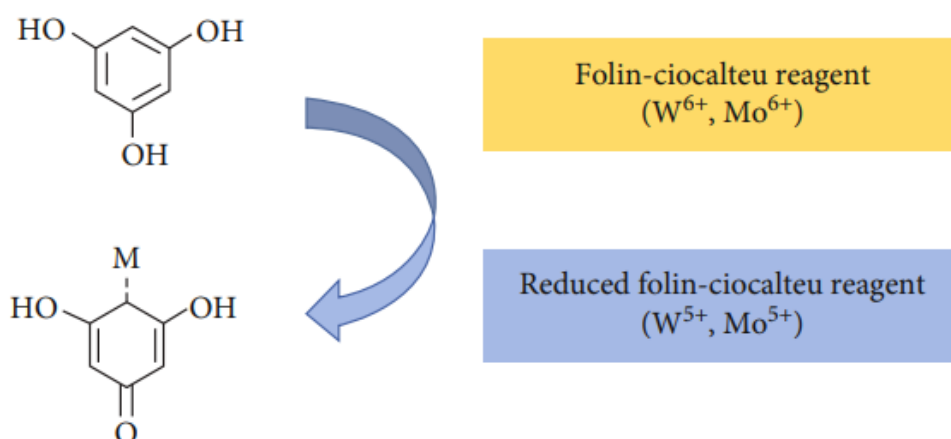


✓ Cuantificación de fenoles totales

Una de las formas más comunes de cuantificar los fenoles totales es mediante el método de Folin Ciocalteu. Esta prueba consiste en que un reactivo de ácido fosfomolibdico y fosfotungstico (solución amarilla) reacciona con los grupos fenólicos de una muestra en medio alcalino. En la **Figura 12**, se muestra la reacción donde hay transferencia de electrones desde los grupos fenólicos hacia la solución de ácidos haciendo que la solución cambie de color amarillo a azul (estado reducido). La presencia de grupos fenólicos puede ser cuantificable espectroscópicamente a 730 nm, que indica el grado de reducción de Mo^{6+} a Mo^{5+} (Carmona-Hernandez et al., 2021).

Figura 12

Reacción en el método de Folin Ciocalteu.



Fuente: (Carmona-Hernandez et al., 2021)

2.8.2. Actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana, son pruebas de susceptibilidad bacteriana que permiten predecir los efectos terapéuticos contra microorganismos y que están asociados a compuestos o agentes que poseen la capacidad de matar bacterias o en su defecto reducir su velocidad de crecimiento, pero sin ser tóxicos o dañar a los tejidos cercanos (Balouiri et al., 2016; Singh et al., 2018). El conocimiento de la actividad antimicrobiana es importante, ya que permite saber si un compuesto o agente tendrá la capacidad de suprimir enfermedades infecciosas (Singh et al., 2018). Por lo tanto, en el presente trabajo se realizará esta prueba con el fin de conocer la efectividad de inhibición de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido. Por otro lado, existen una variedad de métodos para evaluar la actividad de agentes antibacteriales, tales como: el método de difusión en disco, el de gradiente, entre otros. Sin embargo, uno de los más apropiados son los métodos de dilución, ya que posibilitan

determinar con más facilidad la concentración mínima efectiva de un agente antibacterial en una dilución de agar (Singh et al., 2018). Por otro lado, el método de microdilución permite evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de algún compuesto. El proceso consiste en adicionar la sustancia a ser probada en un medio de cultivo líquido con el microorganismo a ser probado. Luego de un periodo de incubación se determina su crecimiento visual o espectrofotométricamente. La microdilución, es una técnica cuantitativa pues permite la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es la menor concentración en la cual el agente antimicrobiano inhibe el crecimiento del microorganismo. Algunas ventajas de la microdilución son la sensibilidad, reproducibilidad y el menor coste económico (Veiga et al., 2019).

Hoy en día, la actividad antimicrobiana se ha convertido en una de las formas más efectivas de controlar la calidad e inocuidad de diferentes productos tales como los alimentarios. Sobre todo, de bacterias patógenas o deterioradoras, donde su cantidad y variedad puede ser muy numerosa. Por ello, se toman como referencia algunos criterios de inocuidad e higiene para alimentos establecidos en reglamentos tanto de la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) y el Organismo Nacional de Sanidad Pesquera (SANIPES). En estos reglamentos se distinguen bacterias patógenas de indicadores (de deterioro y de higiene) y, desde su estructura biológica, pueden ser grampositivas y gramnegativas (DIGESA, 2008; SANIPES, 2016). Esta diferencia estructural define un comportamiento frente a una serie de factores ambientales (pH, actividad del agua, temperatura, antimicrobianos, etc.). Por ello, en cualquier investigación sobre el efecto antimicrobiano, es conveniente trabajar como mínimo, con una cepa grampositiva y otra gramnegativa, las cuales pueden ser patógenas o indicadoras. No obstante, en cada caso se recomienda tomar dos especies grampositivas: una esporulada y otra no esporulada, ambas patógenas para el hombre, también dos especies gramnegativas: una indicadora de higiene (*E. coli*) y otra patógena (*Salmonella Spp*). Por otra parte, la selección de estas especies bacterianas se basa en ciertos criterios tales como: la matriz en la que la sustancia antimicrobiana será aplicado. Por ejemplo, en el presente trabajo la aplicación de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido, son aplicadas para la preservación de las características sensoriales y fisicoquímicas de trucha evitando así su deterioro por microorganismos, además de alargar su tiempo de vida útil. Dentro de estos microorganismos, las *St. Aureus* y *Salmonella spp* son patógenos que se transmiten frecuentemente a los seres humanos mediante productos pesqueros, además, conjuntamente con *E. coli*, un indicador de higiene, en caso de una alta incidencia permitiría deducir falta de la higiene del personal,

limpieza de la zona de trabajo y contacto con aguas residuales (Rondon et al., 2020; Corrales et al., 2011). Asimismo, CLSI (2010) recomienda el uso de estos microorganismos ya que son indicadores de resistencia antimicrobiana, una preocupación por el aumento de casos de microorganismos multirresistentes. En el caso del *Bacillus cereus*, un patógeno esporulado muy recurrente en alimentos, es generalmente estudiado para observar si una matriz como las Nps sería efectivo en la preservación de productos cárnicos como los filetes de trucha, debido a que las esporas de este microorganismo son habituales en el entorno de las plantas de proceso, los mercados populares y supermercados, que bajo ciertas condiciones pueden propiciar su crecimiento (Rondon et al., 2020). Por otro lado, si bien existe diversos microorganismos presentes en los productos pesqueros, existe una serie de razones por el cual muchos son descartados en un estudio (DIGESA, 2008; SANIPES, 2016): *Vibrio spp* es un microorganismo muy habitual en los moluscos y mariscos que en pescados; *Shigella spp*, sus casos reportados son significativamente bajos; por ello, la *E. coli* y *Salmonella spp* de la misma familia tienen mayor prioridad; Hepatitis A y norovirus son oriundos en mariscos y moluscos de aguas contaminadas y son descartados mediante un inspección sanitaria previa exigida por SANIPES. No obstante, existen otras especies (*Carnobacterium spp*) pero son de poca relevancia para la presente investigación por el tipo de matriz. En conclusión, la selección de los microorganismos de estudio en el presente trabajo estuvo sujeta al estado final del producto y prioridad que le da los organismos como DIGESA, SANIPES y CLSI a estos microorganismos como indicadores de higiene y a algunas de ellas, causantes de enfermedad alimentaria, asimismo a patógenos habituales presentes en productos pesqueros (Elbashir et al., 2018).

Las bacterias, son microorganismos procariotas unicelulares que carecen de algunos orgánulos y de un núcleo bien definido. Además, algunas tienen estructuras diferentes, agrupándose como Grampositivas o Gramnegativas. Las bacterias Grampositivas por un lado tienen una estructura constituida por una pared celular, la cual está conformada por múltiples capas de peptidoglicanos rígidas y una gruesa pero porosa (20–80 nm) en comparación con las bacterias Gram-negativas (< 10 nm). A diferencia de las bacterias Grampositivas, las bacterias Gramnegativas poseen una membrana externa adicional, la cual es impermeable a las moléculas grandes. Además, estas clases de bacterias sintetizan lipopolisacáridos adheridos a su membrana externa, mientras que las Grampositivas tienen una pared de ácido teicoico y ácido lipoteicoico, adheridos a la capa de peptidoglicano y a la membrana celular (Varghese & Balachandran, 2021; J. Zhang et al., 2023). Por lo tanto, dependiendo de estas características, una matriz puede tener alta o baja actividad antibacteriana.

3. DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

3.1. Reactivos y materiales

Los reactivos utilizados en el presente trabajo de investigación fueron: quitosano de grado alimentario y bajo peso molecular (Marca Quitoquímica), tripolifosfato de sodio, ácido acético glacial (Pureza > 99 %, Sigma), humo líquido LS (Special Smoke 08696, marca Frutarom), benzo (a) pireno (Supelco) y acetonitrilo (ACN, grado HPLC, J. T. Baker). Por otro lado, las muestras de trucha usados en el análisis biológico fueron truchas provenientes de la Acuicola SHAGA, provincia de Oxapampa – Cerro de Pasco y de la Piscigranja Don SHALVTA, Provincia de Chachapoyas - Amazonas.

Los equipos utilizados fueron: potenciómetros (Hanna, modelo: HI5221-0, GIA-FIQT-UNI; BEL, modelo: W3B, UNESP-Universidad estatal de São Paulo), centrífuga (Eppendorf, modelo: 5810R, GISMA-UNI), espectrofotómetro infrarrojo (Shimadzu, modelo; Prestige 21), equipo de medida viscosimétrica (Fungilab, modelo: Eagle Plus, LIBIPMET-UNI), cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Shimadzu, modelo 20A con detector UV-Vis modelo SPD-20A, UNESP-Universidad estatal de São Paulo), espectrofotómetro UV-visible (Agilent Technologies, modelo: CARY 60 – UV-Vis), un analizador de dispersión dinámica de la luz (DLS) (Brookhaven 90 Plus, GISMA-FC-UNI), un equipo Zetasizer (Malver Instruments, modelo: Nano-ZS90), Microscopio electrónico de barrido (SEM, marca JEOL-UNI y modelo JSM-7500F-UNESP) y espectrofotómetro UV-Visible (Shimadzu, modelo: PharmaSpec UV-1700).

3.2. Caracterización del quitosano

3.2.1. Grado de desacetilación por FT-IR

El grado de desacetilación del quitosano, fue determinado empleando el método descrito por Roberts (Baxter, Dillon, Anthony Taylor, et al., 1992). Se utilizó un espectrofotómetro modelo IR Prestige 21, marca Shimadzu. El análisis por infrarrojo se realizó mediante la técnica de KBr. Para este método se mezclaron 50 mg aproximadamente de quitosano con suficiente bromuro de potasio. Se realizó un barrido desde los 400 cm⁻¹ hasta los 4000 cm⁻¹. El grado de acetilación se calculó a partir de la Ecuación 4:

$$\% \text{ Acetilación} = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} * 115 \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 4}$$

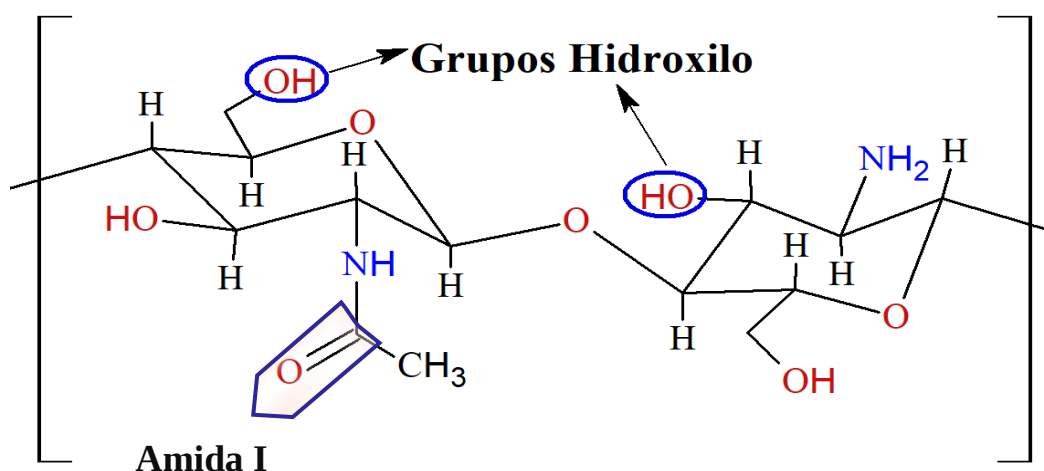
Donde: A_{1655} la absorbancia en 1655 cm^{-1} correspondiente a la banda de la amida I (estiramiento del grupo C=O) y A_{3450} la absorbancia asociada a la vibración de estiramiento de los grupos hidroxilo (-OH) en 3450, tal como se muestra en **Figura 13**.

El grado de desacetilación se calculó mediante la Ecuación 5:

$$\% \text{ Desacetilación} = 100 - \% \text{ Acetilación} \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 5}$$

Figura 13

Grupos funcionales asociados al grado de desacetilación en la estructura del quitosano.



3.2.2. Determinación del peso molecular por viscosimetría

El peso molecular del quitosano se determinó por viscosimetría según el método descrito por Kassai (Kasaai, 2007), mediante un equipo de medida viscosimétrica (Fungilab, Eagle Plus, LIBIPMET -UNI). Este método se basa en la relación existente entre el peso molecular de la solución de quitosano con la viscosidad intrínseca de dicha solución, de acuerdo con la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (MHS), la cual se muestra en la Ecuación 6.

$$[\eta] = KM_v^a \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 6}$$

Donde: η es la viscosidad intrínseca, M_v es el peso molecular promedio, K y a son constantes que dependen o son propios para cada polímero según el solvente utilizado (ver anexo N°1, **Tabla 43**). Para esta determinación se preparó una solución de quitosano de concentración 4 mg mL^{-1} utilizando como solvente ácido acético (0.25 mol L^{-1}) / acetato de sodio (0.25 mol L^{-1}) ($K = 15.7 \times 10^{-6}$ y $a = 0.79$, a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$). La mezcla se dejó en agitación

magnética a 200 rpm, durante 24 horas hasta disolución completa. Luego, por dilución, fueron preparadas soluciones de 0.0, 0.83, 1.11, 1.38, 1.66 y 1.94 mg mL⁻¹. La viscosidad de cada solución fue medida utilizando un viscosímetro de Ostwald, en un baño termostatzado a 25 °C.

La viscosidad relativa se calculó de acuerdo con la Ecuación 7.

$$[\eta]_{\text{rel}} = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad \text{..... Ecuación 7}$$

Donde t es el tiempo que demora en pasar la solución problema entre las dos marcas del viscosímetro de Ostwald y t_0 es el tiempo que demora la solución de 0.00 mg mL⁻¹ de quitosano. Luego viscosidad específica se calculó según la Ecuación 8.

$$[\eta]_{\text{sp}} = [\eta]_{\text{rel}} - 1 \quad \text{..... Ecuación 8}$$

La viscosidad reducida se calculó mediante la Ecuación 9.

$$[\eta]_{\text{rel}} = \frac{[\eta]_{\text{sp}}}{c} \quad \text{..... Ecuación 9}$$

Donde c es la concentración de la solución problema.

Finalmente, la viscosidad intrínseca se determinó según la Ecuación 10. Gráficamente puede ser obtenida mediante la representación de la viscosidad reducida versus la concentración. De la intersección de la recta con el eje Y, se obtiene la viscosidad intrínseca.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} [\eta]_{\text{red}} \quad \text{..... Ecuación 10}$$

3.2.3. Porcentaje de humedad

El porcentaje de humedad del quitosano (% Humedad), se determinó de acuerdo con el método descrito por Lees con algunas modificaciones (Lees & Salguero, 1982). Se pesaron tres muestras de 5 g de quitosano cada una en un crisol (los crisoles fueron previamente secados a 105 °C durante 4 horas y luego pesados). Las muestras fueron secadas a 105 °C durante cuatro horas, después se dejaron enfriar en un desecador y se pesaron. El proceso se repitió hasta observar peso constante. El porcentaje de humedad se calculó según la Ecuación 11.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{Peso humedo} - \text{Peso seco}}{\text{Peso humedo}} * 100 \quad \text{..... Ecuación 11}$$

3.2.4. Contenido de cenizas

El contenido de cenizas del quitosano, se determinó según el método descrito por Lees & Salguero (1982), con algunas modificaciones. Se pesaron 3 muestras de 2 g cada una de quitosano. Luego fueron carbonizadas e incineradas entre 550-570 °C durante 4 horas. Después fueron enfriadas y pesadas. Se incineraron por media hora más y se volvieron a pesar. Esto se repitió una vez más hasta que se observó peso constante. El porcentaje de cenizas se calculó según la Ecuación 12.

$$\text{Contenido de cenizas (\%)} = \frac{\text{Peso de cenizas}}{\text{Peso total}} * 100 \quad \text{.....} \quad \text{Ecuación 12}$$

3.3. Caracterización del humo líquido

Las caracterizaciones del humo líquido se realizaron mediante HPLC con detector UV-Vis a fin de determinar la concentración presente del benzo(a)pireno y, el contenido de ácidos carboxílicos totales, con el fin de conocer las propiedades y características químicas, así como la influencia que tendrían según las características en la aplicación para la conservación de filete de trucha.

3.3.1. Análisis del contenido de benzo (a) pireno por HPLC

El humo líquido fue analizado por cromatografía líquida de alta performance (HPLC) empleando un equipo Shimadzu modelo 20A con detector UV-Vis, modelo SPD-20A. El equipo contaba con muestreador automático SIL-20A y desgasificador DGU-20A5.

El análisis fue realizado mediante el método adaptado de Falcón (Falcón et al., 1996) y cuyas condiciones fueron: flujo 1 mL min⁻¹ de fase móvil, siendo esta agua: acetonitrilo (70:30) y 30 µL de muestra. Primero se realizó la curva de calibración considerando cinco puntos de concentración: 0.5, 1, 5, 10 y 20 mg L⁻¹ del Benzo (a) pireno en acetonitrilo (ACN) como solvente. Este análisis se realizó con el fin de descartar la presencia de uno de los hidrocarburos policíclicos aromáticos más representativos (benzo[a]pireno) y que es considerado como carcinogénico (Dewi et al., 2019).

3.3.2. Análisis de benzo[a]pireno por espectrofotometría UV-Vis

Se realizó la caracterización por espectrofotometría UV-Vis del humo líquido en acetonitrilo. Para ello se utilizó un espectrofotómetro marca Agilent Technologies modelo CARY 60 – UV-Vis. Se utilizaron celdas de cuarzo y se realizaron barridos desde los 800 hasta los 190 nm y se restó automáticamente el blanco acetonitrilo (ACN).

3.3.3. Determinación de ácidos carboxílicos totales

Para el análisis de ácido carboxílicos totales se siguió el método descrito por Saloko y colaboradores, con ciertas modificaciones (Saloko et al., 2014). Este procedimiento consistió en tomar 20 μ L de muestra de humo líquido y se disolvieron en una fiola de 100 mL con agua desionizada. Luego se realizó la valoración potenciométrica empleando un equipo medidor de pH y utilizando como agente valorante una solución de hidróxido de sodio 0.1 M. Se fue adicionando cada 20 μ L hasta alcanzar un pH cercano a 8.15. Por otro lado, 1 mL de solución de NaOH utilizada, fue equivalente a 60.05 mg de ácido acético.

3.4. Preparación de nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido

3.4.1. Diseño experimental

Para la preparación de las nanopartículas de quitosano con humo líquido, primero se establecieron las formulaciones obtenidas mediante el modelo de Box - Behnken del diseño experimental. Para ello, en la **Tabla 9** se muestra los intervalos de las concentraciones usadas en el diseño según el factor interviniente y en la **Tabla 10** todas las formulaciones obtenidas mediante el software estadístico Minitab 18.

Tabla 9

Factores en la superficie de respuesta múltiple utilizando el modelo de Box y Behnken para nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido.

Factores (unidad)	Niveles de factores de estudio
Concentración de ácido acético (mg mL ⁻¹)	2.4 – 9.6
Concentración del TPP (mg mL ⁻¹)	0.25 – 0.75
Concentración del Humo líquido (mg mL ⁻¹)	0.20 – 0.60
Concentración de quitosano (mg mL ⁻¹)	1.5 – 3.5

Tabla 10

Formulaciones obtenidas mediante el diseño experimental Box Behnken.

Orden de pruebas	ácido acético (mg mL ⁻¹)	TPP (mg mL ⁻¹)	Humo líquido (mg mL ⁻¹)	Quitosano (mg mL ⁻¹)
3	2.4	0.25	0.4	2.5
23	9.6	0.25	0.4	2.5
1	2.4	0.75	0.4	2.5
26	9.6	0.75	0.4	2.5
5	6	0.5	0.2	1.5
16	6	0.5	0.6	1.5
10	6	0.5	0.2	3.5
11	6	0.5	0.6	3.5
13	2.4	0.5	0.4	1.5
17	9.6	0.5	0.4	1.5
15	2.4	0.5	0.4	3.5
2	9.6	0.5	0.4	3.5
14	6	0.25	0.2	2.5
9	6	0.75	0.2	2.5
8	6	0.25	0.6	2.5
4	6	0.75	0.6	2.5
6	2.4	0.5	0.2	2.5
21	9.6	0.5	0.2	2.5
7	2.4	0.5	0.6	2.5
19	9.6	0.5	0.6	2.5
18	6	0.25	0.4	1.5
24	6	0.75	0.4	1.5
20	6	0.25	0.4	3.5
25	6	0.75	0.4	3.5
22	6	0.5	0.4	2.5
12	6	0.5	0.4	2.5

Del desarrollo de las 26 formulaciones se obtuvieron las condiciones para las nanopartículas con las características óptimas luego del desarrollo del diseño experimental y del análisis mediante software estadístico, se obtuvieron 4 nuevas formulaciones catalogadas como F'1, F'2, F'3, F'4, las cuales se muestran en la **Tabla 11**. Estas formulaciones fueron también preparadas y caracterizadas. Adicionalmente se realizó la preparación de una muestra denominada Blanco, es decir que no contiene humo líquido.

Tabla 11

Formulaciones catalogadas como óptimas después del diseño experimental Box-Behnken.

Solución	Ácido Acético (mg mL ⁻¹)	TPP (mg mL ⁻¹)	Humo Líquido (mg mL ⁻¹)	Quitosoano (mg mL ⁻¹)
F'1	2.400	0.250	0.600	1.500
F'2	2.418	0.250	0.583	1.500
F'3	2.415	0.250	0.547	1.500
F'4	2.414	0.250	0.539	1.500
Blanco	2.400	0.250	0.000	1.500

3.4.2. Preparación de la nanopartícula

La preparación de las nanopartículas (NP) se desarrolló en el instituto de química, UNESP por el método de Calvo y colaboradores (Calvo et al., 1997), con ciertas modificaciones. Primero, el quitosano grado alimentario fue secado durante 48 horas a 30 °C. Luego fue molido y tamizado para reducir el tamaño del material.

Por ejemplo, para la formulación 3 (F3), se pesaron 0.25 g de quitosano y se disolvieron en 100 mL de solución de ácido acético 2.4 mg mL⁻¹. Esta mezcla se dejó en agitación magnética durante 24 horas. Después la solución fue centrifugada durante 25 minutos a 4000 r.p.m. Luego del sobrenadante se tomaron 62.5 mL, los cuales fueron vertidos en un matraz Erlenmeyer de 250 mL de capacidad y se le añadieron 0.40 mg de humo líquido (o su equivalente en volumen). Esta solución de quitosano y humo líquido se puso en agitación magnética durante 1 hora, entre 200-300 r.p.m. Luego del tiempo indicado, se añadió gota a gota la solución de tripolifosfato de sodio de 0.25 mg mL⁻¹, la cual previamente se ajustó hasta pH 5 con ácido acético. Durante esta etapa la solución se mantuvo en agitación magnética entre 200-300 r.p.m. Después de añadido el tripolifosfato de sodio, se dejó por una hora más en agitación magnética entre 200-300 r.p.m. Finalmente, después de este tiempo, la solución fue centrifugada durante 25 minutos a 4000 r.p.m. y se tomaron los sobrenadantes

(primeros 10 mL de cada tubo de centrífuga de los 15 mL totales); los cuales fueron colectados en un tubo de 50 mL de capacidad., para los posteriores análisis correspondientes mediante DLS y potencial Z.

3.5. Caracterización de nanopartículas de quitosano

3.5.1. Determinación del diámetro hidrodinámico mediante DLS e índice de polidispersidad

Las pruebas preliminares sobre el tamaño de la partícula se llevó a cabo mediante DLS, realizadas en el equipo NanoBrook 90 Plus (Brookhaven Instruments) en GISMA – FC – UNI, mientras que de la etapa experimental las más óptima se realizó en un equipo Zetasizer de la marca Malver Intruments modelo Nano-ZS90, con láser de 633 nm y 90° de ángulo de dispersión del grupo de investigación INCT DATREM – UNESP, empleando celdas de plástico, las muestras fueron medidas sin ningún tratamiento previo, cada lectura se hizo por triplicado. El índice de polidispersidad fue obtenido directamente en cada lectura del tamaño de partícula mediante DLS.

3.5.2. Potencial Z

El potencial Zeta de las muestras fue medido empleando el mismo equipo que para el DLS; Zetasizer de la marca Malver Intruments modelo Nano-ZS90, considerando un tiempo de estabilización de 120 segundos. Cada lectura se hizo por triplicado.

3.5.3. Análisis por espectrofotometría de infrarrojo

Para este análisis se utilizó un equipo infrarrojo marca Bruker, la técnica fue por Reflectancia Total Atenuada (ATR). Para ello, las medidas fueron tomadas luego de realizar 64 barridos en el rango desde los 400 hasta los 4000 cm^{-1} . Las muestras de nanopartículas de quitosano, fueron secadas a 50 °C durante 6 horas, previo al análisis. Así mismo el quitosano de grado alimentario fue disuelto en ácido acético 2.4 mg mL^{-1} durante 24 horas y en agitación magnética, posteriormente se dejó secar en placas Petri a 50 °C. Las películas obtenidas fueron analizadas, así como también los insumos como el humo líquido, tripolifosfato de sodio y ácido acético.

3.5.4. Análisis por espectrofotometría UV-Vis

Las muestras fueron analizadas por espectrofotometría UV-Vis en el rango de 190-700 nm empleando celdas de cuarzo y un equipo marca Agilent Technologies modelo CARY 60 – UV-Vis. Se analizaron los insumos como el humo líquido y el quitosano.

3.5.5. Análisis por microscopía electrónica de barrido y EDS

Las muestras fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido para determinar las características morfológicas y análisis elemental por EDS. Se utilizó un equipo marca JEOL, modelo JSM-7500F. La energía aplicada para la microscopía electrónica fue de 2 keV, mientras que para el análisis de EDS, la energía fue de 10 keV. Las muestras recibieron el mismo tratamiento indicado para la espectrofotometría de infrarrojo descrito en la sección 3.5.3.

3.6. Determinación de la capacidad de carga y eficiencia de carga

Se determinó la capacidad de carga (% CC) y la eficiencia de carga (% EC) de las formulaciones óptimas de acuerdo con el método descrito por Deng et al., (2006), pero adaptado para nuestro sistema. Se secaron 25 mL de la dispersión de nanopartículas obtenidas, en vasos de precipitados limpios y secos, previamente pesados. Las muestras fueron colocadas en la estufa durante 48 horas a 50 °C. Luego se dejaron enfriar y se pesaron. Después, se le añadieron 25 mL de agua desionizada y se colocaron en agitación magnética durante 48 horas. Las soluciones obtenidas fueron medidas en el UV-Vis (UV-1700 PharmaSpec, marca Shimadzu) con el fin de determinar la cantidad de humo líquido que contenían. Previamente se realizó una curva de calibración de humo líquido mediante la misma técnica UV-Vis en agua desionizada y en el rango de concentración desde 0.5 mg mL⁻¹ hasta 0.0125 mg mL⁻¹.

La eficiencia de carga se define como la cantidad de principio activo contenido en las nanopartículas, dividido entre la cantidad de principio activo añadido. Mientras que la capacidad de carga se define como la cantidad de principio activo contenido en las nanopartículas, dividido entre la masa total de nanopartículas obtenidas (Haider et al., 2017). El cálculo se realizó mediante la Ecuación 13 y Ecuación 14.

$$\%EC = \frac{\text{Masa de humo liquido}}{\text{Masa de humo liquido añadido}} * 100 \quad \text{.....} \quad \text{Ecuación 13}$$

$$\%CC = \frac{\text{Masa de humo liquido cargado}}{\text{Masa de nanoparticulas obtenidas}} * 100 \quad \text{.....} \quad \text{Ecuación 14}$$

3.7. Estudio de liberación controlada de humo líquido cargado en nanopartículas de quitosano

Para la liberación controlada del humo líquido, capacidad de carga y eficiencia de carga se empleó el método descrito por Expósito (Expósito Harris, 2010), pero con algunas modificaciones. Se tomaron 10 mL de solución de nanopartículas preparadas, y fueron introducidas en una membrana de diálisis de 12 kDa. La membrana preparada fue introducida en un recipiente (chaqueta) que contenía 50 mL de agua desionizada, luego el sistema se puso en un agitador orbital (Marca WiseShake, modelo SHO-2D) a 100 rpm durante 24 horas y la temperatura fue controlada mediante un baño termostatzado (Marca DaiHan Scientific) a una temperatura de 4 °C similar a la temperatura de anaquel. El análisis del humo liberado fue realizado mediante espectrofotometría UV-Vis (Marca Shimadzu, modelo PharmaSpec UV-1700) a 271 nm, longitud de onda previamente determinada realizando un análisis espectral del humo líquido. Finalmente, se tomaron muestras en el tiempo 0, 10, 20, 30 minutos y luego cada 60 minutos hasta que la concentración se mantuvo constante en la chaqueta con agua desionizada.

