

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Agroindustria Alimentaria
Ingeniería en Agroindustria Alimentaria



Proyecto Especial de Graduación

Elaboración de una película a partir de quitosano extraído de exuvia de *Hermetia illucens* reforzada con aceite esencial de romero como agente antimicrobiano

Estudiante

Kevin David Rodríguez Maldonado

Paola Fernanda Andino Carbajal

Asesores

Luis Fernando Maldonado Mejía, Ph.D.

Adela M. Acosta Marchetti, D.Sc.

Jesús Orozco, Ph.D.

Honduras, agosto 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

ADELA M. ACOSTA MARCHETTI

Directora Departamento de Agroindustria Alimentaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Figuras	6
Índice de Anexos	7
Resumen	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos	13
Localización del Estudio	13
Descripción del Estudio.....	13
Materiales y Equipos.....	13
Extracción de Quitina Pristina.....	14
Clasificación y Triturado.....	14
Desgrasado.....	15
Desmineralización.....	15
Desproteínización	15
Preparación y Caracterización del Quitosano.....	15
Desacetilación	15
Grado de Desacetilación	16
Elaboración de Películas	17
Elaboración de Solución de Quitosano al 1%.....	17
Elaboración de Solución de Gelatina al 2%.....	18
Elaboración de las Películas por el Método de Casting	18
Caracterización de la Película	19
Análisis Físico-mecánicos.....	19
Análisis de Barrera	22
Análisis Microbiológicos.....	23

Diseño Experimental	23
Análisis Estadístico	24
Resultados y Discusión.....	25
Extracción de Quitina Pristina.....	25
Preparación del Quitosano	25
Grado de Desacetilación	26
Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en el Grosor de las Películas	28
Efecto de la Relación Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en el Módulo de Young de las Películas	31
Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Solubilidad	33
Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)	35
Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en las Propiedades Antimicrobianas de las Películas.....	37
Conclusiones	40
Recomendaciones.....	41
Referencias.....	42
Anexos.....	47

Índice de Cuadros

Cuadro 1 Equipo y marca para realización del estudio.....	14
Cuadro 2 Formulación para Elaboración de las Películas, Según Tratamiento.....	19
Cuadro 3 Descripción de los tratamientos.....	24
Cuadro 4 Rendimiento de Extracción de Quitina Pristina y Preparación de Quitosano.....	26
Cuadro 5 Grado de desacetilación.....	27
Cuadro 6 Grosor de películas.....	28
Cuadro 7 Probabilidad e Interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en el Grosor.	29
Cuadro 8 Resistencia a la perforación de las películas.....	30
Cuadro 9 Probabilidad e interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Resistencia a la Perforación.....	30
Cuadro 10 Módulo de Young.....	32
Cuadro 11 Probabilidad e interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en el Módulo de Young.....	32
Cuadro 12 Opacidad.....	33
Cuadro 13 Solubilidad en Agua.....	34
Cuadro 14 Probabilidad e interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Solubilidad.....	34
Cuadro 15 Permeabilidad al Vapor de Agua.....	35
Cuadro 16 Probabilidad e interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA).....	36
Cuadro 17 Propiedades antimicrobianas de las películas.....	38
Cuadro 18 Probabilidad e interacción de relación de quitosano: gelatina y aceite esencial de Romero en las propiedades antimicrobianas de las películas.....	39

Índice de Figuras

Figura 1 Flujo de Proceso de Extracción de Quitina Pristina y Preparación de Quitosano.....	16
Figura 2 Flujo de Proceso de Elaboración de Película.....	19
Figura 3 Determinación del grado de desacetilación por titulación potenciométrica de la solución de quitosano <i>Hermetia illucens</i> . (Ácido clorhídrico 0.3 M por hidróxido de sodio 0.1 M)	27

Índice de Anexos

Anexo A Cuadro de Rendimiento de la Extracción de Quitina Pristina y Preparación de Qitosano a partir de 100 g de exuvia.	47
Anexo B Cuadro de Rendimiento de la Extracción de Quitina Pristina y Preparación de Qitosano a partir de 100 g de exuvia, Según Khayrova et al. (2019).	48
Anexo C Cuadro de Correlación entre las Propiedades Físico-mecánicas.	49
Anexo D Figura de la determinación del grado de desacetilación por titulación potenciométrica de la solución de quitosano comercial. (Ácido clorhídrico 0.3 M por hidróxido de sodio 0.1 M).....	50
Anexo E Figura de la determinación del grado de desacetilación por titulación potenciométrica de la solución de quitosano extraído de <i>Hermetia illucens</i> . (Ácido clorhídrico 0.3 M por hidróxido de sodio 0.1 M).....	51