3.8. Actividad biológica de las nanopartículas preparadas

3.8.1. Actividad antimicrobiana

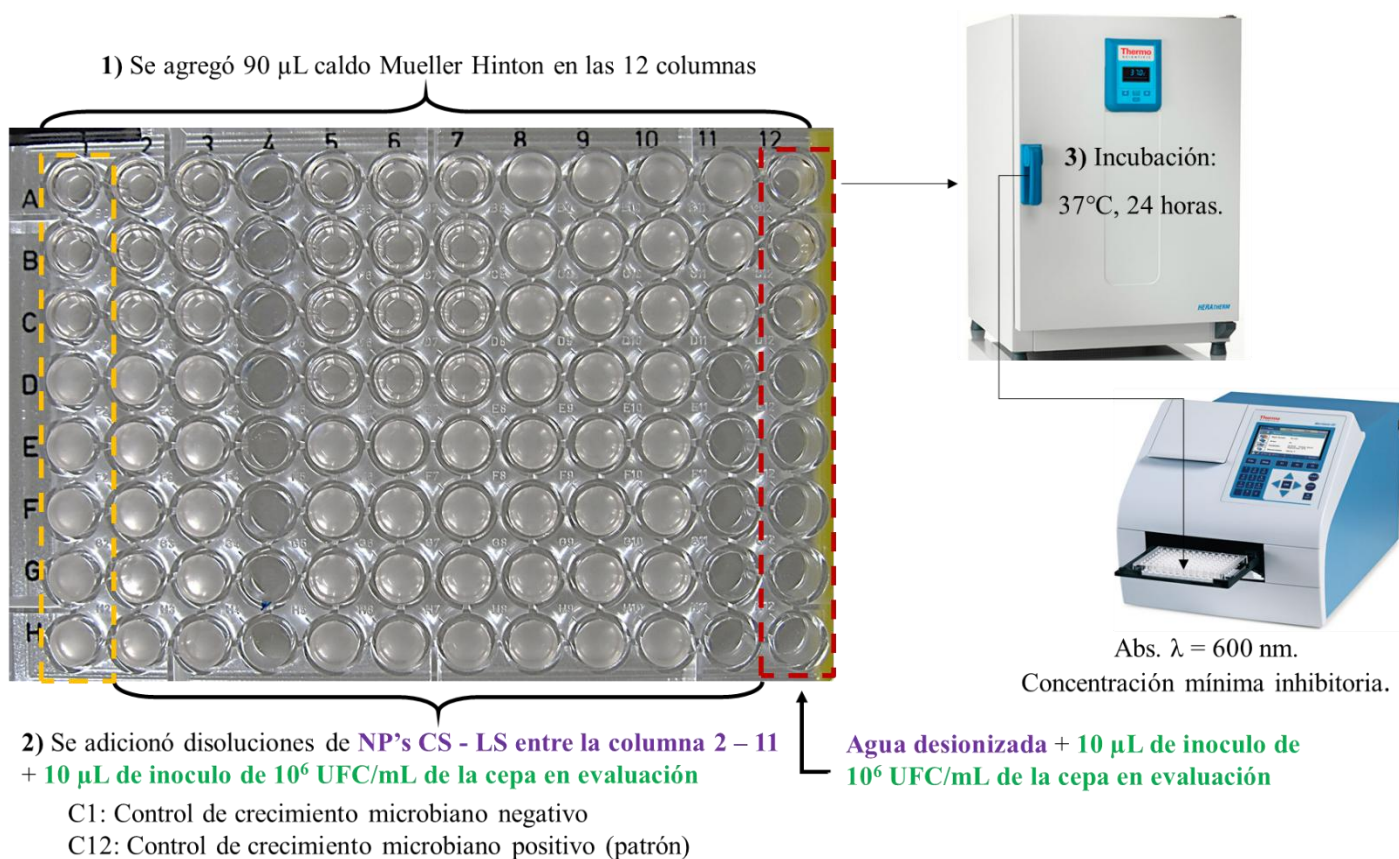
La capacidad antimicrobiana fue llevada a cabo en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad Nacional Agraria La Molina liderado por el Dr. Marcial Ibo Silva Jaimes, la cual se determinó por el método de la microdilución en caldo, tal como se muestra en la **Figura 14**.

Para esto, primero se llenó con 90 µL de caldo Mueller-Hilton en 12 columnas de 8 filas (96 pocillos en una placa). La primera columna como control de crecimiento microbiano negativo, debido a que solo presenta el caldo Mueller-Hilton. Luego, a la segunda columna, se le añadió 90 µL de las NP CS-LS y a partir de esta se realizó diluciones seriadas hasta la columna 11 y a la columna 12 solo 90 µL de agua desionizada. Posteriormente, se añadió 10 µL de inóculo de 10^6 UFC/mL de cada cepa desde la columna 2 hasta la 12, siendo la columna 12 el control de crecimiento microbiano positivo, es decir en esta columna se espera que las cepas proliferen libre de la acción de NP CS-LS. Las cepas usadas fueron *St. Aureus*, *Bacillus Cereus*, *E. coli* y *Salmonella*. Las 12 columnas se incubaron a 37 °C por 24 horas y se

determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) mediante espectrofotometría de su turbidez a 600 nm, siendo realizado las medidas por triplicado.

Figura 14

Esquema descriptivo del método de microdilución en caldo para determinar la actividad antimicrobiana.



3.8.2. Actividad antioxidante y determinación de fenoles totales

Las pruebas de actividad antioxidante y determinación de fenoles totales fueron realizadas en el equipo de investigación “Natural Resources Research” de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, liderado por el Dr. César Máximo Fuertes Ruitón. La determinación de la capacidad antioxidante de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido se realizó por dos métodos diferentes: ABTS y DPPH.

✓ **Método DPPH**

Para esta prueba, una solución del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) a concentración de 2 mmol L⁻¹ fue expuesta a las formulaciones de NP CS-LS (F'1-F'4), el blanco y el estándar de vitamina C como comparativo. Posteriormente, después de 30 min de reposo en oscuridad tras la incorporación de las muestras y el reactivo DPPH en la proporción de 1 a 2 respectivamente, se realizó la lectura espectrofotométrica a 517 nm. El % CRL (% de captación de radicales libre) fue calculado mediante la Ecuación 15:

$$\% \text{ CRL} = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{NP CS-LS}}}{A_{\text{DPPH}}} * 100 \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 15}$$

Donde: A_{DPPH} es la absorbancia del DPPH sin NP CS-LS y A_{NP CS-LS} la absorbancia de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido con DPPH.

✓ **Método ABTS**

Se utilizó como agente reactivo el radical ABTS (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico), el cual se preparó 24 horas previas al análisis, mediante la incorporación de persulfato de potasio 2.45 mmol L⁻¹ a 7 mmol L⁻¹ de ABTS neutro. Para la prueba se incorporó 100 µL de las formulaciones de NP CS-LS (F'1-F'4) y el blanco a 900 µL de radical libre ABTS preparado. La lectura espectrofotométrica se llevó a cabo a 734 nm, luego de 7 minutos de reacción. Se empleó como patrón el reactivo TROLOX. El % CRL (% de captación de radicales libre) fue calculado mediante la Ecuación 16:

$$\% \text{ CRL} = \frac{A_{\text{ABTS}} - A_{\text{NP'CS-LS}}}{A_{\text{ABTS}}} * 100 \quad \dots\dots\dots \text{Ecuación 16}$$

Donde: A_{ABTS} es la absorbancia del ABTS sin NP CS-LS y A_{NP CS-LS}, la absorbancia de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido con ABTS.

✓ **Cuantificación de fenoles totales**

Esta determinación se basó en el método de Folin Ciocalteu. Se utilizó 200 µL de una solución de ácido fosfomolibdico y fosfotungstico, 2mL de Na₂CO₃ al 2 % y 200 µL de las formulaciones de NP CS-LS (F'1-F'4). Esta mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente por 30 minutos para posterior lectura a 725 nm. Para el análisis se empleó como patrón estándar al ácido gálico.

3.9. Aplicación de las NP CS-LS en el filete de trucha

3.9.1. Recolección y tratamiento de las truchas

Se recolectaron truchas en su etapa comercial (aprox. 1 kg) de la Acuícola SHAGA, provincia de Oxapampa, región de Pasco siguiendo las buenas prácticas acuícolas. Luego, fueron escamadas y evisceradas de manera manual y fileteadas mediante un corte dorsal (aprox. 200 g); posteriormente fueron sumergidas en una solución desinfectante de dióxido de cloro 10 % (0.125 mol L^{-1}), a excepción de un filete el cual fue directamente empacado al vacío y denominado muestra “sin solución de limpieza”. Esta muestra se mantuvo congelada hasta su análisis.

El total de filetes desinfectados fueron separados en 6 grupos de 20, el primer grupo no fue tratado y fue etiquetado como “blanco”. Para el segundo grupo “QGA” (20 filetes): En cada bolsa de empacado al vacío fueron agregados 5 mL de QGA (Suspensión de nanopartículas de Quitosano de Grado Alimentario) para posteriormente introducir el filete de trucha fresca, luego se realizó el empaquetado y sellado al vacío, por último, los filetes empacados fueron conservados en una caja térmica de tecnopor con hielo en escamas, distribuido por capas. Este mismo procedimiento fue realizado también para los grupos restantes con etiquetado: QGQ (Nanopartículas de Quitosano de Grado Químico), QGA-LS (Nanopartículas de Quitosano de Grado Alimentario cargadas con Humo Líquido), QGQ-LS (Nanopartículas de Quitosano de Grado Químico cargadas con Humo Líquido) y LS (Solución de Humo Líquido). Las 6 cajas térmicas de tecnopor fueron selladas con film transparente para su traslado hacia Lima. Llegado a Lima, las muestras se mantuvieron en conservación a 4 °C hasta su traslado a la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM) para su análisis microbiológico.

3.9.2. Determinación de la estabilidad microbiológica

La estabilidad microbiológica en los filetes de trucha se realizó a través de los recuentos microbianos y por un periodo de 20 días con las matrices blanco, QGA, LS y QGA-LS. Así mismo, el análisis se llevó a cabo contra bacterias *aerobios mesófilas*, *E. coli*, *ácido lácticas* o *lactobacillus*, *Staphylococcus aureus* y *salmonella*; según indica la Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, los métodos de análisis se enuncian a continuación:

➤ **Metodología para las bacterias aerobio mesófilas.**

El análisis de recuento para las bacterias aerobio mesófilas se llevó a cabo usando el método AOAC 990.12 Petrifilm con algunas modificaciones.

➤ **Metodología para las bacterias *E. Coli*.**

El análisis para el recuento de las bacterias *E.Coli* se llevó a cabo usando el método AOAC 991.14 con algunas modificaciones.

➤ **Metodología para las bacterias ácido lácticas o *lactobacillus*.**

El análisis para el recuento de las bacterias ácido lácticas o *lactobacillus* se llevó a cabo usando el método horizontal para la enumeración de colonias de bacterias ácido lácticas mesófilas con algunas modificaciones, establecido en la ISO/FDIS 15214 (1998).

➤ **Metodología para las bacterias *Staphylococcus aureus*.**

El análisis para el recuento de las bacterias *Staphylococcus aureus* se llevó a cabo usando el método AOAC 2003.11 con placa 3M *petrifilm* y con algunas modificaciones.

➤ **Metodología para las bacterias *salmonella*.**

El análisis para el recuento de las bacterias *salmonella*, se llevó a cabo usando el método descrito en el Manual de Análisis Bacteriológico (BAM, capítulo 5, año 2023) con algunas modificaciones.

4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Caracterización de materia prima e insumos

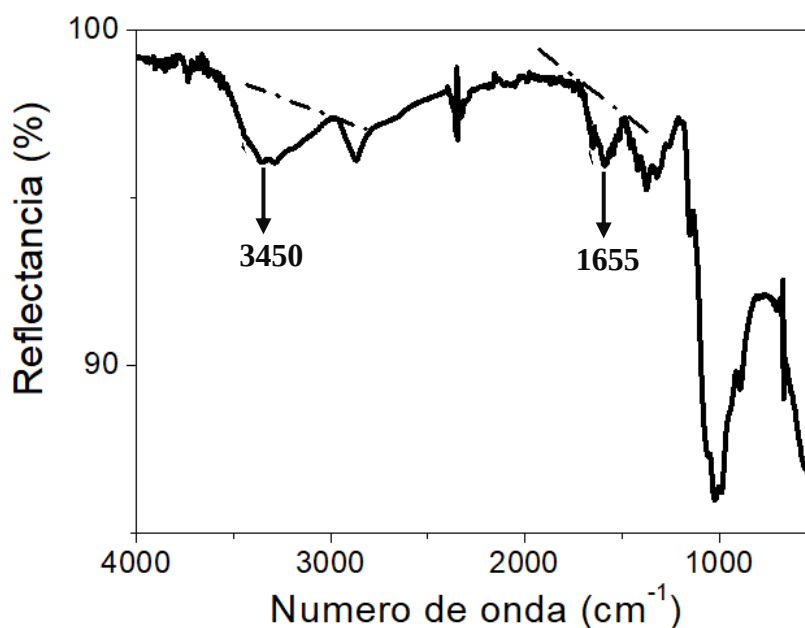
4.1.1. Caracterización de quitosano

✓ Grado de desacetilación por espectrofotometría FT-IR

En la **Figura 15**, se muestra el espectro infrarrojo para el quitosano de grado alimentario, donde se observa las dos bandas principales que permiten determinar el grado de desacetilación según el método de Baxter, Dillon, Taylor, et al., (1992). Estas señales fueron encontradas a 3450 cm^{-1} , atribuida al estiramiento de vibración simétrica del grupo hidroxilo (-OH) y a 1655 cm^{-1} , asociado a la vibración de estiramiento del grupo C=O en la amida I.

Figura 15

Espectro infrarrojo del quitosano grado alimentario obtenido por reflectancia difusa.



Las absorbancias correspondientes a las bandas de 1655 y 3450 cm^{-1} (C=O en la amida I y vibración de estiramiento del -OH, respectivamente), fueron 0.0945 y 0.2886, respectivamente. Por lo cual, aplicando la Ecuación 4, se obtuvo un 37.68 % de Acetilación, luego reemplazando en la Ecuación 5, se obtuvo un grado de desacetilación de 62.32 %. Además, se debe tener en cuenta que la precisión en el grado de desacetilación depende del método empleado para determinarlo ya que unos son más exactos que otros. Entre los métodos más conocidos, el método por análisis de infrarrojo es uno de lo más precisos y

rápidos en comparación al método convencional de potenciometría; el cual está limitado a la solubilidad del quitosano debido a que las partículas no disueltas pueden generar un mayor margen de error en el resultado (Weißpflog et al., 2021). Por otro lado, el grado de desacetilación del quitosano, es un factor muy importante ya que afecta directamente las propiedades fisicoquímicas (solubilidad, cristalinidad, etc.), además de sus propiedades biológicas, biodegradabilidad e incluso el grado de entrecruzamiento entre el polímero y algún agente entrecruzante (Gupta & Jabrail, 2006).

✓ **Determinación del peso molecular por viscosimetría.**

El peso molecular del quitosano, al igual que el grado de desacetilación, es otro de los factores importantes en la utilidad del biopolímero, ya que definen sus propiedades físicas y químicas como la capacidad de gelificación o solubilidad (Martín-lópez et al., 2020). En la **Tabla 12** se muestran las viscosidades relativas (rel), específica (sp) y reducida (red) obtenidas para cada solución preparada según el método viscosimétrico y cuya representación gráfica de la viscosidad reducida vs la concentración se presentan en la **Figura 16**.

Tabla 12

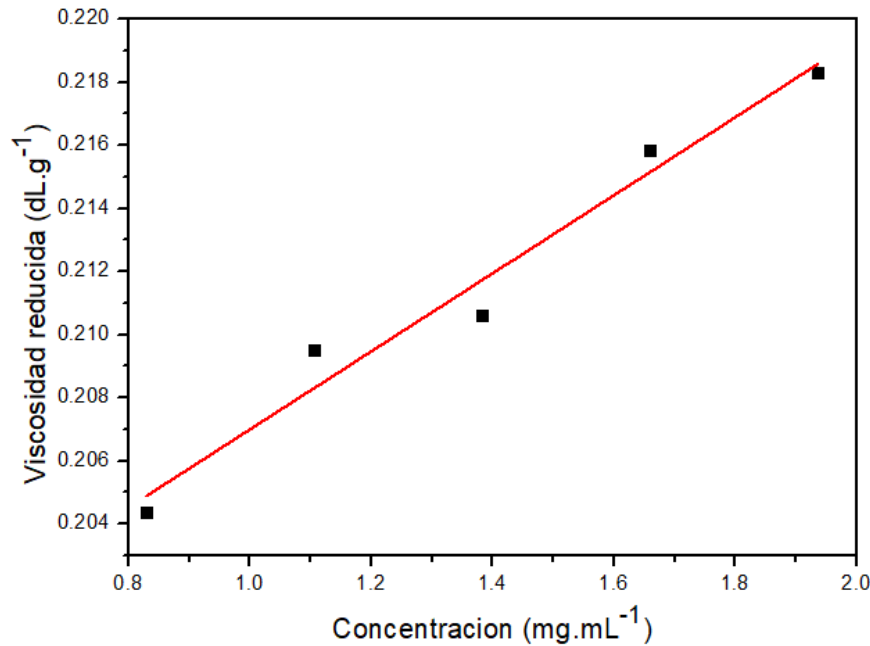
Viscosidad relativa (rel), específica (sp) y reducida (red) obtenidas en el ensayo.

ENSAYO	%	[η] rel	[η] sp	[η] red
1	0.83	1.170	0.170	0.204
2	1.11	1.232	0.232	0.210
3	1.38	1.291	0.291	0.211
4	1.66	1.358	0.358	0.216
5	1.94	1.423	0.423	0.218

Según la **Figura 16** y aplicando la Ecuación 6 de Mark-Houwink-Sakurada, se obtuvo que la viscosidad reducida fue de 0.1946, luego utilizando este resultado y los parámetros propios para el quitosano con $K = 15.7 \times 10^{-6}$ y $a = 0.79$, a 25 °C (ver anexo N°1); se determinó que el peso molecular del polímero fue de 151.82 kDa. Por lo tanto, podemos concluir que este quitosano es de bajo peso molecular (Hernández et al., 2011).

Figura 16

Viscosidad reducida vs concentración de quitosano a 25 °C.



✓ **Determinación del porcentaje de humedad y contenido de cenizas**

De los ensayos realizados, se determinó que el porcentaje de humedad del quitosano fue de 13.37 %; mientras que el contenido de ceniza fue de 4.34 %, valores consistentes con los reportados en la literatura para el quitosano comercial con una humedad entre 6 – 12% y contenido de cenizas menor 10 % (Ait Boulahsen et al., 2018; Alani et al., 2014). Sin embargo, estos valores son referenciales ya que dependen de las fuentes y métodos de extracción usados. El contenido de humedad y cenizas, son dos factores que influyen en las propiedades físicas y químicas del quitosano ya que definen su afinidad higroscópica, solubilidad y calidad, factor fundamental al momento de tener una aplicación (Alani et al., 2014). según Sreelekshmi et al. (2022), estos factores pueden afectar también las formulaciones sólidas como las nanopartículas basadas en quitosano o incluso disminuir su capacidad de enlace debido a la alta presencia de agua, así mismo puede influir en las caracterizaciones iniciales por FTIR si es que previamente no ha sido secada la muestra.

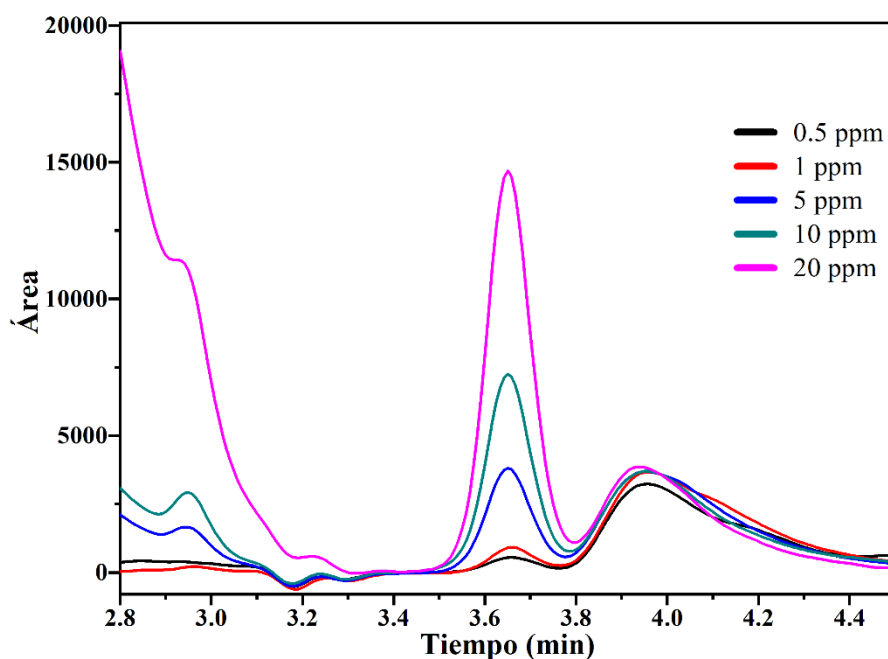
4.1.2. Caracterización del humo líquido

✓ Análisis de benzo(a)pireno por HPLC

La **Figura 17** muestra los resultados del cromatograma realizado para los estándares de Benzo(a)pireno en el rango de 0.5 ppm hasta 20 ppm.

Figura 17

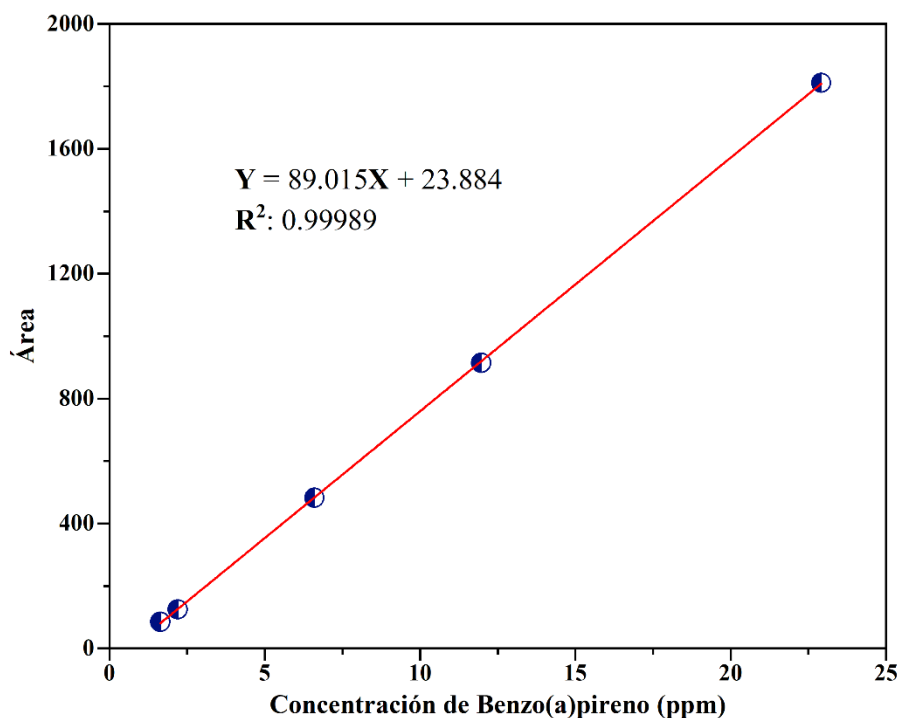
Cromatograma obtenido para la curva de calibración del benzo(a)pireno.



En la figura anterior se observó un claro incremento lineal de la señal en aproximadamente 3.65 minutos de tiempo de retención, siendo esta señal correspondiente al benzo[a]pireno. Por otro lado, la curva de regresión para este compuesto se obtuvo integrando las áreas del cromatograma mediante el software Origin y cuya gráfica correspondiente se muestra en la **Figura 18**.

Figura 18

Curva de calibración para el análisis de benzo[a]pireno por HPLC



La ecuación de regresión obtenida fue la Ecuación 17.

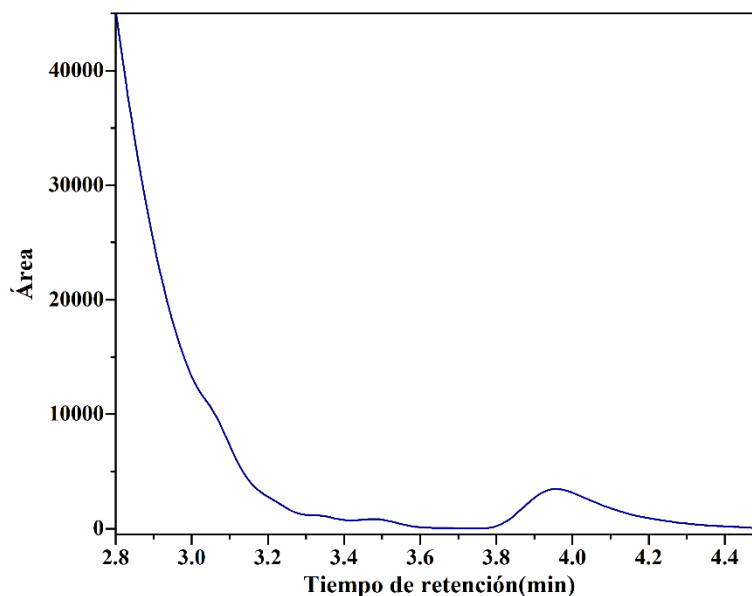
$$Y = 89.014X + 23.884 \quad \text{.....} \quad \text{Ecuación 17}$$

Donde Y es el área integrada y X la concentración de benzo[a]pireno en partes por millón (ppm).

La **Figura 19** representa el cromatograma de la muestra de humo líquido y como se puede observar no hay una señal en el tiempo de 3.65 minutos aproximadamente; por lo cual, se puede afirmar que el benzo[a]pireno, compuesto aromático con propiedades cancerígenas no está presente en el humo líquido. No obstante, este resultado es concordante con algunas referencias, las cuales indican que el humo líquido comercial no contiene cantidades significativas de HAPs entre ellos el benzo[a]pireno, debido a que se tiene un mejor control durante su proceso de obtención (Montazeri et al., 2013); sin embargo, no podemos descartar la presencia de otros tipos de HAPs.

Figura 19

Cromatograma obtenido del humo líquido a 10 ppm en acetonitrilo.



✓ **Análisis de humo líquido por UV-vis**

La **Figura 20** muestra los espectros obtenidos a diferentes niveles de concentración mediante espectrofotometría UV-Vis en solvente acetonitrilo (ACN) para el benzo[a]pireno. Por otro lado, la **Figura 21** muestra el espectro UV-Vis referencial del benzo[a]pireno, basado en datos de referencias, espectros y correlaciones empíricas (Xiong et al., 2021). Comparando ambos espectros podemos observar que en el rango entre 300 y 400 nm los espectros son muy parecidos. Por otro lado, entre los 200 y 300 nm se tienen una serie de bandas que se asocian a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ del sistema conjugado en los anillos fusionados del Benzo(a)pireno (Pretsch et al., 2009). Mientras que en el espectro de humo líquido no se observa presencia de picos en el mismo rango, lo cual indica que este no tiene benzo(a)pireno.

Figura 20

Espectros obtenidos por UV-Vis de benzo[a]pireno a distintas concentraciones (0.5; 1; 5; 10 y 20 ppm) y humo líquido (10 ppm).

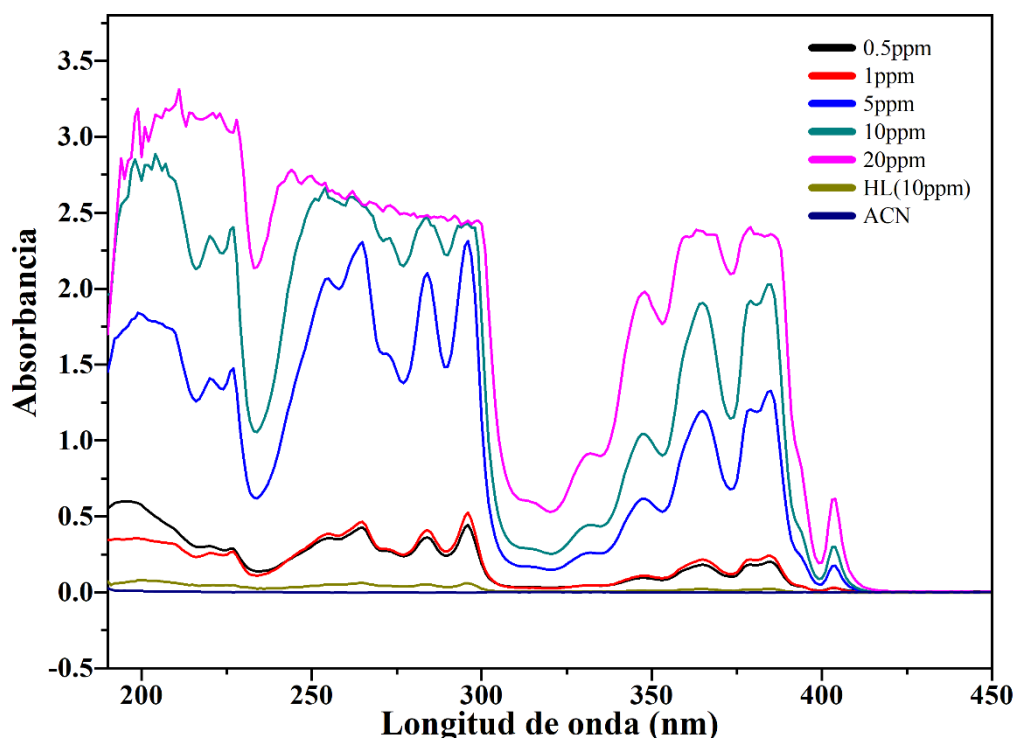
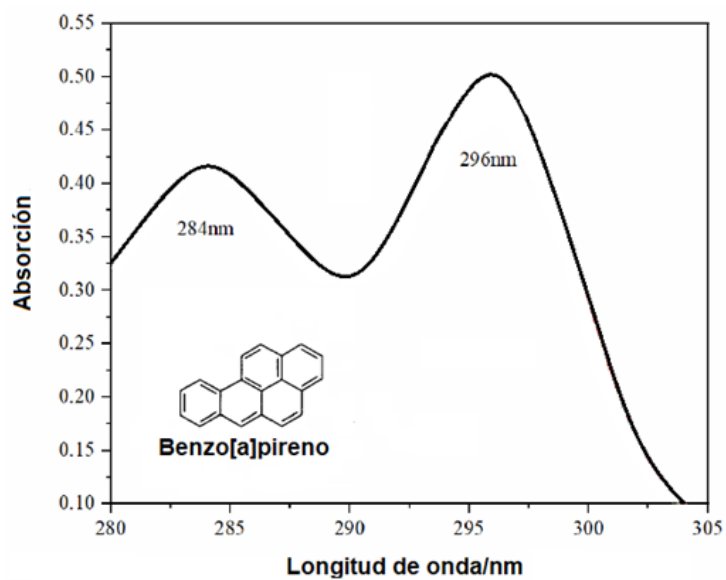


Figura 21

Espectro UV-Vis referencial del benzo(a)pireno.



Modificado de: (Xiong et al., 2021)

✓ **Determinación total de ácidos carboxílicos**

En la **Figura 22** se presenta la curva de la titulación potenciométrica del humo líquido y cuyo pH inicial para una solución (20 μL) diluida en 100 mL de agua desionizada, fue de 4.46, valor que se encuentra en el rango dado por (Montazeri et al., 2013), quien indica que el humo líquido puede estar en un rango entre 1.5 -5.5. Por otro lado, la **Figura 23** muestra la primera derivada de la titulación y de donde se observó que el punto de inflexión ocurrió cuando fueron añadidos 260 μL de la solución de hidróxido de sodio 0.1 mol L^{-1} . De la relación de 1 mL de NaOH 0.1 mol L^{-1} equivale a 60.06 mg de ácido acético, se tiene que la muestra contenía 15.62 mg de ácido acético en 20 μL de humo líquido. Por la tanto, la concentración será 781 mg mL^{-1} , lo que representa un 73.42% de acidez. Este valor es mayor a los valores reportados por otros investigadores, aunque también depende del tipo de madera de donde se obtiene el humo líquido (Montazeri et al., 2013).

Figura 22

Curva de titulación potenciométrica de una solución de humo líquido con 0.1 M de NaOH.

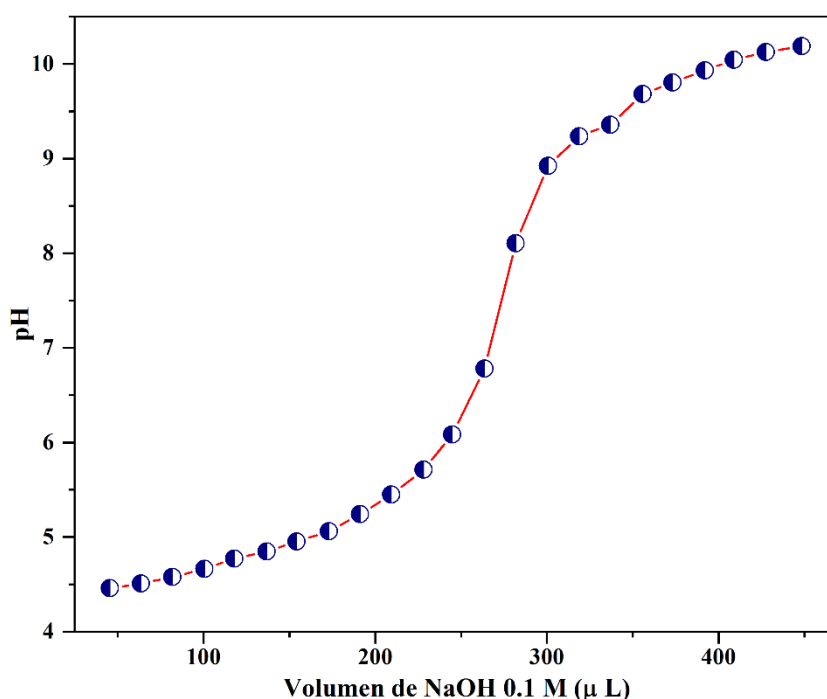
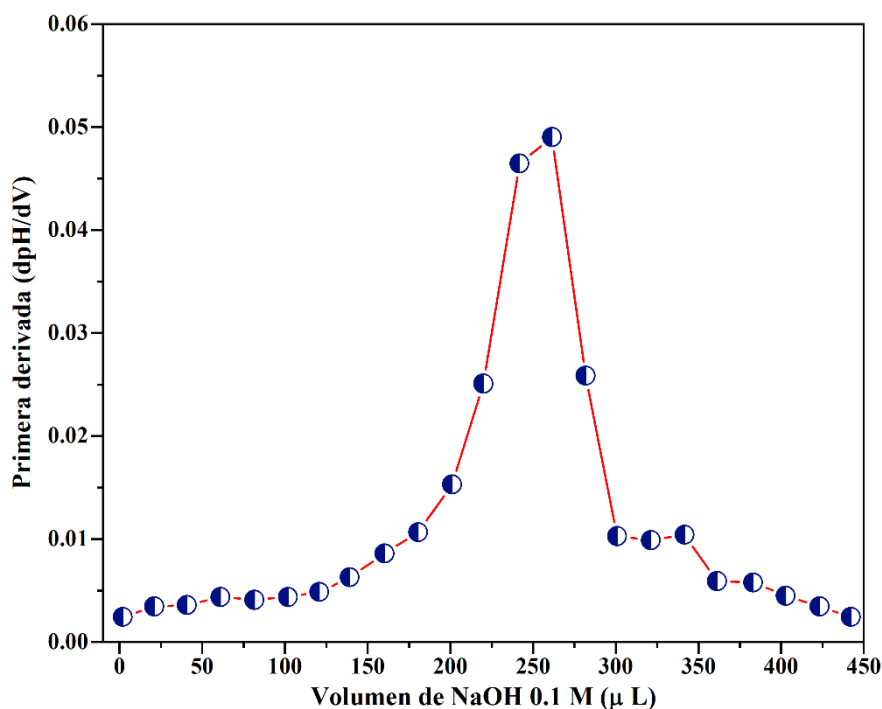


Figura 23

Primera de derivada de la curva de titulación potenciométrica de la solución de humo líquido con 0.1 M de NaOH.



4.2. Diseño experimental

Las variables independientes y los niveles utilizados en el análisis de superficie con respuesta múltiple, son mostrados en la **Tabla 9** y **Tabla 13**. Los factores y sus combinaciones fueron los siguientes: Factor X1 (concentración de ácido acético, mg mL^{-1}) para el ajuste de pH inicial; factor X2 (concentración de TPP, mg mL^{-1}); factor X3 (concentración de humo líquido, mg mL^{-1}); y factor X4 (concentración de quitosano, mg mL^{-1}). Las variables seleccionadas fueron las siguientes: Y1 (tamaño de partícula, nm), Y2 (potencial zeta, mV) e Y3 (PDI, %). Los valores obtenidos para Y1, Y2 e Y3 estuvieron en el siguiente rango: 165 – 370 nm, 33.8 – 45 mV y 0.24 a 0.60, respectivamente. Los resultados obtenidos de los 26 experimentos realizados se analizaron mediante el software Minitab versión 18 (2017). La **Tabla 14** presenta los resultados obtenidos para el análisis del tamaño de partícula, potencial Z e índice de polidispersidad para cada formulación analizada por triplicado y en relación a la concentración de ácido acético, TPP, LS y quitosano. Para determinar las variables significativas que afectan el tamaño de partícula, potencial zeta y el PDI, se estimaron los valores de R^2 , $p < 0.05$ (**Tabla 13**). La eficacia del modelo demostrado con el valor R^2 que indica si el ajuste, es adecuado cuando el valor es cercano a la unidad. Los valores de R^2 obtenidos según el modelo fueron

75.24 %, 83.43 % y 87.31 % para tamaño de partícula, potencial zeta y PDI respectivamente; estos valores indican que los datos experimentales y predichos están adecuadamente ajustados al modelo propuesto. Los resultados obtenidos del análisis ANOVA presentado en la **Tabla 13** mostraron que la variable respuesta Y1 es ajustado al modelo ya que $p < 0.05$, además que los factores X_1 , X_2 y X_4 juegan un rol importante debido a que $p < 0.05$. Por otro lado, respecto a Y2, se observó que las variables independientes X_2 y X_4 tienen influyen significativamente en el potencial Z; también que X_4 tiene un efecto cuadrático relevante, además del efecto interactivo entre X_2 y X_4 ($p < 0.05$). En el caso de Y3, se encontró lo siguiente: X_1 , X_2 y X_4 tienen efecto determinante simple, también que X_2 y su interacción con X_4 ($p < 0.05$). Los efectos de cada una de las variables antes mencionadas sobre el tamaño de partícula, potencial zeta y el PDI fueron descritas en la Ecuación 18, Ecuación 19 y Ecuación 20, respectivamente:

$$\begin{aligned}
 Y1 = & 157 + 8.4 X_1 - 85 X_2 - 24 X_3 + \\
 & 26 X_4 - 0.89 X_1 * X_1 + 133 X_2 * X_2 - \\
 & 282 X_3 * X_3 + 8.6 X_4 * X_4 - 14.2 X_1 * X_2 - \dots\dots\dots \text{Ecuación 18} \\
 & 6.4 X_1 * X_3 + 8.49 X_1 * X_4 + 351 X_2 * X_3 - \\
 & 95.0 X_2 * X_4 + 57 X_3 * X_4
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Y2 = & 38.76 - 0.135 X_1 - 22.6 X_2 + 18.0 X_3 + \\
 & 4.73 X_4 - 0.0759 X_1 * X_1 - 13.73 X_2 * X_2 - \\
 & 14.6 X_3 * X_3 - 1.308 X_4 * X_4 + 1.167 X_1 * X_2 + \dots\dots\dots \text{Ecuación 19} \\
 & 0.799 X_1 * X_3 + 0.118 X_1 * X_4 - 8.5 X_2 * X_3 + \\
 & 8.70 X_2 * X_4 - 2.50 X_3 * X_4
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 Y3 = & 0.382 + 0.0445 X_1 - 1.378 X_2 - 0.332 X_3 \\
 & + 0.210 X_4 - 0.00147 X_1 * X_1 \\
 & + 1.362 X_2 * X_2 - 0.072 X_3 * X_3 \\
 & - 0.0172 X_4 * X_4 - 0.0303 X_1 * X_2 \dots\dots\dots \text{Ecuación 20} \\
 & - 0.0118 X_1 * X_3 + 0.00590 X_1 \\
 & * X_4 + 0.845 X_2 * X_3 - 0.2430 X_2 \\
 & * X_4 - 0.003 X_3 * X_4
 \end{aligned}$$

Finalmente, con base en las tres ecuaciones de regresión para cada variable y con la minimización de Y1, Y3 y la maximización de Y2, se determinaron las condiciones óptimas de cada parámetro (variable independiente) para las formulaciones F' 1- F' 4 que se muestran en la **Tabla 13**. Estas formulaciones fueron preparadas, caracterizadas y evaluadas en términos de

su eficiencia de carga, capacidad de carga, actividad antioxidante, actividad antibacteriana y liberación controlada de LS (Tuesta-Chavez et al., 2022a).

Tabla 13

Datos ANOVA relacionados con los modelos de respuesta de todas las variables.

Diámetro de partícula (nm)				Potencial Z (mV)			PDI (%)		
Factor	df	F-valor	p-valor	df	F-valor	p-valor	df	F-valor	p-valor
Modelo	14	6.43	0.002	14	9.98	0.000	14	13.86	0.000
X1	1	8.12	0.016	1	2.66	0.131	1	41.97	0.000
X2	1	8.19	0.015	1	66.40	0.000	1	92.84	0.000
X3	1	0.27	0.616	1	0.12	0.736	1	0.54	0.477
X4	1	66.30	0.000	1	44.45	0.000	1	9.32	0.011
X1 ²	1	0.36	0.563	1	3.09	0.107	1	0.89	0.365
X2 ²	1	0.18	0.677	1	2.35	0.153	1	17.95	0.001
X3 ²	1	0.34	0.573	1	1.09	0.320	1	0.02	0.889
X4 ²	1	0.20	0.667	1	5.46	0.039	1	0.74	0.409
X1X2	1	0.40	0.542	1	3.23	0.100	1	1.69	0.221
X1X3	1	0.05	0.825	1	0.97	0.346	1	0.16	0.693
X1X4	1	2.27	0.160	1	0.53	0.482	1	1.03	0.333
X2X3	1	0.75	0.405	1	0.53	0.482	1	4.05	0.069
X2X4	1	1.37	0.266	1	13.84	0.003	1	8.38	0.015
X3X4	1	0.32	0.585	1	0.73	0.411	1	0.00	0.981
Lack of fit	10	0.11	0.987	10	300.60	0.045	10	0.23	0.938
Error	1			1			1		

4.3. Caracterización de las nanopartículas de quitosano con humo líquido

4.3.1. Análisis del diámetro de partícula, potencial Z e índice de polidispersidad

La **Tabla 14** muestra los resultados obtenidos para el análisis del tamaño de partícula, potencial Z y el índice de polidispersidad, así mismo cada formulación fue analizada por triplicado y para los cuales se obtuvieron las desviaciones estándar correspondientes. Luego del análisis estadístico correspondiente, donde se buscaron las condiciones óptimas que minimice el tamaño entre (150-200 nm), el PDI ($PDI < 0.30$) y se maximice el potencial Z ($> + 30$ mV); se obtuvieron 4 formulaciones (Denominadas F'1, F'2, F'3 y F'4). Los resultados al análisis del diámetro de partícula por DLS, potencial Z y PDI, además, de las 26 formulaciones preparadas cuyos valores de potencial Z resultaron ser mayores a +30 mV, indicando que estas presentan alta estabilidad.

Por otro lado, el índice de polidispersidad fue encontrado en el rango entre 0.251 y 0.65. De la **Tabla 14** se observó que las nanopartículas con menores tamaños (F5, F16 y F13) fueron aquellas donde la concentración de quitosano fue más baja. Además, la polidispersidad fue menor a 0.30, entonces puede considerarse que las nuestras son parcialmente homogéneas, además de estables debido a que tuvieron un potencial Z mayor a + 30 mV (Avadi et al., 2010).

Tabla 14

Resultados obtenidos para las formulaciones propuestas en el diseño experimental.

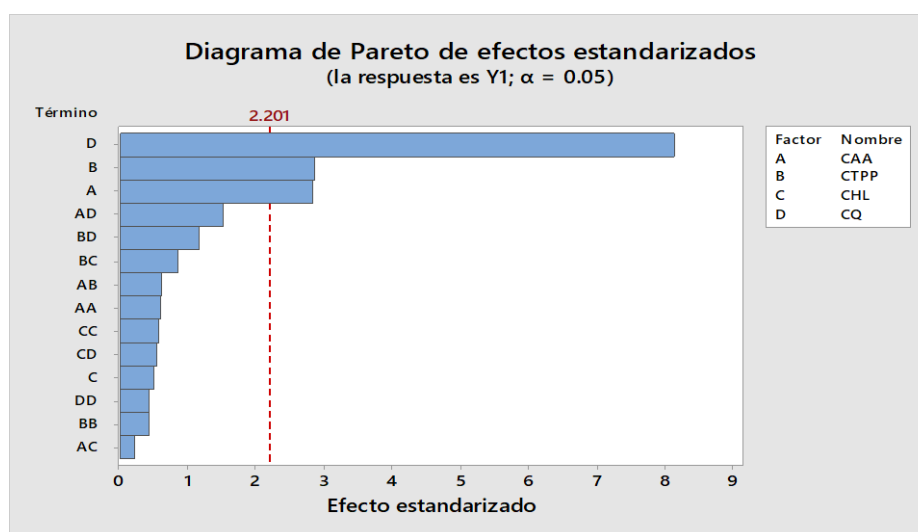
Formulación	Ácido acético (mg mL ⁻¹)	TPP (mg mL ⁻¹)	humo (mg mL ⁻¹)	Quitosano (mg mL ⁻¹)	Diámetro de partícula (nm)	Potencial Z (mV)	PDI
3	2.4	0.25	0.4	2.5	286.8 ± 8.3	43.0 ± 0.306	0.378 ± 0.008
23	9.6	0.25	0.4	2.5	360.9 ± 5.3	42.4 ± 3.20	0.621 ± 0.075
1	2.4	0.75	0.4	2.5	250.5 ± 1.5	36.1 ± 0.379	0.240 ± 0.010
26	9.6	0.75	0.4	2.5	273.7 ± 3.9	39.4 ± 1.14	0.374 ± 0.006
5	6.0	0.50	0.2	1.5	194.4 ± 3.8	37.5 ± 1.27	0.279 ± 0.004
16	6.0	0.50	0.6	1.5	165.0 ± 0.4	38.4 ± 0.651	0.271 ± 0.003
10	6.0	0.50	0.2	3.5	399.2 ± 9.4	43.1 ± 1.04	0.364 ± 0.005
11	6.0	0.50	0.6	3.5	415.4 ± 7.5	42.0 ± 0.781	0.354 ± 0.043
13	2.4	0.50	0.4	1.5	184.7 ± 2.4	37.6 ± 0.907	0.256 ± 0.009
17	9.6	0.50	0.4	1.5	224.6 ± 5.2	38.7 ± 0.917	0.358 ± 0.037
15	2.4	0.50	0.4	3.5	326.4 ± 5.1	41.2 ± 1.00	0.251 ± 0.019
2	9.6	0.50	0.4	3.5	488.6 ± 8.4	44.0 ± 2.80	0.438 ± 0.025
14	6.0	0.25	0.2	2.5	334.1 ± 13.7	42.8 ± 2.80	0.655 ± 0.058
9	6.0	0.75	0.2	2.5	243.6 ± 4.4	39.0 ± 0.833	0.294 ± 0.031
8	6.0	0.25	0.6	2.5	333.4 ± 7.9	44.3 ± 2.12	0.510 ± 0.082
4	6.0	0.75	0.6	2.5	313.2 ± 6.0	38.8 ± 2.17	0.318 ± 0.038
6	2.4	0.50	0.2	2.5	264.0 ± 5.0	42.6 ± 1.70	0.254 ± 0.012
21	9.6	0.50	0.2	2.5	323.6 ± 13.0	41.6 ± 2.75	0.409 ± 0.043
7	2.4	0.50	0.6	2.5	281.6 ± 3.3	41.6 ± 0.721	0.287 ± 0.012
19	9.6	0.50	0.6	2.5	322.8 ± 8.2	42.9 ± 1.79	0.408 ± 0.033
18	6.0	0.25	0.4	1.5	285.2 ± 15.9	44.9 ± 3.39	0.434 ± 0.024
24	6.0	0.75	0.4	1.5	248.7 ± 4.9	33.8 ± 0.451	0.324 ± 0.034
20	6.0	0.25	0.4	3.5	474.3 ± 23.4	45.0 ± 1.27	0.656 ± 0.042
25	6.0	0.75	0.4	3.5	342.8 ± 10.3	42.6 ± 1.29	0.303 ± 0.031
22	6.0	0.50	0.4	2.5	242.9 ± 3.1	42.8 ± 2.18	0.299 ± 0.038
12	6.0	0.50	0.4	2.5	374.5 ± 2.0	42.9 ± 3.35	0.408 ± 0.035

Por otra parte, los resultados mostrados en la **Tabla 14** fueron analizados mediante el software Minitab 18, esto a fin de conocer los principales factores que afectan directamente las características fisicoquímicas de las nanopartículas que se desean obtener con mejores

proyecciones de aplicación. Los factores evaluados fueron: Factor A (concentración de ácido acético, CAA); factor B (concentración de TPP, CTPP); factor C (concentración de humo líquido, CHL) y factor D (concentración de quitosano, CQ). Mientras que las respuestas evaluadas fueron tamaño de partícula (Y1), potencial Z (Y2) e índice de polidispersidad (Y3). Del diagrama de Pareto mostrado en la **Figura 24**, a un nivel de confianza del 95 %, se observó que tanto la concentración de quitosano (CQ), de TPP (CTPP) y la concentración de ácido acético (CAA) son las principales variables independientes que influyen directamente en el tamaño de la nanopartícula ya que superan el límite estadístico crítico del efecto estandarizado. Además, esto se asocia a las interacciones químicas generadas entre ellos, sobre todo entre el TPP que va generando redes a causa de la reticulación química con el quitosano y de forma similar con el ácido acético que presenta grupos carboxílicos que generan interacciones hidrógeno. No obstante, el resultado contrasta lo encontrado también en el Anova del diseño experimental y su influencia significativa en la variable respuesta.

Figura 24

Diagrama de Pareto sobre variables que afectan el tamaño de partícula (Y1).

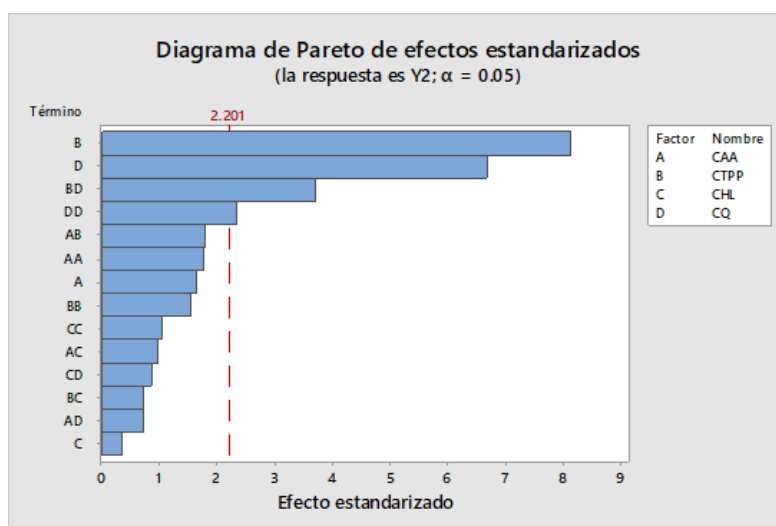


En la **Figura 25** se observa que a un nivel de confianza de 95 %, la concentración de TPP (CTPP), la concentración de quitosano (CQ) y la interacción de estas dos variables independientes influyen significativamente en el potencial Z de las nanopartículas preparadas. Esto se asocia a la carga iónica que tanto el TPP y el quitosano poseen, lo cual puede estar generando variación en la carga superficial de las nanopartículas y por lo tanto, dando lugar a que se obtenga diferente potencial Z para cada formulación con variación en

la concentración de las dos variables. No obstante, los resultados al igual que en el tamaño hidrónico de la partícula corresponden con lo antes encontrado en el Anova del diseño experimental.

Figura 25

Diagrama de Pareto sobre variables que afectan el potencial Z (Y2).



En la **Figura 26** se observa que la concentración de TPP (CTPP), la concentración de quitosano (CQ) y la interacción de estos dos factores también influyen sobre el índice de polidispersidad de las nanopartículas. Esto es asociado a las interacciones electrostáticas que se dan entre los grupos del TPP y CQ, además de las interacciones puente hidrógeno producidas en el mismo quitosano a través de los grupos hidroxilo, carbonilo y aminos; lo cual al incrementar sus concentraciones podrían generar que las nanopartículas interaccionen más fuertemente dando lugar a que se puedan aglomerar y se obtengan partículas de diferente tamaño y polidispersidad. Por otro lado, la **Tabla 15** muestra los valores buscados respecto a las respuestas en el proceso de optimización: La minimización del tamaño de nanopartícula (Y1), la maximización del potencial Z (Y2) y la minimización del índice de polidispersidad (Y3).

Figura 26

Diagrama de pareto sobre variables que afectan el índice de polidispersidad (Y3).

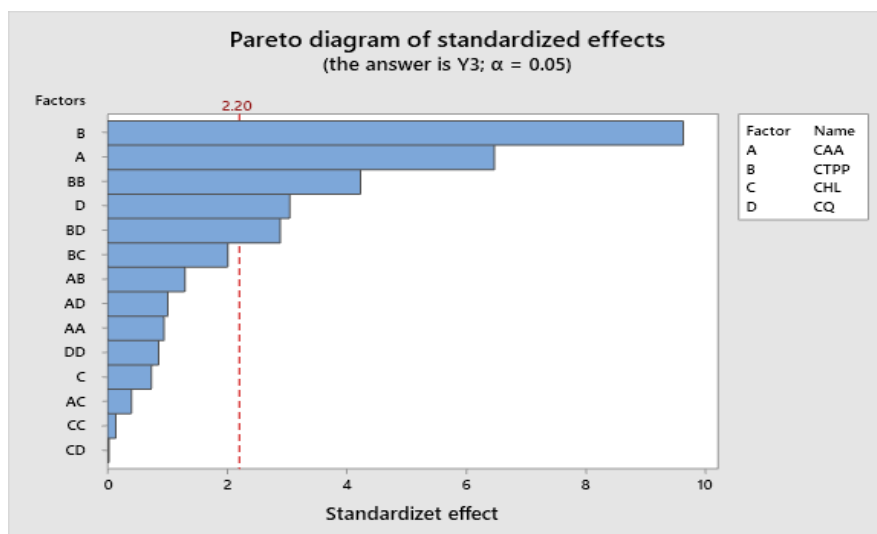


Tabla 15

Valores buscados en la optimización de las respuestas tamaño de nanopartícula (Y1), potencial Z (Y2) e índice de polidispersidad (Y3).

Respuesta	Meta	Inferior	Objetivo	Superior	Ponderación	Importancia
Y3	Mínimo		0.24	0.6	1	1
Y2	Máximo	33.8	45.00		1	1
Y1	Mínimo		165.00	370.0	1	1

En la **Tabla 16**, se presentan los resultados obtenidos luego del proceso de optimización, observándose un claro incremento en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas cargadas con humo líquido, en comparación a las nanopartículas sin cargar (177.9 nm). Resultados correspondientes con lo reportado por Lamarra y colaboradores, quienes luego de cargar ácido gálico en nanopartículas de quitosano obtuvieron partículas con diámetros hidrodinámicos alrededor de 140 nm, pero con potencial Z cercano +25 mV (Lamarra et al., 2016). Por lo tanto, podemos considerar al ácido gálico como un modelo de polifenol introducido en nuestra matriz, ya que es conocido que el humo líquido contiene una mezcla de polifenoles y otros compuestos orgánicos (Montazeri et al., 2013). Por otro lado, a partir de los potenciales Z encontrados (+ 40 mV), se puede considerar que las

nanopartículas son altamente estables, aunque con cierto grado de polidispersidad por debajo de 0.5 (Avadi et al., 2010).

Tabla 16

Resultados obtenidos para las formulaciones consideradas óptimas.

Orden de pruebas	Ácido acético (mg mL ⁻¹)	TPP (mg mL ⁻¹)	humo líquido (mg mL ⁻¹)	Quitosano (mg mL ⁻¹)	Diámetro de partícula (nm)	Potencial Z (mV)	PDI
F'1	2.400	0.25	0.600	1.5	186.0 ± 3.7	43.8 ± 1.79	0.367 ± 0.011
F'2	2.418	0.25	0.583	1.5	204.9 ± 5.2	45.2 ± 2.36	0.399 ± 0.051
F'3	2.415	0.25	0.547	1.5	180.3 ± 5.2	43.0 ± 1.70	0.452 ± 0.075
F'4	2.414	0.25	0.539	1.5	221.5 ± 9.4	43.5 ± 0.95	0.451 ± 0.070
Blanco	2.400	0.25	0.00	1.5	177.9 ± 3.1	47.6 ± 1.74	0.400 ± 0.027

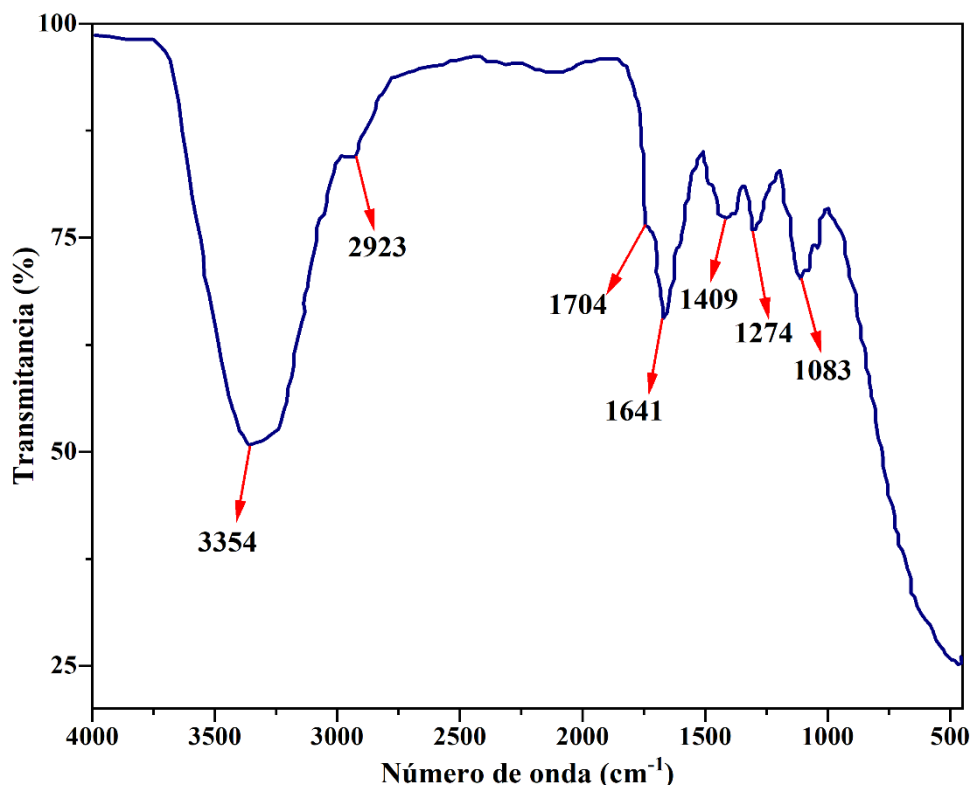
4.3.2. Análisis por espectrofotometría de infrarrojo

✓ Análisis de humo líquido

En el espectro infrarrojo del humo líquido (LS) mostrado en la **Figura 27**, se encontraron señales características en 3354 cm⁻¹, atribuido tanto a una contribución del medio acuoso, así como a la presencia de grupos fenólicos y asociada a la vibración de estiramiento de los grupos -OH tanto en los ácidos carboxílicos como fenoles (Guillén et al., 1995). Por otra parte, el pico alrededor de 2923 cm⁻¹ es consecuencia de las vibraciones de estiramiento asimétrico del C-H en los compuestos aromáticos y cadenas alifáticas (Antoniou et al., 2015a). La banda ancha débil en 1704 cm⁻¹, es correspondiente con la vibración de estiramiento del carbonilo (C=O), función de las cetonas, aldehídos u ácidos carboxílicos presentes en los compuestos del LS. Por otro lado, la señal intensa observada en 1641 cm⁻¹ es atribuido a las vibraciones de estiramiento asimétrico del C=C en los alquenos y probablemente también debido a compuestos aromáticos. Las bandas encontradas en 1409, 1274 y 1083 cm⁻¹, son consecuencia de las vibraciones de deformación del C-H en los alcanos, deformación dentro del plano del O-H en alcoholes primarios y secundarios y la vibración de estiramiento del grupo C-O en alcoholes primarios, respectivamente (Sokamte tegang et al., 2020b; Suryani et al., 2023). Por otra parte, según Guillen, entre 900 cm⁻¹ y 800 cm⁻¹, también absorben fuertemente compuestos aromáticos como 2-metoxi-4-etilfenol, 2-metoxi-4-(2-propenil) fenol, entre otros (Guillén et al., 1995).

Figura 27

Espectro Infrarrojo del Humo líquido concentrado en solución

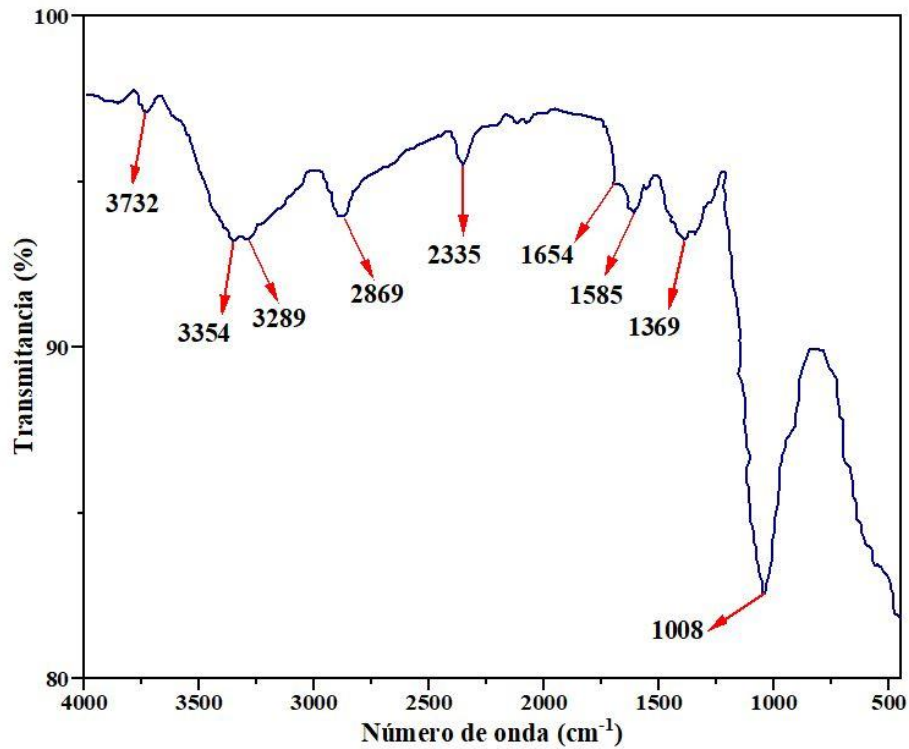


✓ **Análisis de quitosano**

La **Figura 28** muestra el espectro infrarrojo (IR) del quitosano de grado alimentario mediante la técnica de ATR. Esta técnica fue elegida por la rapidez con la que se puede desarrollar el análisis, además por no requerir otros reactivos o diluyentes como el KBr. El IR mostro dos señales características en 3354 y 3289 cm^{-1} , correspondiente con las vibraciones de estiramiento de los grupos hidroxilo y aminos, respectivamente (Ma et al., 2015; S. Dassanayake et al., 2019). El pico en 2869 cm^{-1} fue atribuido a la vibración de estiramiento simétrico y asimétrico del C-H en los grupos $-\text{CH}_2-$ y $-\text{CH}_3$ (Antoniou et al., 2015b; Ma et al., 2015). Por otro lado, fue identificada una banda ancha débil en 1654 cm^{-1} , atribuido a la vibración del grupo carbonilo (C=O) en la amida I, indicando que el quitosano no está completamente desacetilado. Así mismo el pico en 1585 cm^{-1} fue asociado a la vibración de estiramiento en la amida II. Por último, las bandas en 1369 y 1008 cm^{-1} representan las vibraciones de estiramiento del C-O en el alcohol primario y del enlace en el polisacárido, respectivamente (Alarfaj, 2019; Boudouaia et al., 2019).

Figura 28

Espectro infrarrojo del quitosano grado alimentario, previamente secado. Método por ATR.



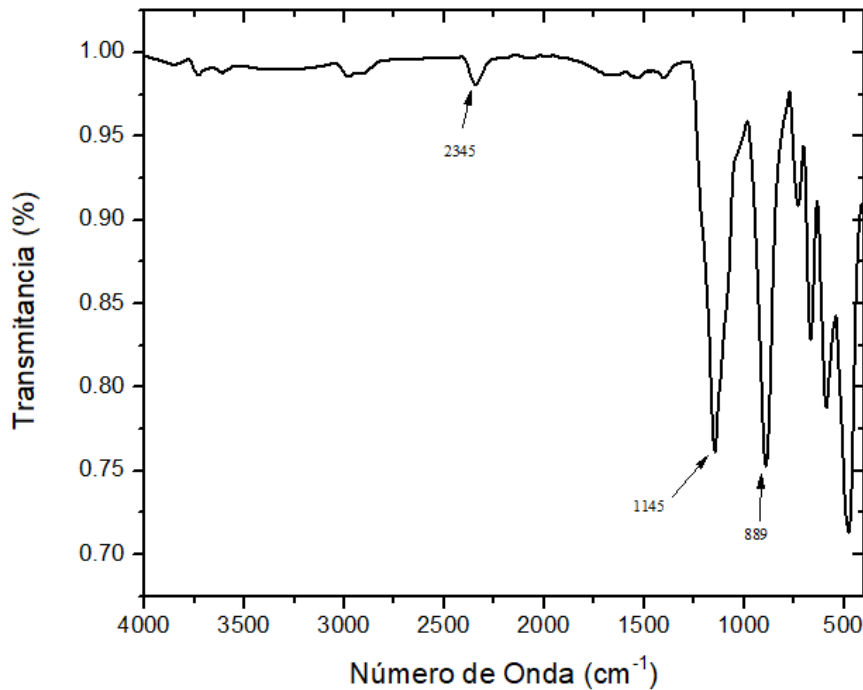
✓ **Análisis de tripolifosfato de sodio**

La **Figura 29** presenta el espectro infrarrojo del TPP, con dos señales características en 1145 y 889 cm^{-1} , correspondiente con la vibración de estiramiento simétrica y antisimétrica de O-P=O y del estiramiento antisimétrico del P-O-P , respectivamente (Lamarra et al., 2016; Loutfy et al., 2016; Tomaz et al., 2018).

Figura 29

Espectro infrarrojo del tripolifosfato de sodio. Método por ATR.

Muestra sólida.



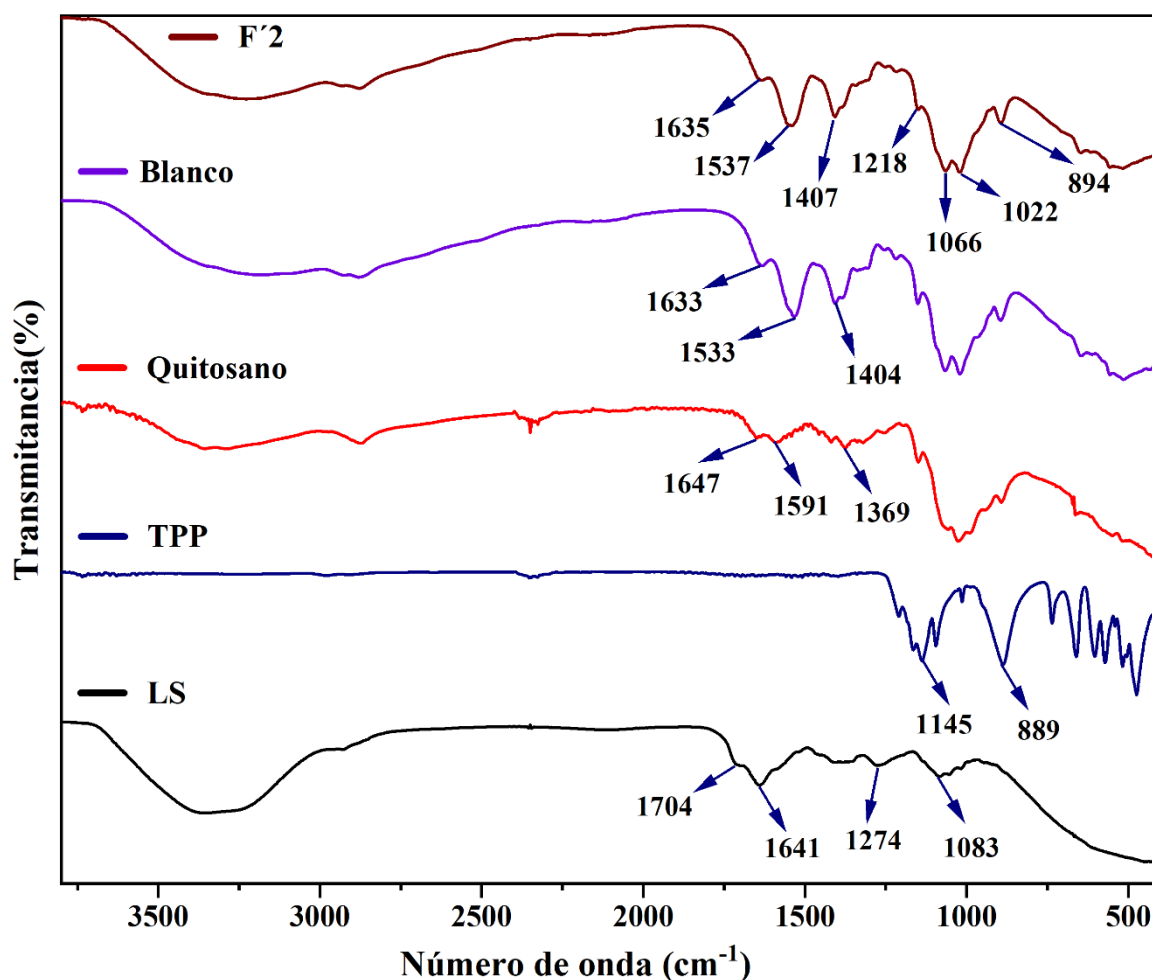
✓ **Análisis de nanopartículas cargadas con humo líquido**

En la **Figura 30** se muestra el espectro IR de las nanopartículas de quitosano, las cuales fueron previamente secadas a 50 °C antes de ser analizadas. El espectro infrarrojo mostró bandas características, propias del quitosano en 1647, 1591 y 1369 cm^{-1} atribuidas a las vibraciones de estiramiento del C=O en la amida I, a la flexión del N-H en la amida II y el estiramiento en el C-O del alcohol primario. No obstante, comparado con el espectro IR de las nanopartículas de quitosano sin carga de humo líquido (Blanco), se observó un incremento en la intensidad y un drástico desplazamiento de las bandas a 1633 cm^{-1} en la amida I, a 1533 cm^{-1} en la amida II y a 1404 cm^{-1} , respectivamente. Así mismo, fue observado la aparición de una nueva banda en 1218 cm^{-1} atribuida a las vibraciones de estiramiento asimétrico del grupo PO_2 en el TPP. Por lo tanto, estas observaciones encontradas indican las interacciones producidas entre los grupos aniónicos del TPP con los grupos aminos protonados del quitosano a través de enlaces iónicos, resultados que concuerdan con los reportados en la literatura (Alehosseini et al., 2022b; Loutfy et al., 2016; Tomaz et al., 2018). Por otro lado, en las nanopartículas cargadas con humo líquido, F'2, fue identificada una banda alrededor de 1635 cm^{-1} , atribuido a la vibración de estiramiento en la amida I, también fueron encontrados los picos en 1537, 1407 y 1218 cm^{-1} , señales que concuerdan con las

observadas en las nanopartículas sin carga. Sin embargo, sus intensidades aumentan, lo cual se asocia a las interacciones que ocurre entre los componentes del humo líquido (fenoles, carbonilos, ácidos carboxílicos, etc.) con la matriz de quitosano (Chanphai & Tajmir-Riahi, 2018). Similares resultados fueron observados para las otras nanopartículas cargadas con humo líquido (F'1, F'3 y F'4), lo cual sugiere que este se encuentra únicamente encapsulado en las nanopartículas, mediante interacciones débiles tales como las fuerzas de Vander Waals, puente hidrogeno, entre otras. Por último, la banda en 3338 cm^{-1} fue asociada a la vibración de estiramiento de los grupos amino libres en el quitosano y los hidroxilo (-OH), mientras que el desplazamiento e incremento de la señal en los materiales nanoparticulados fue asociado con las interacciones de los grupos amino y la adición de grupos -OH del humo líquido, que dan origen a la formación de interacciones tipo puente de hidrógeno (Lamarra et al., 2016). La banda en 894 cm^{-1} fue atribuida al estiramiento asimétrico del P-O-P en el TPP.

Figura 30

Espectros infrarrojos de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido: Formulación óptima, LS, blanco, quitosano y TPP. Método por ATR.



4.3.3. Análisis por microscopía electrónica de barrido

En la **Tabla 17** se observa que la muestra denominada blanco; es decir, las nanopartículas que no contienen humo líquido, son las de menor diámetro. Por el contrario, la muestra F'1 fue la que presentó mayor diámetro; lo cual puede deberse a la mayor concentración de humo líquido. Sin embargo, las 4 formulaciones presentan una elevada desviación estándar, lo cual concuerda con el índice de polidispersidad encontrado mediante el análisis por DLS.

Tabla 17

Tamaño de partícula obtenido a partir de la microscopía electrónica de barrido.

Muestra	Diámetro (nm)
NP – Sin Humo Líquido	18 ± 7.2
F'1	200.6 ± 46.8
F'2	77.0 ± 27.3
F'3	22.4 ± 8.2
F'4	30.2 ± 11.4

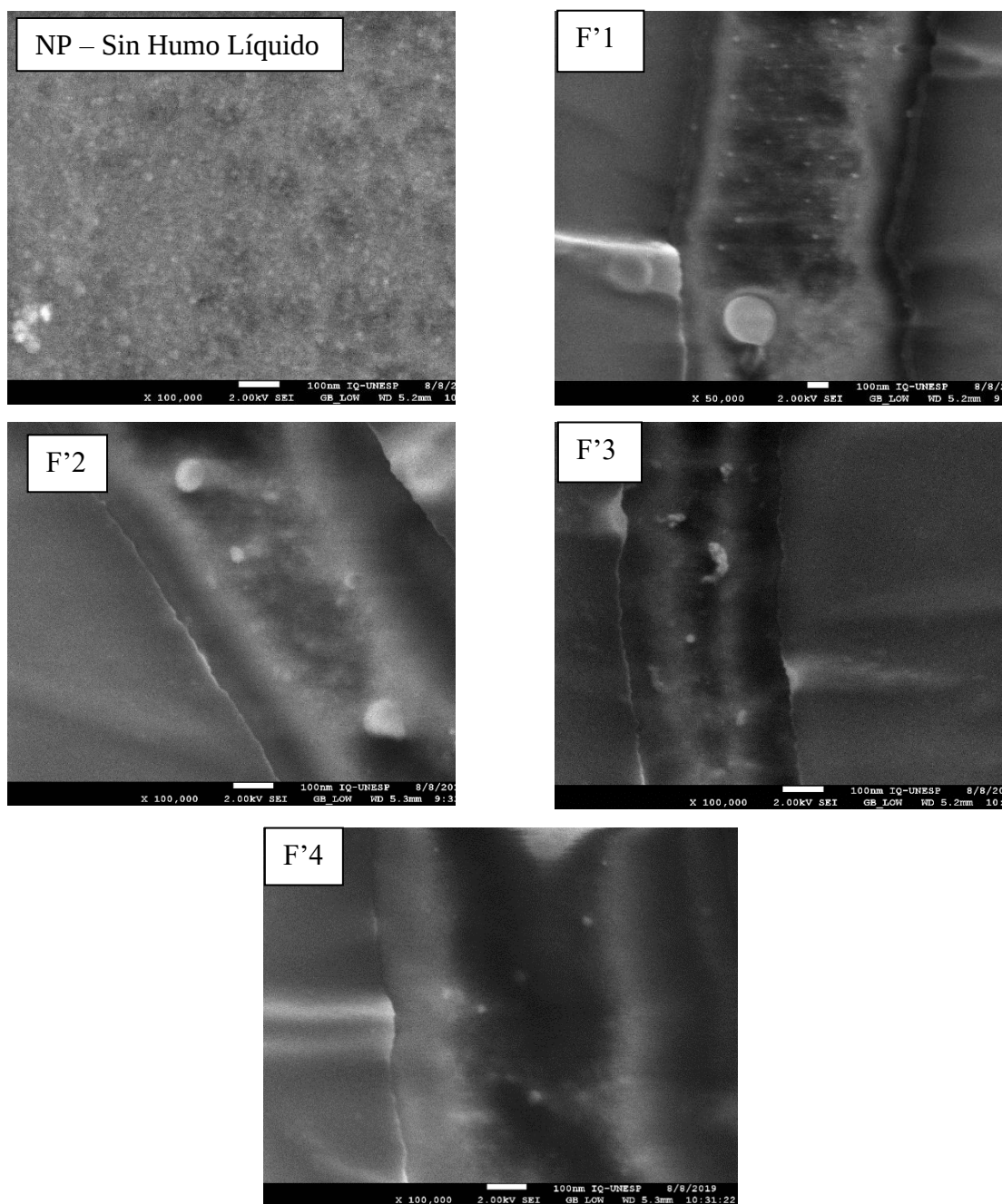
El análisis SEM, **Figura 31**, mostró que las nanopartículas obtenidas presentan una morfología esférica. No obstante, la diferencia entre los resultados respecto al análisis por DLS puede deberse al tratamiento térmico de secado a 50 °C previo al análisis por microscopía SEM, lo cual estaría causando que las nanopartículas se deshidraten y se contraigan, reduciendo así notablemente su tamaño. Sin embargo, en ambos casos se obtuvieron resultados menores a 200 nm. Por otro lado, el índice de polidispersidad está relacionado con la desviación estándar, ya que si es grande significa que las muestras preparadas presentan elevada polidispersidad. Por otro lado, el tamaño de las nanopartículas obtenidas está relacionado con la cantidad de grupos amino que fueron entrecruzados; ya que, se han reportado que para nanopartículas de 30 nm solo un 10 % de grupos amino de la cadena polimérica son entrecruzados mientras que para nanopartículas con 110 nm, casi todos los grupos amino son entrecruzados (Shukla et al., 2013).

También se debe tener en cuenta que los factores físicos como la velocidad de agitación pueden afectar el tamaño de las nanopartículas obtenidas. Según, Fàbregas y colaboradores encontraron que la velocidad de agitación influye en el tamaño de las nanopartículas de quitosano (Fàbregas et al., 2013). Así mismo, la concentración de ácido acético también puede jugar un papel importante. En otras palabras, al incrementar la concentración de este, se incrementará indirectamente la fuerza iónica del medio haciendo

que la cadena de quitosano se moviliice con menos libertad. Además, que los contraiones que están enlazados a los grupos amino desfavorezcan los sitios disponibles para su entrecruzamiento. Por otro lado, un incremento en el tamaño de las nanopartículas, hará que la repulsión sea menor y permitirá que se formen agregados más grandes (W. Fan et al., 2012). Los resultados obtenidos de la microscopía electrónica de barrido se muestran a continuación en la **Figura 31**.

Figura 31

Micrografía SEM para las muestras optimizadas F'1 hasta F'4 y el blanco.

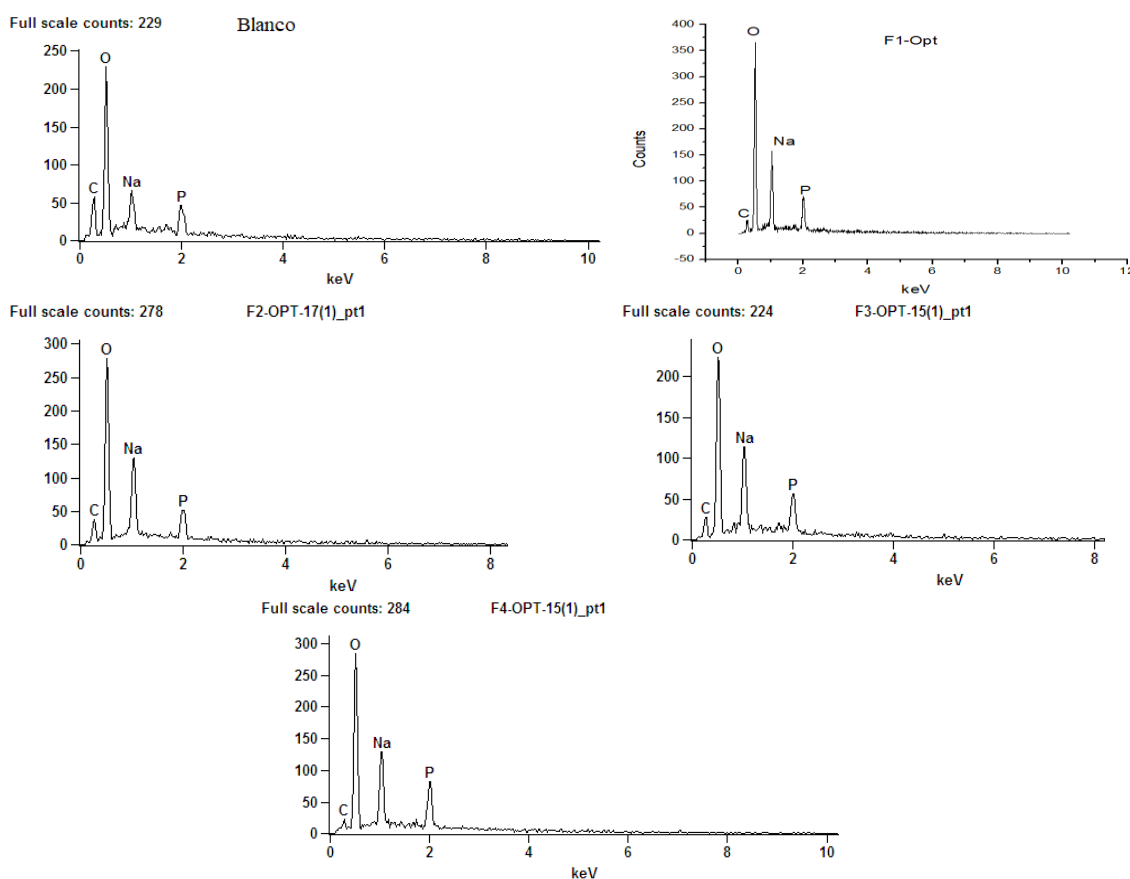


4.3.4. Análisis por espectroscopia de energía de rayos-X dispersados

La **Figura 32** muestra los espectros obtenidos del análisis por EDS, en esta se puede observar que los constituyentes en las nanopartículas preparadas son carbono, oxígeno, sodio y fósforo; lo cual está en concordancia con los insumos que fueron utilizados. Además, podemos descartar algún tipo de contaminación con otros elementos, por ejemplo, metales pesados. Así mismo se debe tener en cuenta que este método no brinda información exacta cuantitativa sobre la composición. Además, la técnica no permite la identificación de hidrógenos a pesar de que en la muestra se encuentren presentes.

Figura 32

Resultados de la composición elemental de las muestras optimizadas F'1 hasta F'4 y el blanco.



4.4. Determinación de la capacidad de carga y eficiencia de carga

Los resultados obtenidos para la capacidad y eficiencia de carga de las formulaciones óptimas se muestran en la **Tabla 18**. Por otro lado, en la **Figura 33** se presenta la curva de calibración previamente realizada según la metodología mencionada en la sección 3.6.

Figura 33

Curva de calibración de humo líquido en agua

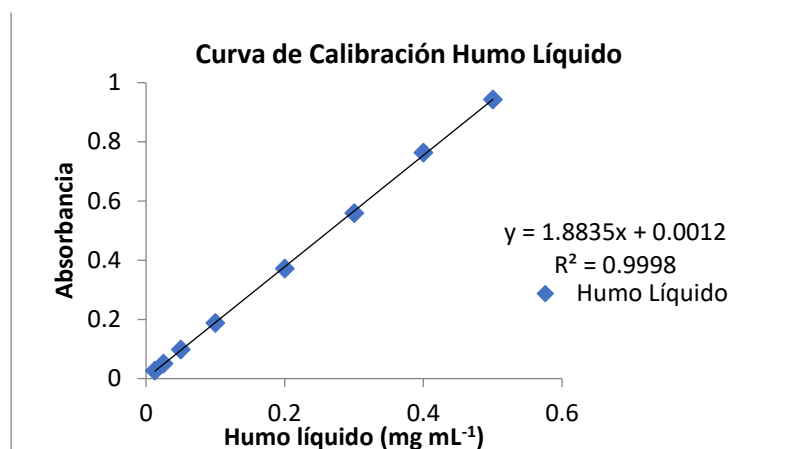


Tabla 18

Eficiencia y capacidad de carga para las formulaciones óptimas según ecuaciones 13 y 14.

Muestra	Eficiencia de carga (%)	Capacidad de carga (%)
FB	0	0
F'1	34.9	19.4
F'2	40.3	21.6
F'3	49.3	26.1
F'4	39.7	19.9

De la **Tabla 18** se puede observar que la formulación F'3 tiene la mayor eficiencia y capacidad de carga (49.3% y 26.1% respectivamente), además fue la que presentó el menor tamaño de partícula tanto por microscopía electrónica de barrido (22.4 nm) y DLS (180.3 nm). Mientras que la formulación F'1 mostró la menor eficiencia y capacidad de carga (34.4 % y 19.4 %, respectivamente), además de mayor tamaño respecto a la F'3 (200.6 nm, medido por SEM). Los valores obtenidos para las formulaciones F'1 hasta la F'4, son valores próximos a los reportados para otros tipos de sistemas, como el reportado por Amirí (Amirí & Morakabati, 2017); el cual obtuvo entre 32.07 y 39.93 % de eficiencia de carga de un aceite esencial y entre 11.42 y 25.41 % para la capacidad de carga. Amirí, utilizó también el proceso de gelificación iónica, pero aplicando temperatura de 60 °C a su sistema.

4.5. Estudio de la cinética de la liberación controlada

La liberación de principios bioactivos desde una matriz portadora depende de muchos factores tales como la capacidad de hinchamiento, estructura, velocidad de degradación o

erosión de la matriz (Mao et al., 2023). La **Tabla 19** muestra los resultados de la liberación controlada para las formulaciones F'1-F'4, mientras que la **Figura 34** muestra la gráfica correspondiente a los perfiles de la liberación del LS durante 24 horas de estudio. En estos se observa que la cinética presenta un perfil de liberación en dos etapas: una etapa inicial rápida durante los primeros 300 minutos, atribuido a la salida del LS más superficial adsorbido, mientras que una segunda etapa más estable y controlada durante el resto del tiempo de estudio y es asociada con la reducción del gradiente de concentración del LS en la superficie de las nanopartículas, debido a las interacciones producidas entre sus grupos funcionales y el quitosano que constituye la matriz.

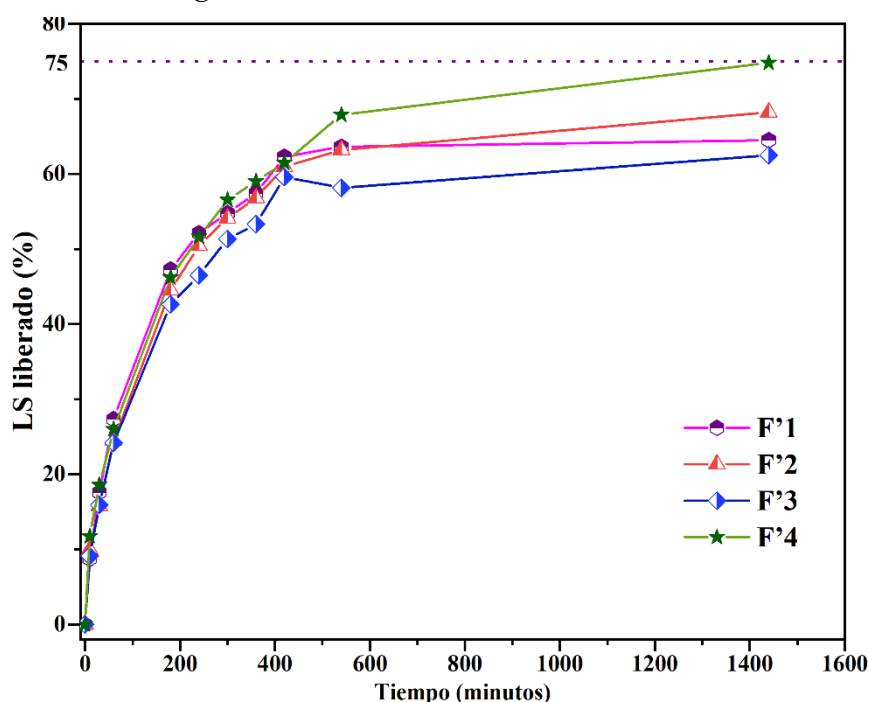
Tabla 19

Resultados de la liberación controlada de las formulaciones F'1-F'4.

Tiempo (min)	Masa liberada de humo líquido (ug)			
	F'1	F'2	F'3	F'4
0	0	0	0	0
10	526	579	499	632
30	1057	924	871	1003
60	1641	1428	1322	1402
180	2835	2596	2331	2490
240	3127	2941	2543	2782
300	3286	3154	2809	3048
360	3446	3313	2915	3180
420	3738	3552	3260	3313
480	3764	-	-	3499
540	3817	3685	3180	3658
1440	3870	3977	3419	4030

Figura 34

Perfiles de la liberación controlada de LS para las formulaciones F'1-F'4, en agua desionizada.



En resumen, la máxima masa liberada de humo líquido (LS) luego de 24 horas de estudio es mayor a los 4030 μg (74.8 %), tal como se muestra en la **Tabla 20**.

Tabla 20

Masa liberada de humo líquido en las muestras F'1-F'4 luego de 24 horas.

Formulación	Masa liberada de LS (μg)	Liberación de LS (%)
F'1	3870	64.5
F'2	3977	68.2
F'3	3419	62.5
F'4	4030	74.8

La cinética de la liberación de un principio activo como el humo líquido, también es ajustable a modelos matemáticos que nos proporcionan una estimación más clara de cómo se da el mecanismo de difusión o el comportamiento de liberación desde una matriz portadora tales como las nanopartículas de quitosano. Por lo tanto, los datos experimentales de la liberación del LS fueron ajustados al modelo matemático de regresión exponencial de Korsmeyer- Pepas, Ecuación 21, considerando las características fisicoquímicas de la matriz tales como la difusión, erosión o degradación, así como también la biodegradabilidad del

quitosano sobre la cual fueron preparadas las nanopartículas e incluso la solubilidad del L.S. Adicionalmente, el modelo fue escogido tomando en cuenta que el mecanismo de liberación es desconocido e ideal para sistemas poliméricos (Expósito Harris, 2010; Heredia Ayala, 2021). Los análisis del ajuste al modelo matemático fueron realizados mediante el software Origin 8.6.

$$\frac{M_t}{M_\infty} = Kt^n \quad \text{.....} \quad \text{Ecuación 21}$$

Donde M_t es la masa de humo líquido liberada en el tiempo t y M_∞ es la máxima cantidad de humo líquido liberado (en nuestro caso luego de las 24 horas); K y n son los parámetros a determinar en el modelo de regresión, los cuales están relacionados con la velocidad de liberación y el mecanismo de liberación respectivamente (Expósito Harris, 2010; S. Kumar et al., 2015). La **Figura 35** muestra los perfiles cinéticos según el modelo matemático de Korsmeyer – Pepas linealizado (grafico $\log(t)$ vs $\log(\frac{M_t}{M_\infty})$), de donde fueron obtenidos los valores K y n para los datos de liberación controlada en las muestras F'1-F'4. Por otra parte, la **Tabla 21** muestra los datos calculados de K , n y el coeficiente de correlación luego de realizado el análisis estadístico según el modelo.

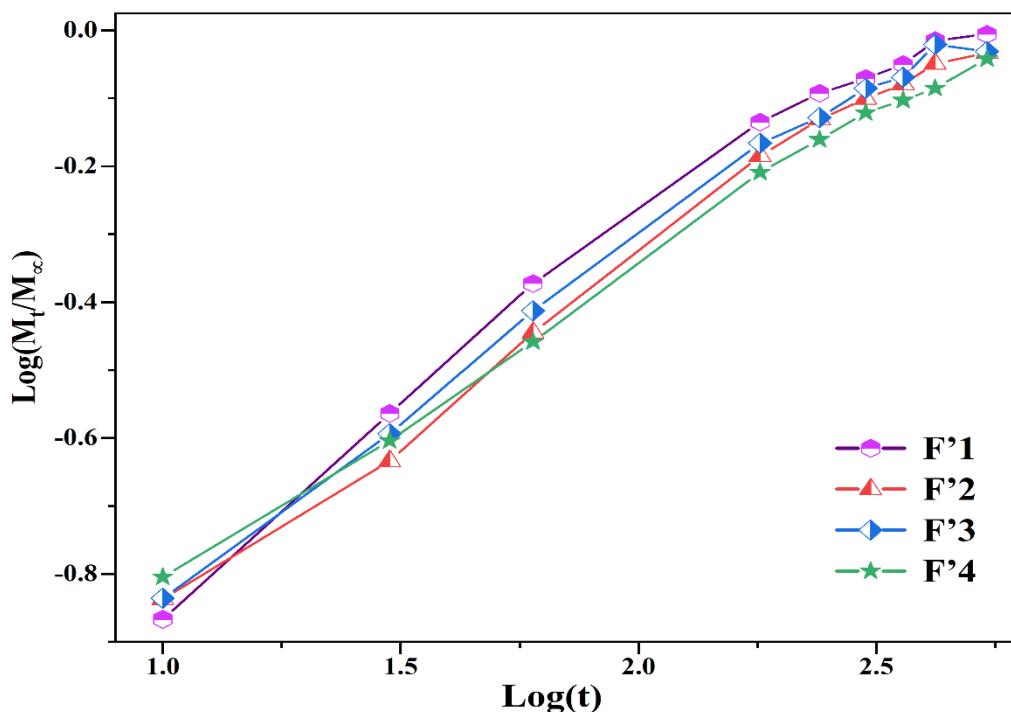
Tabla 21

Parámetros obtenidos según el modelo de Korsmeyer- Pepas para la liberación controlada de las formulaciones F'1-F'4.

Formulación	R ²	K (min ⁻¹)	n
F'1	0.9789	0.0496	0.4944
F'2	0.9907	0.0471	0.4899
F'3	0.9888	0.0501	0.4853
F'4	0.9954	0.0555	0.4511

Figura 35

Perfiles de la liberación controlada para las formulaciones F'1-F'4, según modelo de Korsmeyer - Pepas.



Los resultados según el modelo matemático utilizado, permitieron determinar el valor de n que relaciona el mecanismo de liberación, el cual establece puede ser un mecanismo Fickiano o no Fickiano, dependiendo del valor obtenido. En el caso de las 4 formulaciones estudiadas, se encontró valores de n entre 0.43 y 0.50, indicando que la liberación sigue un mecanismo no Fickiano o anómalo y que depende de la difusión y la relajación que experimenten las cadenas del quitosano en la estructura de las nanopartículas (S. Kumar et al., 2015, Stulzer et al., 2009). Por otro lado, el valor de K es relacionado con la velocidad de la liberación; es decir, define la velocidad a la cual el humo líquido va saliendo desde las nanopartículas (S. Kumar et al., 2015). De todas las formulaciones, F'2 con $K = 0.0471 \text{ min}^{-1}$ libera de manera más lenta con respecto a las otras, ya que el valor de K fue el más bajo de todos; lo cual indicaría una mejor dosificación del humo líquido cargado y una mayor conservación del filete de trucha en el tiempo.

4.6. Determinación de actividades biológicas

4.6.1. Estudio de capacidad antimicrobiana de las nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido.

Los resultados de la actividad antimicrobiana contra las bacterias *St. Aureus*, *Bacillus Cereus*, *E. Coli* y *Salmonella* se reportan en la **Tabla 22**, **Tabla 23**, **Tabla 24** y **Tabla 25**, respectivamente, mientras que en la **Tabla 26**, se presenta en resumen la concentración mínima inhibitoria (CMI) para cada formulación optima.

Tabla 22

Actividad promedio de las formulaciones F'1-F'4 en las bacterias St. Aureus.

Formulación	Concentración 100 % (mg mL ⁻¹)	Concentración (%)					Control Positivo
		100	50	25	12.5	6.25	
F'1	0.600	0.314	0.333	0.320	0.307	0.364	1.356
F'2	0.583	0.340	0.302	0.323	0.305	0.331	
F'3	0.547	0.219	0.300	0.309	0.330	0.337	Control negativo
F'4	0.539	0.270	0.349	0.320	0.294	0.329	0.299

Tabla 23

Actividad promedio de las formulaciones F'1-F'4 en las bacterias Bacillus Cereus.

Formulación	Concentración 100 % (mg mL ⁻¹)	Concentración (%)					Control Positivo
		100	50	25	12.5	6.25	
F'1	0.600	0.316	0.318	0.328	0.303	0.365	0.885
F'2	0.583	0.306	0.316	0.378	0.335	0.375	
F'3	0.547	0.358	0.352	0.348	0.334	0.720	Control negativo
F'4	0.539	0.350	0.314	0.338	0.347	0.357	0.325

Tabla 24

Actividad promedio de las formulaciones F'1-F'4 en las bacterias E. Coli.

Formulación	Concentración 100 % (mg mL ⁻¹)	Concentración (%)				Control Positivo
		100	50	25	12.5	
F'1	0.600	0.333	0.328	0.634	0.653	0.728
F'2	0.583	0.330	0.344	0.559	0.733	
F'3	0.547	0.308	0.359	0.358	0.649	Control negativo
F'4	0.539	0.311	0.356	0.570	0.734	0.265

Tabla 25

Actividad promedio de las formulaciones F'1-F'4 en la bacteria Salmonella.

Formulación	Concentración 100 % (mg mL ⁻¹)	Concentración (%)			Control Positivo
		100	50	25	
F'1	0.600	0.358	0.651	0.808	0.767
F'2	0.583	0.348	0.632	0.721	
F'3	0.547	0.336	0.586	0.720	Control negativo
F'4	0.539	0.352	0.582	0.752	0.272

Tabla 26

Resumen de la concentración mínima inhibitoria determinada para cada formulación óptima.

Formulación	Concentración Mínima Inhibitoria (%)			
	Grampositivas		Gramnegativas	
	<i>St. Aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella spp</i>
F'1	6.25	6.25	50	100
F'2	6.25	6.25	50	100
F'3	6.25	12.5	25	100
F'4	6.25	6.25	50	100

Del análisis microbiológico por el método de microdilución en caldo, se observó una inhibición de crecimiento en los microorganismos *St.Aureus*, *Bacillus Cereus*, *E. coli* y *Salmonella spp*. Así mismo, los cuatros tratamientos inhibieron a la *St. aureus* a una concentración de 6.25% respecto a la concentración inicial, mientras que a la *Salmonella spp* a

concentración inicial del 100 %. Por otro lado, las formulaciones F'1, F'2 y F'4 mostraron la misma CMI para las bacterias grampositivas y gramnegativas. Las tres inhibieron a *Bacillus cereus* a una concentración de 6.25%; mientras que el tratamiento F'3 inhibió a 12.5%. Finalmente, los tratamientos F'1, F'2 y F'4 inhibieron a la *E. coli* a una concentración de 50 %; mientras que el tratamiento F'3 inhibió al 25 %. No obstante, las diferencias en la respuesta de las muestras frente a las bacterias grampositivas y gramnegativas fue atribuido a su conformación estructural y a las características fisicoquímicas de las nanopartículas tales como: Potencial Z ($> + 40$ mV), concentración, pH e incluso el peso molecular y grado de desacetilación del mismo quitosano, ya que se ha reportado que estos factores afectan directamente la pared celular de las bacterias durante su etapa de crecimiento (Chandrasekaran et al., 2020a; Garavand et al., 2022). Por un lado, el potencial Z de Nps permite que su carga positiva superficial se adhiera a la pared celular de las bacterias con carga negativa, lo que permite la interacción electrostática con los grupos amino de la glucosamina de las NPs CS-LS, de esa forma la pared microbiana varía su permeabilidad y permite el ingreso de las nanopartículas o compuestos de LS quienes dañan el ADN y conducen a la muerte celular. Además, dependiendo del diferencial de carga entre ellos, el quitosano puede llegar a penetrar incluso hasta al núcleo celular, dañando el ADN bacteriano u ocasionar una lisis celular por la pérdida de biomateriales (Bertrand et al., 2024; Duan et al., 2019). La fase o etapa de crecimiento, también es un factor que afecta a la sensibilidad de las bacterias frente a las CS-NPs, ya que la negatividad de su superficie puede cambiar a medida que cambian la fase de crecimiento e incita la susceptibilidad de las células bacterianas. Por otro lado, el pH es otro factor relacionado con la actividad antimicrobiana de las NPs CS-LS ya que el quitosano presenta actividad antibacteriana solo en condiciones ácidas, debido a que a pH mayor a 6.5, es insoluble. No obstante, se ha reportado que la capacidad antimicrobiana aumenta cuando el aumento del pH. Adicionalmente, el peso molecular del quitosano también es un factor determinante, ya que según la literatura un alto peso molecular del quitosano incrementa el tamaño de la NPs CS, contribuyendo a que la potencial zeta disminuya, reduciendo así la actividad antibacteriana. En contraste, las NPs CS preparadas con quitosano de bajo y medio peso molecular pueden inhibir fuertemente el crecimiento de los patógenos (Chandrasekaran et al., 2020b; Tuesta-Chavez et al., 2022b).

En resumen, el mecanismo que rodea la actividad antibacteriana de las nanopartículas frente a las bacterias, es asociada con las interacciones que involucran la estructura policatiónica del CS con los grupos aniónicos que se encuentran en la superficie de la célula bacteriana, lo

cual provoca alteraciones y cambios químicos en la pared celular de las bacterias Grampositivas, específicamente en la membrana externa. No obstante, estas interacciones electrostáticas son capaces de modificar la cadena de transporte electrónico y facilitar la permeabilidad de las nanopartículas en la membrana citoplasmática, conduciendo así a la pérdida de constituyentes esenciales como enzimas, nucleótidos, iones y en consecuencia muerte de la célula bacteriana (Confederat et al., 2021; Zou et al., 2016). Por otro lado, los compuestos fenólicos, carbonilos y ácidos orgánicos presentes en el LS (Lingbeck et al., 2014; Soares et al., 2016) tienden a penetrar en las células microbianas, provocando la lisis y muerte de los microorganismos (Gyawali et al., 2015; Lima et al., 2019). Además, debido a que las bacterias Grampositivas están constituidas por una capa simple de peptidoglicanos, son más propensas al efecto antimicrobiano del LS y las Nps de quitosano cargadas con humo líquido. En cambio, las bacterias Gramnegativas presentan mayor resistencia gracias a que están rodeadas por varias capas finas complejas (petidoglicanos) y una membrana externa con alto contenido de lípidos (lipopolisacáridos) (Gyawali et al., 2015; Vera et al., 2017). Es por esta razón que se requiere una concentración inhibitoria mínima más alta para la inhibición de la *E.Coli* y *Salmonella sp.*

4.6.2. Estudio de la capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales en nanopartículas de quitosano cargadas con humo líquido.

La **Tabla 27** muestra los datos obtenidos para la determinación de la capacidad antioxidante por los métodos ABTS y DPPH, así como el resultado para la determinación del contenido de fenoles. Los valores de DPPH y ABTS, fueron expresados en función al porcentaje de captación de radicales libre (% CRL).

Tabla 27

Resultados del análisis de capacidad antioxidante y contenido de fenoles en las muestras F'1-F'4.

Formulación	Capacidad Antioxidante		Contenido de
	DPPH	ABTS	Fenoles
	(%CRL)	(%CRL)	(ug/mL)
F'1	93.9	89.0	39.35
F'2	92.7	93.0	42.00
F'3	91.4	84.6	33.84
F'4	89.6	97.9	35.47
Blanco	5.0	28.3	0.57
Humo Líquido	93.9	99.0	63.80

Los resultados de % CRL obtenidos en los ensayos DPPH y ABTS fueron superiores al 80 % en las formulaciones F'1 a F'4, consistente con los valores reportados por Luzia & Jorge, (2014), superiores al 70 %, indicando de este modo una remarcada actividad antioxidante. Por otro parte, se considera que el catión de radical $\text{ABTS}^{•+}$ generado a partir de la oxidación del ABTS con persulfato de potasio, es adecuado para determinar la actividad antioxidante de compuestos que pueden romper cadenas y donar hidrógenos tales como los compuestos fenólicos o ácidos carboxílicos en el LS y CS (Chen et al., 2018; Pu et al., 2019). La actividad de eliminación de $\text{ABTS}^{•+}$ a través de la acción del quitosano y el LS, es atribuido al hecho de que el quitosano elimina el radical a través de la acción del nitrógeno en el enlace simple $-\text{NH}_2$ y a través de la acción del H^+ en el $-\text{NH}_3^+$ (Kongkaoroptham et al., 2021b; Pu et al., 2019b). Por otro lado, los grupos $-\text{OH}$ del quitosano y el LS también pueden influir en la eliminación de estos radicales libres a través del mecanismo de transferencia de electrones, debido a que estos grupos son buenos captadores de radicales gracias a los electrones libres que poseen (Pu et al., 2019b; Shang et al., 2018).

Por el contrario, el DPPH es un radical libre estable que puede aceptar electrones o radicales de hidrógeno para convertirse en una molécula diamagnética estable. No obstante, el mecanismo de eliminación del DPPH ocurre a través de la reducción de la solución alcohólica en presencia de un antioxidante donador de hidrógeno (compuestos fenólicos de LS y quitosano), esto debido a la formación del DPPH-H no radical (Pu et al., 2019b). Además, DPPH es un radical lipofílico con acceso limitado a los componentes hidrofílicos del antioxidante (Liang & Kitts, 2014); razón por la cual, los valores de la capacidad antioxidante mediante DPPH fue menor respecto a los de ABTS. Así mismo, el reactivo $\text{ABTS}^{•+}$ tiene algunas ventajas fisicoquímicas sobre el DPPH ya que puede interactuar con antioxidantes de naturaleza tanto hidrofílica y lipofílica, además no se ve fuertemente afectado por factores estéricos (Ivanova & Yaneva, 2020).

Los resultados también mostraron que humo líquido tiene un alto contenido de compuestos fenólicos: $63.8 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (ver anexo N°2). Por otra parte, en los ensayos de DPPH (relativo a la actividad antioxidante), se encontró que el % CRL es directamente proporcional al contenido de humo líquido utilizado en las formulaciones (disminuye de F'1 a F'4); sin embargo, en el ensayo ABTS, se observó un patrón de comportamiento diferente debido particularmente a las variaciones entre las formulaciones. En contraste se encontró que F'1 contiene una mayor concentración inicial de humo líquido en las NP ($0.600 \text{ mg. mL}^{-1}$) en

comparación con F'2 (0.583 mg. mL⁻¹); sin embargo, cuando se realizó el ensayo de Folin Ciocalteu, se encontró que las nanopartículas en F'2 presentaban una cantidad de 42 µg mL⁻¹ de compuestos fenólicos en comparación con 39.35 µg mL⁻¹ en F'1. Este resultado puede atribuirse al hecho de que F'2 mostro un diámetro de partícula mayor en comparación con F'1 (204.9 y 186 nm, respectivamente). En resumen, la diferencia entre el diámetro de las partículas mostro una relación directa entre el contenido fenólico cargado y el diámetro de las nanopartículas, conduciendo así a un % de CRL relativamente más alto observado para F'2 en relación con F'1. El mismo comportamiento se observa entre F'3 y F'4; considerando que este último contenía menor cantidad de humo líquido en comparación con el primero, además presentó un mayor diámetro de partícula y mayor contenido de fenoles cargados, reflejando de este modo un mayor % CRL en comparación con el F'3.

Según (Munteanu & Apetrei, 2021), el uso de varios métodos de investigación permite tener una mejor comprensión del comportamiento de la muestra en términos de actividad antioxidante. Acorde con las consideraciones realizadas por Zhang & Kosaraju, (2007), las concentraciones consideradas para la obtención del efecto antioxidante deberían ser diferentes a las demás, ya que la presencia de matrices complejas como el quitosano hace que el comportamiento antioxidante del principio activo en solución ya no varíe directamente con su concentración, sino con las interacciones y propiedades fisicoquímicas del nanomaterial, como la concentración, potencial zeta, diámetro de partícula, eficiencia de carga (Morales-Olán et al., 2021). También es probable que dentro de un mismo ensayo antioxidante se obtengan resultados diferentes cuando se emplea el principio activo puro o el nanomaterial contra el ataque de radicales libres (Munteanu & Apetrei, 2021).

4.7. Determinación de la estabilidad microbiológica

La evaluación de la estabilidad microbiológica de filetes de trucha, se realizó con el fin de determinar la eficacia de las nanopartículas de quitosano de grado alimentario, cargadas con humo líquido (QGA-LS) y su potencial uso como material capaz de prolongar el tiempo de conservación del filete de trucha, así mismo se contrarrestó con las nanopartículas de quitosano solo (QGA), humo líquido (LS) y un blanco. Es sabido que las carnes como los filetes de trucha, pollo, entre otras por la exposición durante el proceso de comercialización y almacenamiento, hasta su consumo, pueden ser contaminados por diferentes microorganismos causando con el tiempo no solo pérdidas económicas; sino también problemas a la salud humana (Maharjan et al., 2019; Popovic et al., 2010). Por lo tanto, conocer la calidad de un producto alimentario, es muy relevante; por ello, en el presente trabajo fue evaluada la estabilidad microbiológica para

los filetes de trucha mediante recuento de indicadores microbianos contra microorganismo *Aéreo mesófilas viables*, *E. coli*, *ácido lácticas*, *Staphylococcus aureus* y *salmonella Spp.* Todos los datos de los recuentos microbiológicos fueron analizados usando el software Minitab 19, mediante valores de probabilidad (P-Valor) del Anova de un factor a un nivel de confianza del 95 % (o nivel de significancia $\alpha = 5\%$), así como también a través de intervalos de confianza (ICs) y comparación de medias por método LSD de Fisher al mismo nivel de confianza.

A. Recuento de bacterias aerobias mesófilas

La **Tabla 28** resume el Anova general con arreglo factorial para el recuento microbiano de las *aerobia mesófilas viables* por un periodo de 20 días; indicando que el tiempo es un factor determinante en los indicadores de recuentos microbianos ($P < 0.05$). En otras palabras, a medida que transcurra el tiempo, el crecimiento de colonias bacterianas en los filetes de trucha se incrementan significativamente. Similarmente, fue encontrado para los tratamientos con las muestras ($P < 0.05$); lo cual significa que alguno de los tratamientos presenta un efecto diferente en su actividad bacterial, así como los indicadores de recuentos microbianos. Por otra parte, se observó que las interacciones entre las muestras también presentan estadísticamente un efecto diferente y sinérgico en cada tratamiento ($P < 0.05$).

Tabla 28

Anova general del recuento de aerobias mesófilas durante 20 días al 95 % de nivel de confianza.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Tiempo	6	253.8768	42.3128	1383.960	0.0000
Muestras	3	2.1003	0.7001	22.899	0.0000
Interacción	18	1.7480	0.0971	3.1762	0.0005
Error	56	1.7121	0.0306		
Total	83	259.4372			

Los resultados estadísticos muestran la existencia de diferencias significativas entre el efecto inhibitorio de los tratamientos y el crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas, durante el paso del tiempo. Por ello, fue necesario hacer un estudio estadístico más profundo a fin de conocer que tratamientos presentan diferencias significativas o similares con el pasar del tiempo. En la **Tabla 29** se presenta el Anova para el recuento bacteriano en el día cero de tratamiento, no encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos ($0.05 < P$). Es decir, los tratamientos con QGA, LS, QGA-LS y el blanco presentan similar crecimiento de las bacterias *aerobias mesófilas*, resultados que fueron contrastados al analizar sus intervalos

de confianza (ICs) para los recuentos microbianos, tal como se observa en la **Error! Reference source not found.**; donde se nota claramente que los cuatro intervalos comparten un área en común, señalando que las 4 muestras tienen similar actividad inhibitoria.

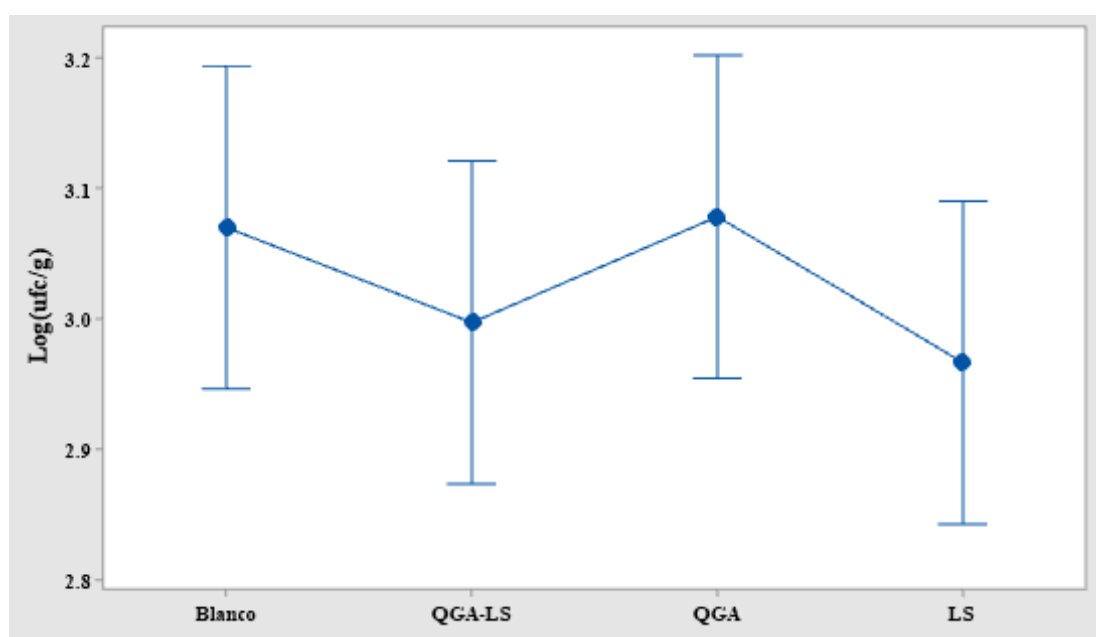
Tabla 29

Anova del recuento de aerobias mesófilas en el día cero de tratamiento.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	0.02714	0.009047	1.0446	0.423980
Error	8	0.06929	0.008661		
Total	11	0.09643			

Figura 36

ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS en el día "0".



La **Tabla 30** muestra el resultado Anova al recuento microbiano de las bacterias *aerobias mesófilas*, después de un día de tratamiento en los filetes de trucha. El análisis muestra que existen diferencias significativas entre los recuentos microbianos para los cuatro tratamientos ($P < 0.05$); es decir, al menos uno de ellos está inhibiendo la proliferación bacteriana de forma diferente a las otras. No obstante, la diferencia podría estar relacionada con las características fisicoquímicas de las nanopartículas en los tratamientos (Potencial Z, tamaño de partícula o la cantidad de LS) ya que se ha reportado que los cambios en la carga superficial y estabilidad de las Nps interrumpen el buen funcionamiento de la pared o

membrana celular de las bacterias (Chandrasekaran et al., 2020a). Además, de las propiedades químicas de las muestras, el blanco control no tiene propiedades antibacterianas, mientras que el quitosano de grado alimentario y humo líquido sí, tal como ha sido reportado por (Cristóbal, 2008; Lingbeck et al., 2014).

Tabla 30

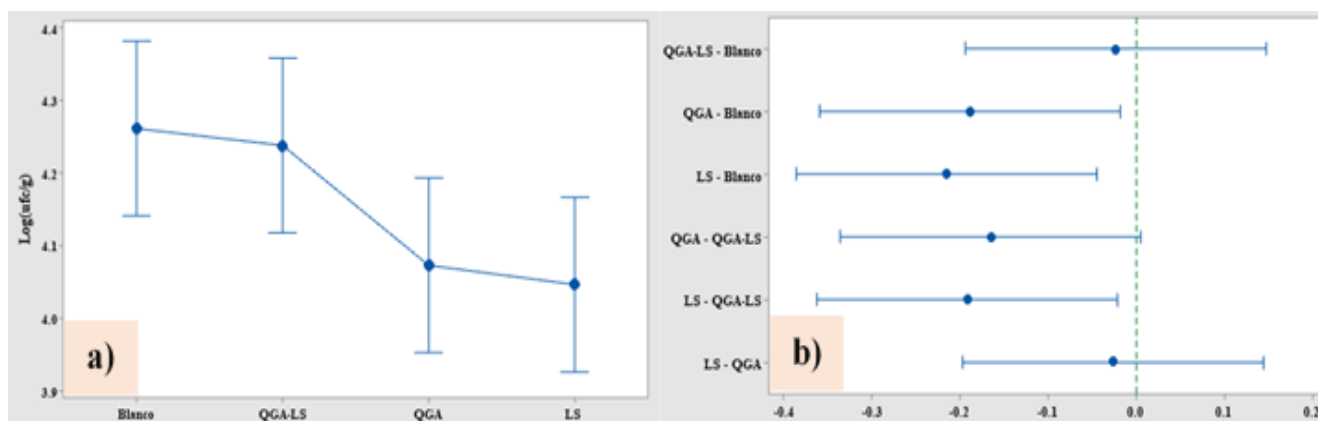
Anova del recuento de aerobias mesófilas en el día 1 de tratamiento.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	0.11006	0.17539	4.49	0.04
Error	8	0.06533	0.008167		
Total	11	0.17539			

El Anova para los recuentos de indicadores microbianos después del primer día de tratamiento, mostró la existencia de diferencias significativas en cada muestra ($P < 0.05$); lo cual, fue corroborado al comparar los intervalos de confianza (**Error! Reference source not found. a**), donde el tratamiento con el blanco y QGA-LS mostraron una mayor carga bacteriana que QGA y LS ($> 4.1 \log(\text{ufc/g})$). Además, también reafirmado con mayor certeza por el análisis estadístico de comparación de medias de Fisher (**Error! Reference source not found. b**), donde se notó que el recuento bacteriano para las muestras emparejadas, (Blanco, QGA-LS) y (LS, QGA), son similares, debido a que sus intervalos de comparación de medias fueron bisecados por la línea estadística vertical crítica. En resumen, se puede decir que los tratamientos con las muestras blanco y QGA-LS estadísticamente presentan menor capacidad inhibitoria al crecimiento bacteriano en el primer día.

Figura 37

a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 13.



Es conocido que los recuentos de indicadores microbianos incrementan con el paso del tiempo tal como fue mencionado anteriormente, además el accionar bactericida de las muestras en cada una de los tratamientos también varía. La **Tabla 31** muestra el Anova del recuento microbiano para las bacterias aerobias mesófilas en el día 13, indicando que existen diferencias considerables en el efecto inhibitorio para cada muestra. Es decir, al menos en uno de los tratamientos de conservación del filete se ha producido un mayor crecimiento bacteriano. No obstante, los resultados encontrados fueron complementados con los intervalos de confianza tal como se presenta en la **Error! Reference source not found. a)**, donde se puede observar que ninguno comparte un área en común. Además, todos presentan valores de recuentos microbianos superior al límite permitido ($> 5 \log (\text{ufc/g})$) en productos cárnicos (Maharjan et al., 2019). Sobre todo, que el blanco (control) ha permitido una mayor proliferación bacteriana ya que los recuentos de indicadores microbianos exhibieron valores superiores a los tratamientos con QGA-LS, QGA y LS. Por otro lado, la **Error! Reference source not found. b)**, reafirma con certeza los resultados encontrados, ya que las comparaciones de Fisher muestran que efectivamente todas tienen un efecto antibacteriano distinto debido a que ninguna de las comparaciones de medias es bisecado por la línea estadística crítica vertical.

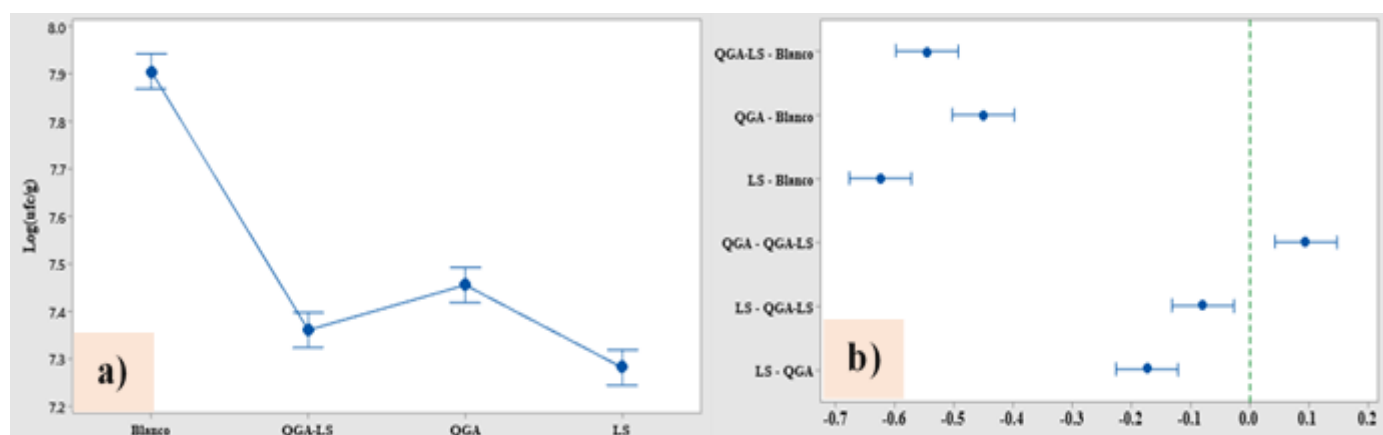
Tabla 31

Anova del recuento de aerobias mesófilas en el día 13.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	0.699514	0.233171	301.25	0.000
Error	8	0.006192	0.000774		
Total	11	0.705706			

Figura 38

a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 13.



La **Tabla 32** exhibe los resultados Anova al recuento de indicadores microbianos de las *aerobias mesófilas* en el día 20, observándose diferencias considerables en los recuentos de los microorganismos ($P < 0.05$); es decir, no todas las muestras exhiben la misma actividad antibacteriana ya que al menos en uno de los tratamientos el recuento bacteriano es mayor que en los otros.

Tabla 32

Anova del recuento de bacterias aerobias mesófilas en el día 20.

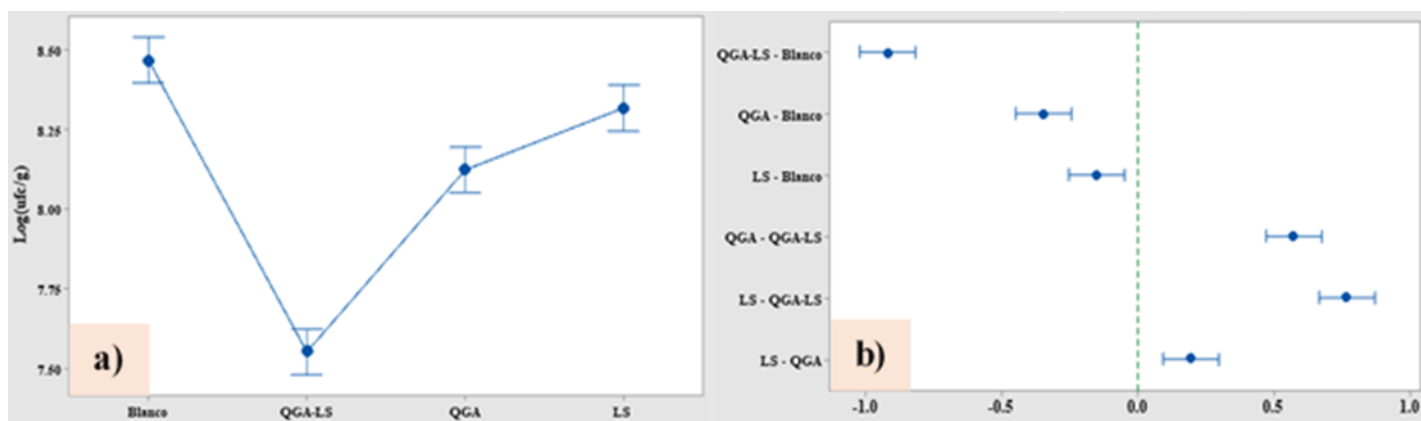
Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	1.45155	0.483851	164.42	0.000
Error	8	0.02354	0.002943		
Total	11	1.4751			

La **Error! Reference source not found.** muestra el análisis de los intervalos de confianza de los recuentos de indicadores microbianos a un nivel de significancia del 5%, así como la comparación de medias LSD de Fisher. El análisis muestra que todas las muestras presentan altos valores de recuentos microbianos superiores al límite máximo establecido ($< 5 \log (\text{ufc/g})$); sin embargo, se puede notar con claridad que el tratamiento con la muestra QGA-LS presentó mejor actividad inhibitoria en referencia a las otras. Es decir, la muestra inhibe con mayor capacidad el crecimiento de las bacterias aerobias mesófilas en el día 20. Además, de la comparación de medias de Fisher se comprueba que efectivamente todas las muestras presentan diferente efecto antibacteriano y recuentos de indicadores microbianos,

ya que ninguna comparación de medias fue bisecada por la línea estadística crítica. Estos resultados, demuestran la alta efectividad de las nanopartículas de QGA-LS contra el crecimiento de las bacterias *aerobias mesófilas* en productos cárnicos como los filetes de

Figura 39

a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 20.



trucha.

B. Recuento de bacterias *E. Coli*.

El recuento de indicadores micobacterianos de la *E. coli*, es un factor muy importante en la calidad de las carnes para consumo humano tales como la carne de pollo o filetes de trucha, entre otras, ya que la ingesta de carnes contaminadas con esta bacteria con recuentos sobre su límite establecido puede causar diarrea o efectos graves a la salud de las personas (Heredia et al., 2014). La **Tabla 33**, presenta el Anova general de recuento microbiano de los microorganismos *E. coli*, en esta se observó también que el tiempo influye significativamente sobre el crecimiento de las bacterias ($P < 0.05$). Por el contrario, para los tratamientos con las muestras no se encontró diferencias significativas ($P > 0.05$); lo cual significa que todas tienen un efecto inhibitorio similar. Sin embargo, se observó que las interacciones entre las muestras si presentan un efecto diferente en cada tratamiento ($P < 0.05$), atribuido al efecto sinérgico entre estas debido a las características fisicoquímicas.

Tabla 33

Anova general del recuento de E. Coli durante 20 días de tratamiento ($\alpha = 0.05$)

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Tiempo	6	1.9578	0.3263038	9.6921	0.0000
Muestras	3	0.2342	0.078055	2.3184	0.0853
Interacción	18	1.6881	0.093784	2.7856	0.0018
Error	56	1.8854	0.033667		
Total	83	5.76546			

La **Tabla 34** muestra el análisis de varianza para el recuento microbiano de la *E. Coli* en el día 7 de tratamiento, encontrándose que no existen diferencias significativas ($P > 0.05$) en efecto bacteriano causado por las 4 matrices (Blanco, QGA-LS, QGA y LS).

Tabla 34

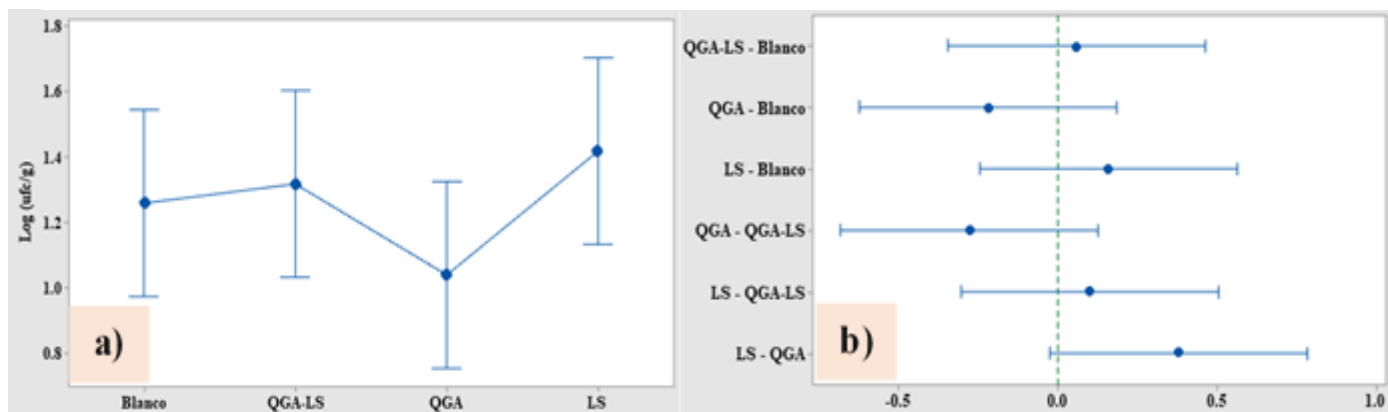
Anova del recuento de las bacterias E. Coli en el día 7.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	0.2304	0.07678	1.670	0.2490
Error	8	0.3672	0.04590		
Total	11	0.5976			

Según los resultados de la evaluación de estabilidad microbiológica de las matrices en el día 7, se observó que no existían diferencias significativas en los recuentos microbianos, resultado que fue corroborado al analizar los intervalos de confianza (**Error! Reference source not found. a**) y la comparación de medias de Fisher (**Figura 40 b**). Los ICs mostraron que las cuatro matrices presentan recuentos de indicadores bacterianos menores al límite establecido ($< 3\log(\text{ufc/g})$ o $< 10^3 \text{ ufc/g}$) para carnes de consumo (Vinicio et al., 2019). Los resultados, también fueron reafirmados por el método comparativo de medias de Fisher; donde se observó claramente que todos los tratamientos inhiben de forma similar el crecimiento bacteriano ya que las medias comparativas son bisecadas por el límite estadístico crítico.

Figura 40

a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de aerobias mesófilas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 20.



La **Tabla 35** presenta el Anova al recuento bacteriano de las bacterias *E. Coli* en el día 13 de tratamiento, observándose la existencia de diferencias significativas en la capacidad inhibitoria de las matrices frente a las bacterias en los filetes de trucha ($P < 0.05$). Es decir, que al menos una de los tratamientos, el recuento de indicadores bacterianos es diferente de los otros.

Tabla 35

*Anova del recuento del microorganismo *E. Coli* en el día 13.*

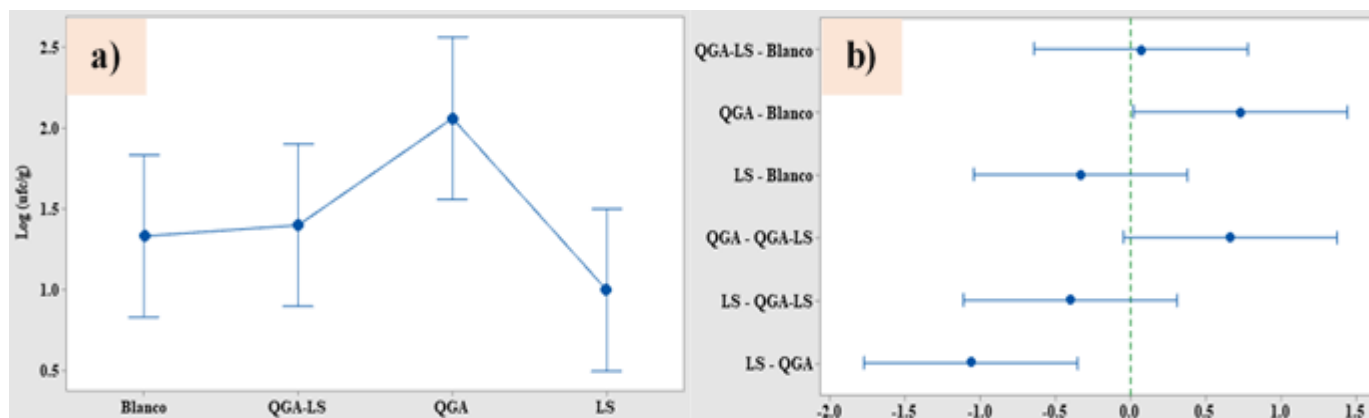
Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	1.780	0.5932	4.180	0.047
Error	8	1.135	0.1419		
Total	11	2.915			

Los resultados del Anova mostraron que el efecto de las matrices ante las bacterias *E. Coli* en el día 13 de tratamiento son diferentes, motivo por el cual se realizó un análisis estadístico más exhaustivo a fin de comprender tal comportamiento. En la **Error! Reference source not found. a)**, se muestra los ICs, donde se nota la diferencia en los recuentos microbianos de cada tratamiento con las 4 muestras, así mismo con valores menores al límite máximo establecido, siendo la matriz de QGA la que ligeramente exhibe mayores recuentos de indicadores bacterianos. No obstante, la comparación de medias de Fisher (**Error! Reference source not found. b)**) complementa los resultados antes observados en los intervalos de

confianza, encontrándose que los tratamientos con “LS, QGA” y “QGA, blanco” son los que muestran las principales diferencias de inhibición al crecimiento bacteriano ya que la

Figura 41

a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de *E. Coli* en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 13.



comparación de las medias no es bisecada por el límite estadístico crítico.

Los análisis estadísticos Anova del día 7 y 13, mostraron que las matrices exhibían diferencias en los recuentos de indicadores microbianos para los tratamientos; sin embargo, en los resultados para el día 20 (**Tabla 36**), no se encontró diferencias en el efecto inhibitorio de las 4 muestras. Esto puede deberse a que a partir de este periodo de tiempo todas las muestras presentan similares propiedades fisicoquímicas (pH, potencial Z, etc) que afectan directamente la actividad antibacterial, además controlan el crecimiento de la *E. Coli* con recuentos por debajo del límite establecido. (Chandrasekaran et al., 2020a).

Tabla 36

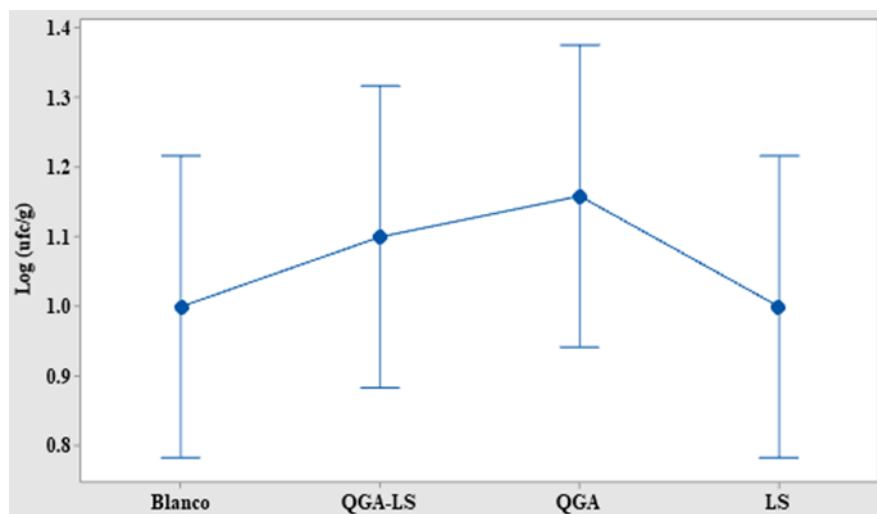
Anova del recuento de bacterias *E. Coli* en el día 20.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	0.05563	0.01854	0.699	0.5784
Error	8	0.21218	0.02652		
Total	11	0.2678			

El similar comportamiento de las matrices para cada tratamiento, encontrados a partir del análisis estadístico Anova en el día 20, fue corroborada a través de los intervalos de confianza para los recuentos de indicadores microbianos (**Error! Reference source not found.**); donde se observa claramente que los cuatro tratamientos presentan similares valores de recuentos de *E. Coli* en los filetes de trucha e inferiores a los límites máximos permitidos. Así mismo, la ligera diferencia observada fue atribuida a la variabilidad de los análisis

Figura 42

ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de *E. Coli* en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS.



microbiológicos.

C. Recuento de bacterias ácido lácticas

La presencia de las bacterias ácido lácticas en productos de consumo humano como las carnes, son consideradas de vital importancia y seguras ya que en hoy día se conoce que muchas de estas poseen propiedades inhibitorias contra varios tipos de microorganismos como las *E. coli* y *salmonella* (Luis Alberto et al., 2019). En consecuencia, en el presente trabajo el

análisis estadístico general, Anova (**Tabla 37**), a los recuentos de indicadores microbianos por un periodo de 20 días de tratamiento, mostró que la variable tiempo, muestras e interacciones tienen un efecto significativo ($P < 0.05$). Es decir, el tiempo es un factor determinante en los recuentos bacterianos para cada tratamiento, así mismo las muestras producen efectos bacteriológicos comparables con sus interacciones entre una muestra y otra. Por lo tanto, en base a lo mencionado, un análisis estadístico más minucioso fue necesario con la finalidad de entender mejor el comportamiento de las matrices frente a las bacterias ácido lácticas con el pasar de los días.

Tabla 37

Anova general del recuento ácido lácticas durante 20 días de tratamiento.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Tiempo	6	253.300	42.2168	3452.682	0.0000
Muestras	3	1.211	0.4035	33.004	0.0000
Interacción	18	2.766	0.1536	12.5663	0.0000
Error	56	0.685	0.0122		
Total	83	257.962			

Basado en los resultados del Anova general encontrado y el análisis estadístico para el primer día de tratamiento (**Tabla 38**), se observó los tratamientos no presentan diferencias significativas en los recuentos de indicadores microbianos ($P < 0.05$), tal como fue corroborado al analizar los intervalos de confianza (**Error! Reference source not found.**), resultados que mostraron a las 4 matrices con similar efecto antibacteriano. Así mismo, con recuentos microbianos inferiores a 1.5 log (ufc/g); sobre todo que la matriz de QGA muestra ligera mejor actividad antibacteriana respecto a las otras debido a que sus recuentos bacterianos son menores.

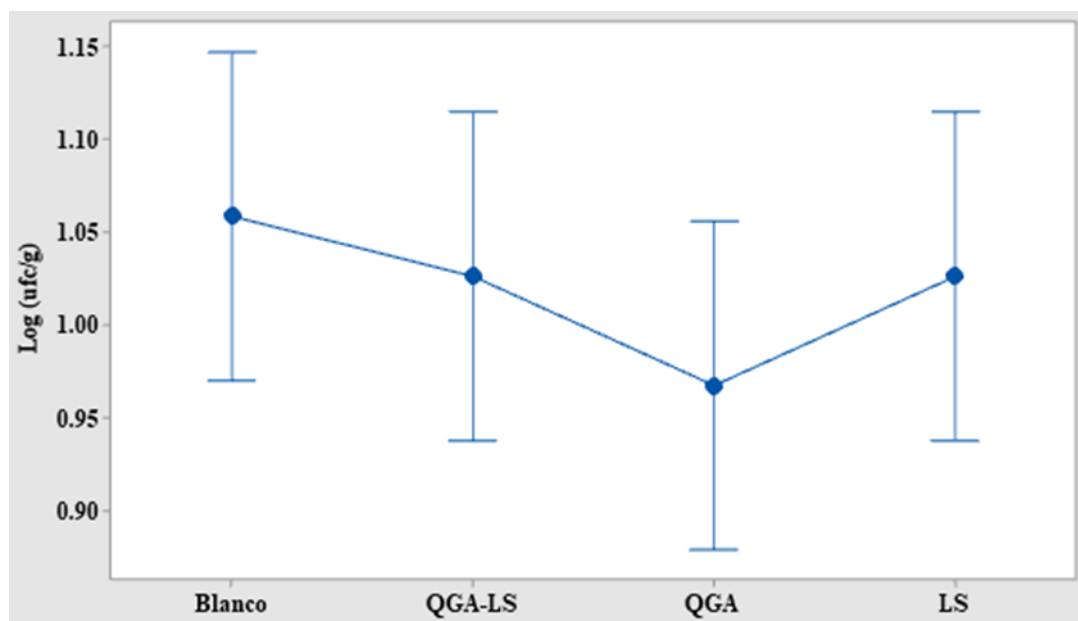
Tabla 38

Anova del recuento de bacterias ácido lácticas en el día 1.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	0.01294	0.004315	0.980	0.450
Error	8	0.03529	0.004412		
Total	11	0.04824			

Figura 43

ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de ácido lácticas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS.



La **Tabla 39** exhibe los resultados estadísticos medidos mediante valores de probabilidad (P-valor) para los recuentos de indicadores bacterianos de las bacterias ácido lácticas en el día 13 del tratamiento de filetes de trucha, observándose diferencias importantes en la capacidad inhibitoria de las matrices sobre el crecimiento bacteriano ($P > 0.05$). Es decir, al menos en un tratamiento el crecimiento de bacterias es más lento en comparación con los demás.

Tabla 39

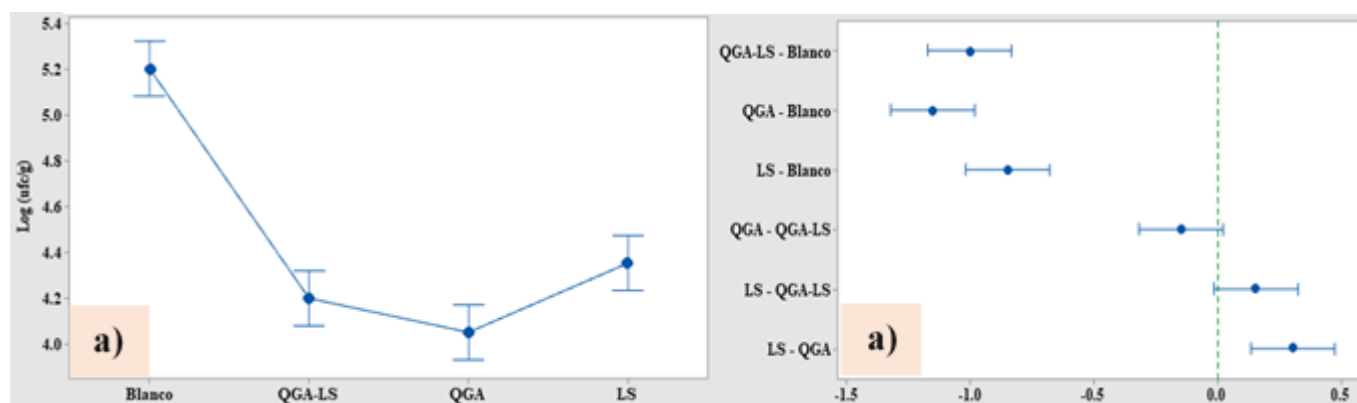
Anova del recuento de bacterias ácido lácticas en el día 13 de tratamiento.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	2.38952	0.796508	98.65	0.000
Error	8	0.06459	0.008074		
Total	11	2.45412			

El análisis Anova de los recuentos microbianos de ácido láctico en el día 13, mostró que las matrices presentan diferencias significativas en la capacidad bactericida ($P < 0.05$). Resultados que fueron corroborados por el análisis de intervalos de confianza (**Error! Reference source not found. a**)), donde se observó una clara diferencia entre los recuentos de indicadores bacterianos del blanco (control, $> 5 \log (\text{ufc/g})$) respecto a los otros tres tratamientos ($< 4.2 \log (\text{ufc/g})$). Además, reafirmado mediante medias comparativas de Fisher (**Error! Reference source not found. b**)), donde se pudo notar que efectivamente cada matriz tiene un efecto diferente en el tratamiento microbiológico, pero con cierta correlación inhibitoria entre los pares QGA-LS, QGA y QGA-LS y LS, ya que sus intervalos comparativos son parcialmente bisecados por el límite estadístico crítico.

Figura 44

a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de ácido láctico en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS, b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 13.



La **Tabla 40**, presenta los resultados al análisis estadístico Anova para los recuentos bacterianos de las ácido láctico en el día 20 de tratamiento, observándose la existencia de diferencias entre las capacidades inhibitorias a la proliferación de las bacterias por parte de las 4 matrices en los tratamientos ($P < 0.05$); sin embargo, el resultado no permite afirmar cuales de todas tienen mejor efecto positivo al recuento de indicadores bacterianos, razón por la cual fue necesario el estudio de los intervalos de confianza y las medias comparativas de Fisher.

Tabla 40

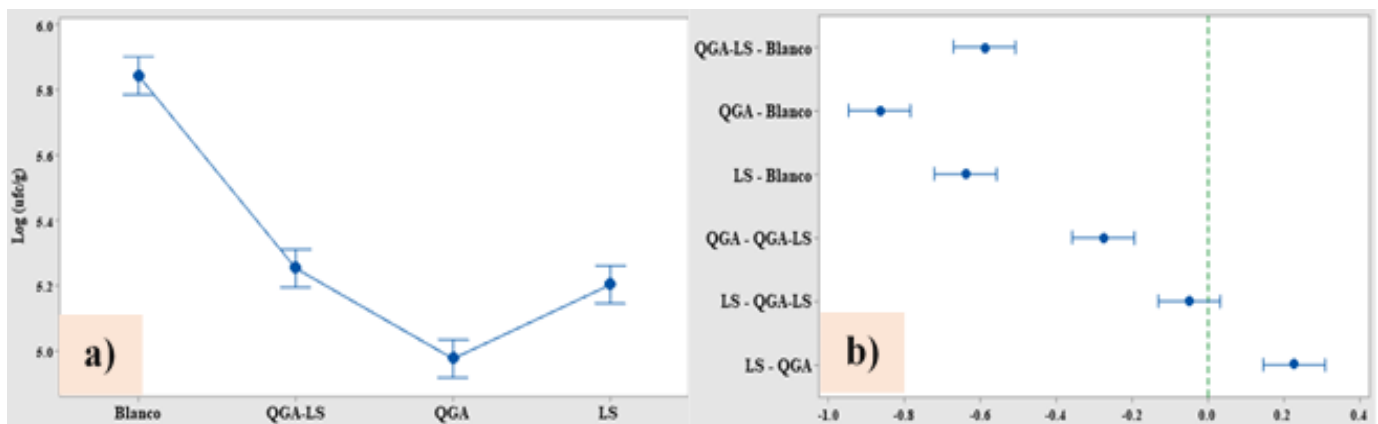
Anova del recuento de bacterias ácido lácticas en el día 20 de tratamiento.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	1.22404	0.408013	216.97	0.000
Error	8	0.01504	0.00188		
Total	11	1.23908			

La **Error! Reference source not found. a)** muestra los resultados al estudio estadístico de los intervalos de confianza, observándose que efectivamente hay una diferencia significativa entre las capacidades inhibitorias de las matrices, siendo la más efectiva el tratamiento con QGA ya que presentó los más bajos recuentos microbianos. Mientras tanto, el tratamiento con el blanco (control), mostró la menor efectividad con valores de recuentos de indicadores mayores a 5.6 log (ufc/g). Además, la **Figura 45 b)** complementa los resultados encontrados ya que permite afirmar con certeza que las matrices LS y QGA-LS muestran efecto antibacteriano similar debido a que sus medias comparativas de Fischer fueron bisecadas por el límite crítico estadístico; mientras tanto todas las otras presentaron un comportamiento diferente la una con la otra.

Figura 45

a) ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de ácido lácticas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS , b) Comparación de medias LSD de Fisher para el día 20.



D. Recuento de bacterias *Staphylococcus aureus*

Las *Staphylococcus aureus*, son bacterias que en altas concentraciones son perjudiciales para la salud de los consumidores de carnes como los filetes de trucha. En parte debido a que su crecimiento en alimentos, producen toxinas tales como las del síndrome de shock tóxico-1 (TSST-1) o las exfoliativas ETA y ETB, que muchas veces causan enfermedades altamente agudas y graves como la diarrea. Además, se ha comprobado que algunas de estas toxinas son resistentes al calor; es decir, pueden sobrevivir incluso después de la cocción de los alimentos (Tesfaye, 2019). Por lo tanto, es de gran importancia evaluar la presencia de estos microorganismos en productos de consumo humano como las carnes. Por ello, en el presente estudio fue evaluada la estabilidad biológica de los filetes de trucha frente a las *S. aureus*, luego de ser tratadas con 4 muestras diferentes. En la **Tabla 41**, se presenta el análisis estadístico Anova de los recuentos de indicadores microbianos, observándose que no existen diferencias significativas en la carga bacteriana de los cuatro tratamientos ($P > 0.05$). Es decir, todas presentan similar actividad antibacteriana ante las *Staphylococcus aureus*, resultado que fue corroborado con el análisis de intervalos de confianza (**Error! Reference source not found.**); los cuales efectivamente exhiben que todas las matrices muestran valores de recuentos de indicadores bacterianos similares. Además, estos resultados están por debajo del límite establecido para carnes de consumo ($< 4 \log (\text{ufc/g})$) (Vinicio et al., 2019).

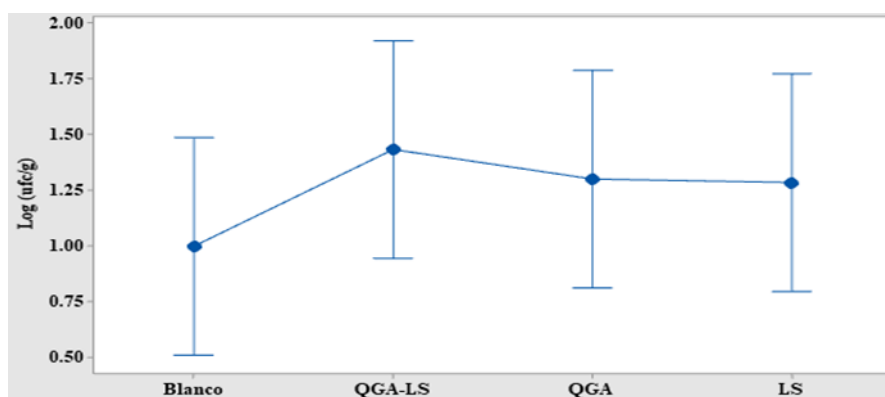
Tabla 41

Anova del recuento de bacterias Staphylococcus aureus en el día 1 de tratamiento.

Fuente	GL	SC	CM	F ($\alpha = 5\%$)	P
Entre Grupos	3	0.300	0.100	0.740	0.5550
Error	8	1.0744	0.1343		
Total	11	1.3745			

Figura 46

ICs de los indicadores de recuentos bacterianos de ácido lácticas en los filetes de trucha, tratados con blanco, QGA-LS, QGA y LS.



E. Recuento de bacterias *Salmonella*

Productos alimentarios como las carnes de aves, pescado y entre otros productos frescos, suelen ser fuentes comunes de salmonelosis, en parte debido a que son ricas en nutrientes y no contienen agentes inhibidores que eviten el crecimiento de estos microorganismos (Heredia et al., 2014). No obstante, su presencia es generalmente asociada a la falta de higiene y mala manipulación o almacenamiento del producto, además un inóculo entre 10^6 a 10^8 de bacterias *salmonella* conduce al desarrollo de enfermedades sintomáticas como fiebre, diarrea vómitos, entre otros, que muchas veces llegan a ser crónicas si la contaminación es considerable (Vinicio et al., 2019). Por tanto, es importante mantener un adecuado control microbiológico de productos como los filetes de trucha. En la **Tabla 42**, se muestra los resultados al análisis biológico de *salmonella*, durante 20 días, en filetes de trucha tratadas con las agentes blanco (control), QGA-LS, QGA y LS, verificándose una completa inocuidad de los filetes en los cuatro tratamientos, debido a que no se encontró *salmonella* en cada uno de los 25 g de muestra analizados, lo cual indica que la trucha no es una especie portadora de este grupo de bacterias patógenas, también podemos afirmar que no se presentó contaminación o si la hubo, las muestras inhibieron adecuadamente el crecimiento de estas bacterias en los filetes de trucha (Maharjan et al., 2019; Vinicio et al., 2019).

Tabla 42

Resultado del recuento de bacterias *sp. salmonella*.

Blanco	QGA- LS	QGA	LS
Ausencia/25 g	Ausencia/25 g	Ausencia/25 g	Ausencia/25 g

5. CONCLUSIONES

El quitosano de grado alimentario empleado presentó un grado de desacetilación de 62.32 % y 151.82 kDa de peso molecular. Mientras que el humo líquido no mostró presencia del benzo[a]pireno, tal y como queda demostrado mediante el análisis por HPLC. Sin embargo, no se debe descartar la presencia de otros tipos de hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Las condiciones óptimas de preparación mediante superficie de respuesta (RSM), derivado del diseño experimental Box-Behnken, presento tamaños promedios de partícula entre 180 y 200 nm, medidos por DLS; mientras que, por SEM, en el rango de 20-200 nm; además de buena polidispersidad y potencial zeta mayor a + 40 mV. Así mismo, una eficiencia y capacidad de carga en el rango de 34.9 – 49.3 % y 19.4 – 26.1 %, respectivamente. No obstante, se observó que a menor tamaño de nanopartículas (medido por SEM), mayor fue la eficiencia y la capacidad de carga.

Las nanopartículas obtenidas presentaron similar comportamiento de inhibición frente a los microorganismos grampositivos y gramnegativos. Teniendo en cuenta que las concentraciones iniciales (100%) de las formulaciones fueron $F'1 = 0.6$, $F'2 = 0.583$ $F'3 = 0.547$ y $F'4 = 0.539$ mg mL⁻¹ de LS, mostrando una concentración mínima inhibitoria para el *St. Aureus* y *B. cereus* fue de 6.25 % excepto para la $F'3$ la cual tuvo una CMI de 12.5 % para el *B. cereus*. Por otro lado, la CMI de *E. Coli* fue de 50 % excepto para la $F'3$ la cual fue 25 %. Finalmente, para *Salmonella spp* fue de 100 % para todos los casos.

Por otra parte, todas las formulaciones presentaron altos porcentajes de captación de radicales libres, atribuidos a la presencia del LS, presentando la mayor capacidad antioxidante en 93.9 % para la $F'1$ (método DPPH), para la $F'4$ de 97.9 % (método ABTS), mientras que la $F'2$ exhibió el contenido fenólico total más alto (42 µg mL⁻¹), además de una alta eficiencia y capacidad de carga.

Los datos experimentales de la liberación ajustados al modelo de matemático de Korsmeyer-Peppas, indicaron que la liberación de LS ocurre a través de un mecanismo no Fickiano, que depende de la difusión, erosión y relajación de las cadenas del quitosano en las nanopartículas. Así mismo, el estudio mostró que $F'2$ exhibe los mejores y más prometedores resultados con tasa de liberación más baja ($k = 0.0471$ min⁻¹), buena capacidad de carga, considerable actividad antioxidante y antibacteriana.

La evaluación de estabilidad microbiológica de los filetes de trucha mostró que los tratamientos con nanopartículas de QGA-LS tienen un efecto positivo en la inhibición de crecimiento bacteriano, ya que frente a las bacterias mesófilas exhibieron recuentos bacterianos mucho menores o similares a los tratamientos con QGA, LS y blanco durante 20 días. Así mismo, frente a la *E. Coli* todos los tratamientos mostraron similares efectos bactericidas, con recuentos microbianos similares y por debajo de los límites máximos establecidos para productos cárnicos de consumo humano. Por otro lado, los resultados frente a las bacterias ácidos lácticas mostraron que los tratamientos con QGA y QGA-LS fueron de mayor efectividad inhibitoria. También se concluye que frente a las bacterias *Staphylococcus aureus*, todas las matrices presentaron similar comportamiento antibacteriano y con recuentos de indicadores por debajo del límite permitido. Así mismo, frente a los microorganismos *salmonella spp* se encontró ausencia total en cada tratamiento.

6. RECOMENDACIONES

Tomando en cuenta los resultados obtenidos, se sugiere hacer seguimiento de las propiedades fisicoquímicas tales como: Potencial Z, tamaño de partícula, concentración del LS, entre otras, que podrían afectar la estabilidad en cada formulación de las nanopartículas de quitosano, durante un periodo de tiempo. Por otra parte, para la formulación óptima seleccionada (F'2), se recomienda hacer otros estudios de aplicación y viabilidad al filete de trucha con la finalidad de extender su tiempo de vida útil. Además, para ello se deberá identificar variables dependientes e independientes que permitan seleccionar el diseño experimental más idóneo. Por otro lado, basado en los resultados de la estabilidad biológica y lo mencionado, se sugiere realizar un estudio más amplio que permita determinar la concentración adecuada de las nanopartículas de QGA-LS que provean un mayor tiempo de conservación de los filetes de trucha, estudiar su toxicidad y su uso como aditivo alimentario en la industria.

7. REFERENCIAS

- Ait Boulahsen, M., Chairi, H., Laglaoui, A., Arakrak, A., Zantar, S., Bakkali, M., & Hassani, M. (2018). Optimization and characterization of gelatin and chitosan extracted from fish and shrimp waste. *E3S Web of Conferences*, 37. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/20183702006>
- Alani, O. A., Yakubu, M. K., Bukhari, M. M., & Gadimoh, S. (2014). Synthesis and characterization of chitosan from locust. *Nigerian Journal of Materials Science and Engineering*, 5(1).
- Alarfaj, A. A. (2019). Preparation, characterization and antibacterial effect of chitosan nanoparticles against food spoilage bacteria. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(2), 1273–1278. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.2.70>
- Alehosseini, E., Shahiri Tabarestani, H., Kharazmi, M. S., & Jafari, S. M. (2022a). Physicochemical, Thermal, and Morphological Properties of Chitosan Nanoparticles Produced by Ionic Gelation. *Foods*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/foods11233841>
- Alehosseini, E., Shahiri Tabarestani, H., Kharazmi, M. S., & Jafari, S. M. (2022b). Physicochemical, Thermal, and Morphological Properties of Chitosan Nanoparticles Produced by Ionic Gelation. *Foods*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/foods11233841>
- Amiri, A., & Morakabati, N. (2017). Encapsulation of Satureja khuzestanica essential oil in chitosan nanoparticles with enhanced antifungal activity. *International Journal of Nutrition and Food Engineering*, 11(4), 331–336.
- Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., & Zhong, F. (2015a). Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 44, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.023>
- Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., & Zhong, F. (2015b). Characterization of tara gum edible films incorporated with bulk chitosan and chitosan nanoparticles: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 44, 309–319. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.09.023>
- AOAC 991.14 and AOAC 998.08. (2021). *E. coli* Petrifilm.
- AOAC OFFICIAL METHOD 990.12. (n.d.). *INSTRUCTIVO TÉCNICO DE ANÁLISIS PARA RECuento DE MICROORGANISMOS AEROBIOS MESÓFILOS MEDIANTE TÉCNICA PETRIFILM*.
- Avadi, M. R., Sadeghi, A. M. M., Mohammadpour, N., Abedin, S., Atyabi, F., Dinarvand, R., & Rafiee-Tehrani, M. (2010). Preparation and characterization of insulin nanoparticles using chitosan and Arabic gum with ionic gelation method. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(1), 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.007>
- Badawy, M. E. I., Lotfy, T. M. R., & Shawir, S. M. S. (2020). Facile synthesis and characterizations of antibacterial and antioxidant of chitosan monoterpene nanoparticles and their applications in preserving minced meat. *International Journal of Biological Macromolecules*, 156, 127–136. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.04.044>

- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barik, M., BhagyaRaj, G. V. S., Dash, K. K., & Shams, R. (2024). A thorough evaluation of chitosan-based packaging film and coating for food product shelf-life extension. *Journal of Agriculture and Food Research*, 16, 101164. <https://doi.org/10.1016/J.JAFR.2024.101164>
- Baxter, A., Dillon, M., Anthony Taylor, K. D., & Roberts, G. A. F. (1992). Improved method for i.r. determination of the degree of N-acetylation of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 14(3), 166–169. [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(05\)80007-8](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(05)80007-8)
- Baxter, A., Dillon, M., Taylor, K. D. A., & Roberts, G. A. F. (1992). Improved method for i.r. determination of the degree of Noacetylation of chitosan. *Int. J. Biol. Macromolecules.*, 14, 166–1269.
- Bertrand, M., Simonin, S., & Bach, B. (2024). Applications of chitosan in the agri-food sector: A review. In *Carbohydrate Research* (Vol. 543). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2024.109219>
- Bhattacharjee, S. (2016a). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Bhattacharjee, S. (2016b). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, 235, 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>
- Botutihe, F., Laboko, A. I., Novitasari, E., Winanda, E., Adiko, R., Andriani, I., Rahmi, H., & Nurhafsah. (2023). Application of coconut shell liquid smoke on dried skipjack tuna (Katsuwonus pelamis) quality. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1230(1), 012004. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1230/1/012004>
- Boudouaia, N., Bengharez, Z., & Jellali, S. (2019). Preparation and characterization of chitosan extracted from shrimp shells waste and chitosan film: application for Eriochrome black T removal from aqueous solutions. *Applied Water Science*, 9(4). <https://doi.org/10.1007/s13201-019-0967-z>
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Bulmer, C., Margaritis, A., & Xenocostas, A. (2012). Production and characterization of novel chitosan nanoparticles for controlled release of rHu-Erythropoietin. *Biochemical Engineering Journal*, 68, 61–69. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.07.007>
- Calvo, P., Remuñán-López, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *Journal of Applied Polymer Science*, 63(1), 125–132. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4628\(19970103\)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4628(19970103)63:1<125::AID-APP13>3.0.CO;2-4)

- Carmona-Hernandez, J. C., Taborda-Ocampo, G., & González-Correa, C. H. (2021). Folin-Ciocalteu Reaction Alternatives for Higher Polyphenol Quantitation in Colombian Passion Fruits. *International Journal of Food Science*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8871301>
- Castro, A., Rivera, J., Soto, I., & González, M. (2015). Obtención Y Caracterización De (poli- β -(1,4)-d-glucosamina-n-acetil-d-glucosamina) A Partir De Camarón. *Revista Iberoamericana de Producción Académica y Gestión Educativa*, 3, 1–8.
- Chan, L. W., Lee, H. Y., & Heng, P. W. S. (2006). Mechanisms of external and internal gelation and their impact on the functions of alginate as a coat and delivery system. *Carbohydrate Polymers*, 63(2), 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2005.07.033>
- Chandrasekaran, M., Kim, K. D., & Chun, S. C. (2020a). Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review. *Processes*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/PR8091173>
- Chandrasekaran, M., Kim, K. D., & Chun, S. C. (2020b). Antibacterial activity of chitosan nanoparticles: A review. *Processes*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/PR8091173>
- Chanphai, P., & Tajmir-Riahi, H. A. (2018). Conjugation of tea catechins with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 84, 561–570. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.06.043>
- Chaudhari, A. K., Das, S., Dwivedi, A., & Dubey, N. K. (2023). Application of chitosan and other biopolymers based edible coatings containing essential oils as green and innovative strategy for preservation of perishable food products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 127688. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.127688>
- Chen, W., Yue, L., Jiang, Q., Liu, X., & Xia, W. (2018). Synthesis of varisized chitosan-selenium nanocomposites through heating treatment and evaluation of their antioxidant properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 114, 751–758. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.03.108>
- Chen, Y., Liu, Y., Dong, Q., Xu, C., Deng, S., Kang, Y., Fan, M., & Li, L. (2023). Application of functionalized chitosan in food: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 235, 123716. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2023.123716>
- Chung, T. L., Hsiao, H. H., Yeh, Y. Y., Shia, H. L., Chen, Y. L., Liang, P. H., Wang, A. H. J., Khoo, K. H., & Li, S. S. L. (2004). In vitro modification of human centromere protein CENP-C fragments by small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein. Definitive identification of the modification sites by tandem mass spectrometry analysis of the isopeptides. *Journal of Biological Chemistry*, 279(38), 39653–39662. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405637200>
- CLSI (Clinical Laboratory Standards International). 2010. M100 Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 12va ed. Wayne, USA. 91 p.
- Clavijo, J. (2013). Caracterización de materiales a través de medidas de microscopía electrónica de barrido (SEM). *Elementos*, 3(3). <https://doi.org/10.15765/e.v3i3.420>

- Confederat, L. G., Tuchilus, C. G., Dragan, M., Sha'at, M., & Dragostin, O. M. (2021). Preparation and Antimicrobial Activity of Chitosan and Its Derivatives: A Concise Review. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(12).
<https://doi.org/10.3390/molecules26123694>
- Corrales L, Alvarado M, Castillo L, Camacho Y. 2011. Estudio bacteriológico de la calidad del pescado fresco, bagre (*Pseudoplatystoma* sp) y mojarra roja (*Oreochromis* sp) comercializado en el municipio de El Colegio, Cundinamarca (Colombia). *NOVA* 9 (16): 149-157.
- Cristóbal, L. V. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 1–22.
- de Pinho Neves, A. L., Milioli, C. C., Müller, L., Riella, H. G., Kuhn, 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(2014), 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.12.058>
- Deliephan, A., Dhakal, J., Subramanyam, B., & Aldrich, C. G. (2023a). Effects of liquid smoke preparations on shelf life and growth of wild type mold and *Aspergillus flavus* in a model semi moist pet food. *Frontiers in Microbiology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1154765>
- Deliephan, A., Dhakal, J., Subramanyam, B., & Aldrich, C. G. (2023b). Effects of liquid smoke preparations on shelf life and growth of wild type mold and *Aspergillus flavus* in a model semi moist pet food. *Frontiers in Microbiology*, 14.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1154765>
- Deng, Q. Y., Zhou, C. R., & Luo, B. H. (2006a). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. *Pharmaceutical Biology*, 44(5), 336–342.
<https://doi.org/10.1080/13880200600746246>
- Deng, Q. Y., Zhou, C. R., & Luo, B. H. (2006b). Preparation and characterization of chitosan nanoparticles containing lysozyme. *Pharmaceutical Biology*, 44(5), 336–342.
<https://doi.org/10.1080/13880200600746246>
- Desvita, H., Faisal, M., Mahidin, M., & Suhendrayatna. (2023). Natural antimicrobial properties of liquid smoke derived from cocoa pod shells in meatball preservation. *South African Journal of Chemical Engineering*, 46, 106–111.
<https://doi.org/10.1016/J.SAJCE.2023.08.003>
- Desvita, H., Faisal, M., Mahidin, & Suhendrayatna. (2020). Preservation of meatballs with edible coating of chitosan dissolved in rice hull-based liquid smoke. *Heliyon*, 6(10).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05228>
- Dewi, C., Darsono, T., & Pratiwi, E. D. (2019). Effectiveness Analysis of the Utilization Liquid Smoke Distilled from Organic Materials as an Alternative for Fish Preservation. *J. Nat. Scien. & Math. Res*, 5(1), 10–16. <http://journal.walisongo.ac.id/index.php/jnsmr>
- DIGESA (Dirección general de Salud Ambiental). 2008. Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Lima, Perú. 23p.

- Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, 16(1), 101–112. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0670-y>
- Duan, C., Meng, X., Meng, J., Khan, M. I. H., Dai, L., Khan, A., An, X., Zhang, J., Huq, T., & Ni, Y. (2019). Chitosan as A Preservative for Fruits and Vegetables: A Review on Chemistry and Antimicrobial Properties. In *Journal of Bioresources and Bioproducts* (Vol. 4, Issue 1, pp. 11–21). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.21967/jbb.v4i1.189>
- Duarte, L. G. R., & Picone, C. S. F. (2022). Antimicrobial activity of lactoferrin-chitosan-gellan nanoparticles and their influence on strawberry preservation. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 159. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2022.111586>
- Elbashir, S., Parveen, S., Schwarz, J., Rippen, T., Jahncke, M., & DePaola, A. 2018. Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review. *Food Microbiology*, 70, 85–93. doi:10.1016/j.fm.2017.09.011.
- Expósito Harris, R. (2010). *Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos*. Universidad Complutense de Madrid.
- Fàbregas, A., Miñarro, M., García-Montoya, E., Pérez-Lozano, P., Carrillo, C., Sarrate, R., Sánchez, N., Ticó, J. R., & Suñé-Negre, J. M. (2013). Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 446(1–2), 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.015>
- Falcón, M. S. G., Amigo, S. G., Yusty, M. A. L., De Alda Villaizán, M. J. L., & Lozano, J. S. (1996). Determination of Benzo[a]pyrene in lipid-soluble liquid smoke (LSLS) by HPLC-FL. *Food Additives and Contaminants*, 13(7), 863–870. <https://doi.org/10.1080/02652039609374473>
- Fan, W., Yan, W., Xu, Z., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90(1), 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.09.042>
- Fan, X., Yin, L., Zhu, J., Sun, P., Zhu, Y., Chen, Q., Kong, B., Liu, Q., & Wang, H. (2024). The improvement of storage quality of Harbin red sausage by coating with oregano essential oil loaded zein-pectin-chitosan nanoparticles. *Food Packaging and Shelf Life*, 43, 101274. <https://doi.org/10.1016/J.FPSL.2024.101274>
- Faraldos, M., & Goberna, C. (2011). *Técnicas de análisis y caracterización de materiales* (2nd ed., Vol. 39). Biblioteca de Ciencias.
- Fernández, S., Pollak, A., & Vitancurt-Rocha, J. (1995). Pescado ahumado artesanalmente. Ensayos Tecnológicos. In *Instituto de Investigaciones Pesqueras*.
- Fernando, S. S., Jo, C., Mudannayake, D. C., & Jayasena, D. D. (2024). An overview of the potential application of chitosan in meat and meat products. *Carbohydrate Polymers*, 324, 121477. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2023.121477>

- Flores-Belmont, I. a, & Jiménez-Munguía, M. T. (2013). Microencapsulación de compuestos activos con quitosano. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(1), 48–56.
- Food and Drug Administration (FDA). (2017). *Regulatory Framework for Substances Intended for Use in Human Food or Animal Food on the Basis of the Generally Recognized as Safe (GRAS) Provision of the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act: Guidance for Industry*.
<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/ucm042450.htm>
- Fwu-Long, M. I., Shyu, S. S., Lee, S. T., & Wong, T. B. I. (1999). Kinetic study of chitosan-tripolyphosphate complex reaction and acid-resistive properties of the chitosan-tripolyphosphate gel beads prepared by in-liquid curing method. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*, 37(14), 1551–1564.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0488\(19990715\)37:14<1551::AID-POLB1>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0488(19990715)37:14<1551::AID-POLB1>3.0.CO;2-H)
- Garavand, F., Cacciotti, I., Vahedikia, N., Rehman, A., Tarhan, Ö., Akbari-Alavijeh, S., Shaddel, R., Rashidinejad, A., Nejatian, M., Jafarzadeh, S., Azizi-Lalabadi, M., Khoshnoudi-Nia, S., & Jafari, S. M. (2022). A comprehensive review on the nanocomposites loaded with chitosan nanoparticles for food packaging. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(5), 1383–1416.
<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1843133>
- George, A., Sanjay, M. R., Srisuk, R., Parameswaranpillai, J., & Siengchin, S. (2020). A comprehensive review on chemical properties and applications of biopolymers and their composites. *International Journal of Biological Macromolecules*, 154, 329–338.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.120>
- Goy, R. C., De Britto, D., & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polimeros*, 19(3), 241–247. <https://doi.org/10.1590/S0104-14282009000300013>
- Guillén, M. D., Manzanos, M. J., & Zabala, L. (1995). Study of a Commercial Liquid Smoke Flavoring by Means of Gas Chromatography/Mass Spectrometry and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 463–468.
<https://doi.org/10.1021/jf00050a039>
- Gupta, K. C., & Jabrail, F. H. (2006). Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. *Carbohydrate Polymers*, 66(1), 43–54. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.02.019>
- Gyawali, R., Hayek, S. A., & Ibrahim, S. A. (2015). Plant extracts as antimicrobials in food products: Mechanisms of action, extraction methods, and applications. In *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-034-7.00003-7>
- Haider, J., Majeed, H., Williams, P. A., Safdar, W., & Zhong, F. (2017). Formation of chitosan nanoparticles to encapsulate krill oil (*Euphausia superba*) for application as a dietary supplement. *Food Hydrocolloids*, 63, 27–34.
<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.020>

- Heinze, T., & Koschella, A. (2005). Carboxymethyl ethers of cellulose and starch - A review. *Macromolecular Symposia*, 223, 13–40. <https://doi.org/10.1002/masy.200550502>
- Heredia Ayala, N. S. (2021). *Comparación de cuatro modelos matemáticos para el análisis de la cinética de liberación de fármacos a partir de nanopartículas basadas en ácido poli(láctico-co-glicólico) sintetizadas por el método de nanoprecipitación* [Trabajo de titulación]. Universidad de las fuerzas armadas.
- Heredia, N., Dávila-Aviña, J. E., Soto, L. S., & García, S. (2014). Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control Meat products: main pathogens and non-thermal control strategies. *NACAMEH*, 8(1), 20–42.
- Hernández, L., González, A., Gutierrez, N., Muñoz, L., & Quintero, A. (2011). Estudio De La Actividad Antibacteriana De Películas Elaboradas Con Quitosano a Diferentes Pesos Moleculares Incorporando Aceites Esenciales Y Extractos De Especies Como Agentes Antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(3), 455–463.
- Iko Afé, O. H., Kpoclou, Y. E., Douny, C., Anihouvi, V. B., Igout, A., Mahillon, J., Hounhouigan, D. J., & Scippo, M. L. (2021). Chemical hazards in smoked meat and fish. *Food Science and Nutrition*, 9(12), 6903–6922. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2633>
- ISO 15214-1998. (2021). *Recuento de lactobacilos mesófilos*.
- Ivanova, D. G., & Yaneva, Z. L. (2020). Antioxidant Properties and Redox-Modulating Activity of Chitosan and Its Derivatives: Biomaterials with Application in Cancer Therapy. *BioResearch Open Access*, 9(1), 64–72. <https://doi.org/10.1089/biores.2019.0028>
- Kailaku, S. I., Syakir, M., Mulyawanti, I., & Syah, A. N. A. (2017). Antimicrobial activity of coconut shell liquid smoke. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 206(1). <https://doi.org/10.1088/1757-899X/206/1/012050>
- Karmakar, S. (2017). Particle Size Distribution and Zeta Potential Based on Dynamic Light Scattering: Techniques to Characterize Stability and Surface Charge Distribution of Charged Colloids. *Recent Trends in Materials: Physics and Chemistry*, 1–43.
- Kasaai, M. R. (2007). Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. *Carbohydrate Polymers*, 68(3), 477–488. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.11.006>
- Khan, A., & Alamry, K. A. (2021). Recent advances of emerging green chitosan-based biomaterials with potential biomedical applications: A review. *Carbohydrate Research*, 506. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2021.108368>
- Kongkaoroptham, P., Piroonpan, T., & Pasanphan, W. (2021a). Chitosan nanoparticles based on their derivatives as antioxidant and antibacterial additives for active bioplastic packaging. *Carbohydrate Polymers*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117610>
- Kongkaoroptham, P., Piroonpan, T., & Pasanphan, W. (2021b). Chitosan nanoparticles based on their derivatives as antioxidant and antibacterial additives for active bioplastic

- packaging. *Carbohydrate Polymers*, 257(August 2020), 117610.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117610>
- Kumar, S., Chauhan, N., Gopal, M., Kumar, R., & Dilbaghi, N. (2015). Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 81, 631–637.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.08.062>
- Kumar, S. K., & Priya E.R. (2017). *Chapter 11 Smoking of Fishes*.
- Lamarra, J., Rivero, S., & Pinotti, A. (2016). Design of chitosan-based nanoparticles functionalized with gallic acid. *Materials Science and Engineering C*, 67, 717–726.
<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.072>
- Lárez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola*, 8(1), 1–22.
- Le Corre, D., Bras, J., & Dufresne, A. (2010). Starch nanoparticles: A review. *Biomacromolecules*, 11(5), 1139–1153. <https://doi.org/10.1021/bm901428y>
- Lees, R., & Salguero, J. F. (1982). *Análisis de los alimentos: métodos analíticos y de control de calidad* (2nd ed.). Acirbia.
- Liang, N., & Kitts, D. D. (2014). Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules*, 19(11), 19180–19208.
<https://doi.org/10.3390/molecules191119180>
- Lima, M. C., Paiva de Sousa, C., Fernandez-Prada, C., Harel, J., Dubreuil, J. D., & de Souza, E. L. (2019). A review of the current evidence of fruit phenolic compounds as potential antimicrobials against pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 130(March), 259–270. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.03.025>
- Lin, L., Luo, C., Li, C., Chen, X., & Cui, H. (2022). A Novel Biocompatible Ternary Nanoparticle with High Antibacterial Activity: Synthesis, Characterization, and Its Application in Beef Preservation. *Foods 2022, Vol. 11, Page 438*, 11(3), 438.
<https://doi.org/10.3390/FOODS11030438>
- Lingbeck, J. M., Cordero, P., O'Bryan, C. A., Johnson, M. G., Ricke, S. C., & Crandall, P. G. (2014a). Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Science*, 97(2), 197–206.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.003>
- Lingbeck, J. M., Cordero, P., O'Bryan, C. A., Johnson, M. G., Ricke, S. C., & Crandall, P. G. (2014b). Functionality of liquid smoke as an all-natural antimicrobial in food preservation. *Meat Science*, 97(2), 197–206.
<https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.02.003>
- Loutfy, S. A., El-Din, H. M. A., Elberry, M. H., Allam, N. G., Hasanin, M. T. M., & Abdellah, A. M. (2016). Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: In vitro liver cancer model. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3). <https://doi.org/10.1088/2043-6262/7/3/035008>

- Lozano Vásquez, D., & Gabancho Osoreo, D. G. (2014). *Influencia Del Tiempo De Ahumado y Especie Forestal Combustible en el Olor y Sabor de la Cecina de Cerdo (Sus Scrofa Domestica) de la Provincia De Coronel Portillo-2013*. Universidad Nacional Intercultural de la Amazonía.
- Luis Alberto, M.-R., Baldomero, A.-Z., S, H.-A., Hiroshi, F., & Ema de Jesús, M.-S. (2019). Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria to Improve Shelf Life of Raw Meat. *Biocontrol Science*, 24(4), 185–192.
- Lupo, B., González, C., & Maestro, A. (2012). Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 3(1), 130–151.
- Luzia, D. M. M., & Jorge, N. (2014). Study of antioxidant activity of non-conventional brazilian fruits. *Journal of Food Science and Technology*, 51(6), 1167–1172. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0603-x>
- Ma, J., Xin, C., & Tan, C. (2015). Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 547–556. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.027>
- Maharjan, S., Rayamajhee, B., Chhetri, V. S., Sherchan, S. P., Panta, O. P., & Karki, T. B. (2019). Microbial quality of poultry meat in an ISO 22000:2005 certified poultry processing plant of Kathmandu valley. *International Journal of Food Contamination*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40550-019-0078-5>
- Maitra, J., Shukla, V. K., & Kumar Shukla, V. (2014). Cross-linking in hydrogels-a review. *American Journal of Polymer Science*, 2014(2), 25–31. <https://doi.org/10.5923/j.ajps.20140402.01>
- Mansur, D., Sugiwati, S., Rizal, W. A., Suryani, R., & Maryana, R. (2023). Pyrolysis of cajuput (*Melaleuca leucadendron*) twigs and rice (*Oryza sativa*) husks to produce liquid smoke-containing fine chemicals for antibacterial agent application. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(12), 10561–10574. <https://doi.org/10.1007/S13399-021-01896-X/FIGURES/11>
- Mao, S., Li, F., Zhou, X., Lu, C., & Zhang, T. (2023). Characterization and sustained release study of starch-based films loaded with carvacrol: A promising UV-shielding and bioactive nanocomposite film. *LWT*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.114719>
- Martín-lópez, H., Pech-cohuo, S. C., Herrera-pool, E., Medina-torres, N., Cuevas-bernardino, J. C., Ayora-talavera, T., Espinosa-andrews, H., Ramos-díaz, A., Trombotto, S., & Pacheco, N. (2020). Structural and physicochemical characterization of chitosan obtained by uae and its effect on the growth inhibition of *pythium ultimum*. *Agriculture (Switzerland)*, 10(10), 1–15. <https://doi.org/10.3390/agriculture10100464>
- Mondéjar-López, M., Rubio-Moraga, A., López-Jimenez, A. J., García Martínez, 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>
- Montazeri, N., Oliveira, A. C. M., Himelbloom, B. H., Leigh, M. B., & Crapo, C. A. (2013). Chemical characterization of commercial liquid smoke products. *Food Science & Nutrition*, 1(1), 102–115. <https://doi.org/10.1002/fsn3.9>
- Moon, J.-K., & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant Assays for Plant and Food Components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1655–1666.
<https://doi.org/10.1021/jf803537k>
- Morales-Olán, G., Luna-Suárez, S., Figueroa-Cárdenas, J. D. D., Corea, M., & Rojas-López, M. (2021). Synthesis and Characterization of Chitosan Particles Loaded with Antioxidants Extracted from Chia (*Salvia hispanica* L.) Seeds. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5540543>
- Morin-Crini, N., Lichtfouse, E., Torri, G., & Crini, G. (2019). *Fundamentals and Applications of Chitosan* (pp. 49–123). https://doi.org/10.1007/978-3-030-16538-3_2
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021a). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Munteanu, I. G., & Apetrei, C. (2021b). Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(7).
<https://doi.org/10.3390/ijms22073380>
- Muriady, M. (2022). ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LIQUID SMOKE POWDER FROM RICE HUSK. *International Journal of GEOMATE*, 23(95), 89–96.
<https://doi.org/10.21660/2022.95.7522>
- Padmaa Paarakh, M., Ani Jose, P., Setty, C. M., & Christoper, G. V. P. (2018). RELEASE KINETICS-CONCEPTS AND APPLICATIONS. 12| *International Journal of Pharmacy Research & Technology* |, 8.
- Pagliai, G., Dinu, M., Madarena, M. P., Bonaccio, M., Iacoviello, L., & Sofi, F. (2021). Consumption of ultra-processed foods and health status: A systematic review and meta-Analysis. *British Journal of Nutrition*, 125(3), 308–318.
<https://doi.org/10.1017/S0007114520002688>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Revisión de microencapsulacion de alimentos. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 63(2), 5669–5684.
- Pasaribu, T., Sinurat, A. P., Wina, E., & Cahyaningsih, T. (2022). Antibacterial activity of liquid smoke from *Anacardium Occidentale* and *Cocos nucifera* shell. *AIP Conference Proceedings*, 2391(1). <https://doi.org/10.1063/5.0072461/2820721>
- Pérez-Leonard, H., Bueno-García, G., Brizuela-Herrada, M. A., Tortoló-Cabañas, K., & Gastón-Peña, C. (2013). Microencapsulación: una vía de protección para microorganismos probióticos. *Icidca*, 47(1), 14–25.
- Popovic, N. T., Skukan, A. B., Dzidara, P., Coz-Rakovac, R., Strunjak-Perovic, I., Kozacinski, L., Jadan, M., & Brlek-Gorski, D. (2010). Microbiological quality of

- marketed fresh and frozen seafood caught off the Adriatic coast of Croatia. *Veterinarni Medicina*, 55(5), 233–241.
- Pradhan, J., Baisakhi, B., Das, B. K., Jena, K., Ananta, S., & Mohanty, D. (2024). Chitosan extracted from *Portunus sanguinolentus* (three-spot swimming crab) shells: its physico-chemical and biological potentials. *Journal of Environmental Biology*, 45(1), 62–71. <https://doi.org/10.22438/jeb/45/1/MRN-5186>
- Pretsch, E., Bühlmann, P., & Badertscher, M. (2009). Structure determination of organic compounds: Tables of spectral data. In *Structure Determination of Organic Compounds: Tables of Spectral Data*. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-93810-1>
- Pu, S., Li, J., Sun, L., Zhong, L., & Ma, Q. (2019a). An in vitro comparison of the antioxidant activities of chitosan and green synthesized gold nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 211, 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.007>
- Pu, S., Li, J., Sun, L., Zhong, L., & Ma, Q. (2019b). An in vitro comparison of the antioxidant activities of chitosan and green synthesized gold nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 211(September 2018), 161–172. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.007>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 31(7), 603–632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Rocha, F. R. P., & Teixeira, L. S. G. (2004). Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. *Química Nova*, 27(5), 807–812. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422004000500021>
- Rodríguez González, J. L., & López Heras, C. (2016). *Regeneración óptima de los alimentos* (1st ed.). Paraninfo.
- Rondón E, Juan, Ramos D, Daphne, Vilca L, Miguel, Salazar S, Eduardo, Mendoza Q, Yamili, & González V, Rosa. 2020. Caracterización sanitaria e identificación de los puntos de contaminación microbiológica en la cadena de comercialización pesquera en el puerto de Pucallpa, Ucayali, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31(1), e17539.
- S. Dassanayake, R., Acharya, S., & Abidi, N. (2019). Biopolymer-Based Materials from Polysaccharides: Properties, Processing, Characterization and Sorption Applications. In *Advanced Sorption Process Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.80898>
- Saeedi, M., Vahidi, O., Moghbeli, M., Ahmadi, S., Asadnia, M., Akhavan, O., Seidi, F., Rabiee, M., Saeb, M. R., Webster, T. J., Varma, R. S., Sharifi, E., Zarrabi, A., & Rabiee, N. (2022). Customizing nano-chitosan for sustainable drug delivery. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 350, pp. 175–192). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.07.038>
- Saloko, S., Darmadji, P., Setiaji, B., & Pranoto, Y. (2014). Antioxidative and antimicrobial activities of liquid smoke nanocapsules using chitosan and maltodextrin and its application on tuna fish preservation. *Food Bioscience*, 7, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2014.05.008>

- SANIPES (Organismo Nacional de Sanidad Pesquera). 2016. Lineamiento para el expendio de pescados, mariscos y/o productos hidrobiológicos en mercados de abasto mayoristas y minoristas. RD N° 017-2016-SANIPESDSNPA.
- Schmitt, J., & Flemming, H.-C. (1996). FTIR-spectroscopy in microbial and material analysis. *INTERNATIONAL BIODETERIORATION & BIODEGRADATION*, 41, 11.
- Shang, H., Zhou, H., Duan, M., Li, R., Wu, H., & Lou, Y. (2018). Extraction condition optimization and effects of drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides from comfrey (*Symphytum officinale* L.) root. *International Journal of Biological Macromolecules*, 112, 889–899. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.198>
- Shukla, S. K., Mishra, A. K., Arotiba, O. A., & Mamba, B. B. (2013). Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 59, 46–58. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.043>
- Sikorski, Z. E. (2016). Smoked Foods: Principles and Production. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 1–5). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00630-9>
- Simon, R., de la Calle, B., Palme, S., Meier, D., & Anklam, E. (2005). Composition and analysis of liquid smoke flavouring primary products. *Journal of Separation Science*, 28(9–10), 871–882. <https://doi.org/10.1002/jssc.200500009>
- Singh, K., Mishra, A., Sharma, D., & Singh, K. (2018). Antiviral and Antimicrobial Potentiality of Nano Drugs. In *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems* (pp. 343–356). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814029-1.00013-2>
- Soares, J. M., da Silva, P. F., Puton, B. M. S., Brustolin, A. P., Cansian, R. L., Dallago, R. M., & Valduga, E. (2016a). Antimicrobial and antioxidant activity of liquid smoke and its potential application to bacon. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.007>
- Soares, J. M., da Silva, P. F., Puton, B. M. S., Brustolin, A. P., Cansian, R. L., Dallago, R. M., & Valduga, E. (2016b). Antimicrobial and antioxidant activity of liquid smoke and its potential application to bacon. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 38, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.10.007>
- Sokamte tegang, A., Mbougung, P. D., Sachindra, N. M., Douanla Nodem, N. F., & Tatsadjieu Ngoune, L. (2020a). Characterization of volatile compounds of liquid smoke flavourings from some tropical hardwoods. *Scientific African*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00443>
- Sokamte tegang, A., Mbougung, P. D., Sachindra, N. M., Douanla Nodem, N. F., & Tatsadjieu Ngoune, L. (2020b). Characterization of volatile compounds of liquid smoke flavourings from some tropical hardwoods. *Scientific African*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00443>
- Soldera, S., Sebastianutto, N., & Bortolomeazzi, R. (2008a). Composition of phenolic compounds and antioxidant activity of commercial aqueous smoke flavorings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2727–2734. <https://doi.org/10.1021/jf072117d>

- Soldera, S., Sebastianutto, N., & Bortolomeazzi, R. (2008b). Composition of phenolic compounds and antioxidant activity of commercial aqueous smoke flavorings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2727–2734. <https://doi.org/10.1021/jf072117d>
- Sreelekshmi, R. S., Alex, L., & Jose, J. J. (2022). Shelf-life specific moisture variation in chitosan of genus *fenneropenaeus* distributed along arabian sea, india. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.05.15.491996>
- Srour, B., Fezeu, L. K., Kesse-Guyot, E., Allès, B., Méjean, C., Andrianasolo, R. M., Chazelas, E., Deschasaux, M., Hercberg, S., Galan, P., Monteiro, C. A., Julia, C., & Touvier, M. (2019). Ultra-processed food intake and risk of cardiovascular disease: Prospective cohort study (NutriNet-Santé). *The BMJ*, 365. <https://doi.org/10.1136/bmj.l1451>
- Stulzer, H. K., Tagliari, M. P., Parize, A. L., Silva, M. A. S., & Laranjeira, M. C. M. (2009). Evaluation of cross-linked chitosan microparticles containing acyclovir obtained by spray-drying. *Materials Science and Engineering C*, 29(2), 387–392. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2008.07.030>
- Suryani, R., Rizal, W. A., Prasetyo, D. J., Apriyana, W., Anwar, M., & Wahono, S. K. (2023). Physicochemical Characteristics, Antioxidant and Antibacterial Activities of Liquid Smoke Derived from Mixed Sawdust and Cocoa Pod Husks Biomass. *Trends in Sciences*, 20(6). <https://doi.org/10.48048/tis.2023.4985>
- SUVAKANTA, D., PADALA, N. M., LILAKANTA, N., & PRASANTA, C. (2017). KINETIC MODELING ON DRUG RELEASE FROM CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*, 67(3), 217–223.
- Swastawati, F., & Romadhon. (2020). Utilization of liquid smoke nanoencapsulation in fresh fish fillets as a preservation material. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 530(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/530/1/012001>
- Swastawati, F., Suharto, S., Muniroh, M., Cahyono, B., Shalihah, D. F., & Setiapatni, A. A. (2022). Application of Liquid Smoke on Milkfish (*Chanos chanos*) and Catfish (*Clarias batrachus*) as an Effort to Improve the Smoked Products Quality. *Jurnal Pengabdian Kepada Masyarakat (Indonesian Journal of Community Engagement)*, 8(2), 60. <https://doi.org/10.22146/jpkm.73795>
- Tesfaye, M. (2019). Bacteriological Quality of Street Vended Ready to Eat Legume and Vegetable Based Foods in Bahir Dar Town, Amhara Regional State, North Western Ethiopia. *International Institute for Science and Education*, 9(1), 2224–3208. <https://doi.org/10.7176/JBAH>
- Thambiliyagodage, C., Jayanetti, M., Mendis, A., Ekanayake, G., Liyanaarachchi, H., & Vigneswaran, S. (2023). Recent Advances in Chitosan-Based Applications—A Review. *Materials* 2023, Vol. 16, Page 2073, 16(5), 2073. <https://doi.org/10.3390/MA16052073>
- Tomaz, A. F., de Carvalho, S. M. S., Barbosa, R. C., Silva, S. M. L., Gutierrez, M. A. S., de Lima, A. G. B., & Fook, M. V. L. (2018). Ionically crosslinked chitosan membranes

- used as drug carriers for cancer therapy application. *Materials*, 11(10).
<https://doi.org/10.3390/ma11102051>
- Tuesta-Chavez, T., Monteza, J., Silva Jaimes, M. I., Ruiz-Pacco, G. A., Changanaqui, K., Espinoza – Suarez, J. B., Alarcon, H., Osorio – Anaya, A. M., Valderrama – Negrón, A. C., & Sotomayor, M. D. P. T. (2022a). Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of prepared liquid smoke-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 319. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110912>
- Tuesta-Chavez, T., Monteza, J., Silva Jaimes, M. I., Ruiz-Pacco, G. A., Changanaqui, K., Espinoza – Suarez, J. B., Alarcon, H., Osorio – Anaya, A. M., Valderrama – Negrón, A. C., & Sotomayor, M. D. P. T. (2022b). Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial capacity of prepared liquid smoke-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 319, 110912.
<https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2021.110912>
- Varghese, M., & Balachandran, M. (2021). Antibacterial efficiency of carbon dots against Gram-positive and Gram-negative bacteria: A review. In *Journal of Environmental Chemical Engineering* (Vol. 9, Issue 6). Elsevier Ltd.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106821>
- Veiga, A., Toledo, M. da G. T., Rossa, L. S., Mengarda, M., Stofella, N. C. F., Oliveira, L. J., Gonçalves, A. G., & Murakami, F. S. (2019). Colorimetric microdilution assay: Validation of a standard method for determination of MIC, IC50%, and IC90% of antimicrobial compounds. *Journal of Microbiological Methods*, 162, 50–61.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.05.003>
- Venkatesan, J., Anil, S., Kim, S. K., & Shim, M. S. (2016). Seaweed polysaccharide-based nanoparticles: Preparation and applications for drug delivery. *Polymers*, 8(2), 1–25.
<https://doi.org/10.3390/polym8020030>
- Vera, Y. C., Delgado, M. A., Roal, Y., & Mora, G. (2017). Efecto Antimicrobiano del Quitosano Y Cascara De Naranja Para Tratamiento De Aguas. *Artículo Del 4to Congreso Internacional de Ingeniería Agroindustrial*, 19(4), 381–388.
- Villada, H. S., Acosta, H., & Velasco, R. (2007). Biopolímeros naturales usados en empaques biodegradables. *Temas Agrarios*, 12(2), 5–19. <https://doi.org/10.21897/rta.v12i2.652>
- Vinicio, J., Solórzano, S., Johana, Y., Bravo, M., Henry, Y., Demera, B., Carlos, J., & Pin, L. (2019). CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA CARNE DE RES COMERCIALIZADA EN LA CIUDAD DE CALCETA MICROBIOLOGICAL QUALITY OF THE COMMERCIALIZED BEEF IN THE CITY OF CALCETA Información del artículo Revista ESPAMCIENCIA 10(2):63-70. *ESPAMCIENCIA*, 10(2), 63. – 70.
- Wassilkowska, A., Czaplicka-Kotas, A., Bielski, A., & Zielina, M. (2015). an Analysis of the Elemental Composition of Micro-Samples Using Eds Technique. *Http://Www.Ejournals.Eu/Czasopismo-Techniczne/*, 2014(Chemia Zeszyt 1-Ch (18) 2014), 133–148.

- Weißpflog, J., Vehlow, D., Müller, M., Kohn, B., Scheler, U., Boye, S., & Schwarz, S. (2021). Characterization of chitosan with different degree of deacetylation and equal viscosity in dissolved and solid state – Insights by various complimentary methods. *International Journal of Biological Macromolecules*, 171, 242–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.010>
- Widayat, W., Arifiani, S. N., Yaqin, N., & Al Baarri, A. N. (2018). Study of utilization liquid smoke and carrageenan as a natural antibacterial in manufacturing beef meatballs. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 102(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/102/1/012060>
- Xiong, Y., Li, J., Huang, G., Yan, L., & Ma, J. (2021). Interacting mechanism of benzo(a)pyrene with free DNA in vitro. *International Journal of Biological Macromolecules*, 167, 854–861. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.042>
- Yang, X., Lan, W., & Sun, X. (2023). Antibacterial and antioxidant properties of phenolic acid grafted chitosan and its application in food preservation: A review. *Food Chemistry*, 428, 136788. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2023.136788>
- Zhang, J., Su, P., Chen, H., Qiao, M., Yang, B., & Zhao, X. (2023). Impact of reactive oxygen species on cell activity and structural integrity of Gram-positive and Gram-negative bacteria in electrochemical disinfection system. *Chemical Engineering Journal*, 451. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.138879>
- Zhang, L., & Kosaraju, S. L. (2007). Biopolymeric delivery system for controlled release of polyphenolic antioxidants. *European Polymer Journal*, 43(7), 2956–2966. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2007.04.033>
- Zhang, M., Li, M., Zhang, D., Yu, Y., Zhu, K., Zang, X., & Liu, D. (2024). Preparation and Investigation of Sustained-Release Nanocapsules Containing Cumin Essential Oil for Their Bacteriostatic Properties. *Foods* 2024, Vol. 13, Page 947, 13(6), 947. <https://doi.org/10.3390/FOODS13060947>
- Zou, P., Yang, X., Wang, J., Li, Y., Yu, H., Zhang, Y., & Liu, G. (2016). Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food Chemistry*, 190(12), 1174–1181. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.076>

8. ANEXOS

Anexo N°1

Tabla 43

Constantes de ecuación MHS para quitosanos con variación de DA (%) y solventes de diferentes pH y fuerza iónica (μ).

Solvente	T (°C)	DA (%)	pH	μ (M)	$K \times 10^5$ (dL g ⁻¹)	a	Rango de peso molecular (kDa)	Referencia
0.02 M HAc/0.1 M NaAc/0.1 M NaCl	20	0	4.5	0.2	559.0	0.58	15–310	Anthonsen et al. (1993)
0.5 M HAc/0.5 M NaAc	25	29.5	4.7	0.5	199.0	0.59	115–1590	Yomota et al. (1993)
0.3 M HAc/0.2 M NaAc	25	2	4.6	0.2	82.0	0.76	100–600	Rinaudo et al. (1993)
0.3 M HAc/0.2 M NaAc	25	10.5	4.6	0.2	76.0	0.76	100–600	Rinaudo et al. (1993)
0.3 M HAc/0.2 M NaAc	25	21	4.6	0.2	74.0	0.76	100–600	Rinaudo et al. (1993)
0.02 M HAc/0.1 M NaAc/0.1 M NaCl	20	15	4.5	0.2	58.5	0.78	35–245	Anthonsen et al. (1993)
0.25 M HAc/0.25 M NaAc	25	21–26	4.7	0.25	15.7	0.79	35–2220	Kasaai et al. (2000)
0.2 M HAc/0.1 M NaAc	30	0	4.4	0.1	16.8	0.81	194–937	Wang et al. (1991)
2% HAc/0.2 M NaAc	25	15 ± 3	4.5	0.2	13.8	0.85	61–150	Gamzazade et al. (1985)
0.2 M HAc/0.1 M NaAc	30	9	4.4	0.1	6.59	0.88	211–1260	Wang et al. (1991)
0.1 M HAc/0.2 M NaCl	25	≈20	2.8	0.2	1.81	0.93	48–630	Roberts and Domszy (1982)
0.2 M HAc/0.1 M NaAc	30	16	4.4	0.1	1.42	0.96	536–1850	Wang et al. (1991)
0.33 M HAc/0.3 M NaCl	21	20–22	4.7	0.3	3.41	1.02	13–193	Podogina et al. (1986)
0.02 M HAc/0.1 M NaAc/0.1 M NaCl	20	60	4.5	0.2	2.18	1.06	15–164	Anthonsen et al. (1993)
0.2 M HAc/0.1 M NaAc	30	31	4.4	0.1	0.104	1.12	477–2510	Wang et al. (1991)
0.1 M HAc/0.02 NaCl	25	≈20	2.9	0.02	0.0304	1.26	48–630	Roberts and Domszy (1982)
0.2 M HAc/0.1 M NaCl/4 M urea	20	9	2.6		89.3	0.71	163–492	Lee (1974)
1% H Ac	30		2.8	0.01	4.74	0.72	205–657	Rao (1993)
0.2 M HAc/0.2 M NaAc	25	58	4.3	0.2		1.14	4.3–64.1	Errington et al. (1993)
0.17 M HAc/0.47 M NaCl	25	≤10	2.5	0.47	1115	0.147	1.6– 15	Berkovich et al. (1980)

Anexo N°2

✓ Cuantificación de fenoles totales:

La cuantificación de fenoles totales se realizó mediante el método de Folin Ciocalteu. El análisis se realizó con base en los siguientes procedimientos: 40 μ L de solución de ácido fosfomolibdico y fosfotúngstico 1 mol L⁻¹ (reactivo de Folin), 100 μ L de Na₂CO₃ al 20 % y 100 μ L de muestra de ensayo se colocaron en tubos de borosilicato de 4 – 5 mL; el volumen de los tubos se llenó hasta 2 mL con agua desionizada. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora para su posterior lectura a 725 nm. La aparición de la reacción se confirmó por la aparición de coloración, debido al complejo azul de tungsteno. El ácido gálico, en concentraciones que oscilan entre 0 y 200 μ g mL⁻¹, se utilizó como compuesto fenólico estándar para la curva de calibración (**Error! Reference source not found.**).

La tasa de absorbancia obtenida para la solución diluida al 1/20 de humo líquido fue de 0.169, además se encontró que el humo líquido investigado contenía un contenido fenólico total de $63.8 \mu\text{g mL}^{-1}$

Figura 47

Curva analítica obtenida de la aplicación del método de Folin Ciocalteu, que se utilizó para el cálculo del contenido de fenoles en humo líquido.