Resumen

Actualmente, existen alternativas para la sustitución de polímeros sintéticos utilizados en la industria de alimentos, como los polímeros naturales. En esta investigación, se extrajo quitina de la exuvia de *Hermetia illucens* y se realizó un proceso de desacetilación para obtener quitosano, el cual posee capacidades antimicrobianas, al igual que el aceite esencial de romero. Se evaluó el efecto de la relación quitosano: gelatina y el porcentaje de aceite esencial en las propiedades mecánicas y de barrera. Se determinó su capacidad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*. Se utilizó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 2×2 . El rendimiento de la extracción de quitosano, grado de des acetilación, grosor, resistencia a la perforación, Módulo de Young, opacidad, solubilidad en agua y PVA para las películas fueron de $16.67 \pm 1.03\%$, $84.44 \pm 1.23\%$, 0.19 ± 0.005 mm, 49.02 ± 2.51 N/mm, 7.89 ± 0.67 GPa, 11.90 ± 1.04 , $94.82 \pm 4.46\%$ y 0.40755 ± 0.026085 g/día*m*kPa, respectivamente. La adición de 3% aceite esencial redujo el grosor y Módulo de Young. Las películas con 60% quitosano y 1% aceite esencial tuvieron un mayor espesor. La inclusión de 3% aceite esencial y una relación 60:40 quitosano: gelatina provocó una mayor resistencia a la perforación. Las películas con 60% quitosano obtuvieron los menores valores de solubilidad y mayores valores de PVA. El quitosano tuvo un mayor efecto en el halo de inhibición contra *Escherichia coli*. Los resultados recopilados incentivan la aplicación de este tipo de película como empaque activo debido a su capacidad antimicrobiana.

Palabras clave: grado de desacetilación, polímero, propiedades mecánicas, PVA, *Salmonella Thyphimurium*.

Abstract

Currently, there are alternatives for the substitution of synthetic polymers used in the food industry, such as natural polymers. In this research, chitin was extracted from the exuvia of *Hermetia illucens* and a deacetylation process was carried out to obtain chitosan, which has antimicrobial capacities, as well as the rosemary essential oil. Therefore, the effect of the chitosan: gelatin ratio and the percentage of essential oil on the mechanical and barrier properties was evaluated. Its antimicrobial capacity against *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* was determined. A Completely Randomized Design with 2 × 2 factorial arrangement was used. The chitosan extraction yield, degree of deacetylation, thickness, puncture resistance, Young's Modulus, opacity, water solubility and WVP for the films were $16.67 \pm 1.03\%$, $84.44 \pm 1.23\%$, 0.19 ± 0.005 mm, 49.02 ± 2.51 N/mm, 7.89 ± 0.67 GPa, 11.90 ± 1.04 , $94.82 \pm 4.46\%$ and 0.40755 ± 0.026085 g/day*m*kPa, respectively. The addition of 3% essential oil reduced the thickness and Young's modulus. Films with 60% chitosan and 1% essential oil were thicker. The inclusion of 3% essential oil and a 60:40 chitosan:gelatin ratio had larger puncture resistance. Chitosan had a greater effect on the inhibition halo against *Escherichia coli*. Films with 60% chitosan had the lowest solubility values and the highest WVP values. The results compiled encourage the application of this type of film as active packaging due to its antimicrobial capacity.

Keywords: degree of deacetylation, mechanical properties, polymer, *Salmonella Typhimurium*, WVP.

Introducción

Los plásticos son polímeros sintetizados a partir de compuestos orgánicos. Por su versatilidad, su fácil acceso y su bajo costo, los plásticos poseen diversos usos y aplicaciones. Dentro de las principales aplicaciones se encuentra el empaquetado de alimentos. El polietileno de baja densidad es un plástico utilizado comúnmente para la elaboración de empaques de alimentos congelados. Así mismo, se utiliza en la industria de alimentos el poliestireno, el polipropileno, el policloruro de vinilo y el policloruro de vinilideno. Actualmente, existe una problemática de contaminación a nivel mundial debido a los residuos generados en diferentes sectores de la industria. El agua, aire y suelo se ven afectados por esta contaminación, siendo esta una situación grave (Frías et al. 2003). En el año 2019, la producción de residuos de envases plásticos fue de 353 millones de toneladas (OCDE 2022).

Debido a que los plásticos no pueden ser degradados por el entorno, representan un mayor problema, ya que no se descomponen ni se oxidan a medida que transcurre el tiempo (Frías et al. 2003). No obstante, existen otras alternativas de polímeros biodegradables que están sustituyendo a los plásticos comunes. La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza después de la celulosa. A partir de un proceso de desacetilación de la quitina se obtiene el quitosano; dicho proceso consiste en la eliminación de los grupos acetilo. La quitina se encuentra en componentes estructurales como en las paredes celulares de los hongos, algas y levaduras; en exoesqueletos de crustáceos, moluscos e insectos (Ortega Cardona y Aparicio Fernández 2020). Por lo tanto, la quitina es una potencial fuente de materia prima para la elaboración de empaques biodegradables (Vanegas Hinojosa 2014).

Por causa del crecimiento de la población mundial, la industria alimentaria busca nuevas estrategias para la producción y distribución de alimentos. Una de las alternativas viables que se ha implementado es la producción de insectos para la alimentación humana y animal. En la actualidad, existe un gran interés en la mosca guerrera, *Hermetia illucens*, debido a su valioso perfil nutricional. Las larvas de *Hermetia illucens* contienen en promedio un 40% de proteína y un 35% de grasa (Arroyave Sierra et al. 2019). Durante el procesamiento de *Hermetia illucens* para la producción de

alimentos se obtiene como subproducto material que contiene quitina (Khayrova et al. 2019). Por lo tanto, dicho contenido de quitina puede ser aprovechado como materia prima para la producción de bioempaques.

El quitosano posee compuestos que le proporciona capacidades antimicrobianas, lo cual, le permite inhibir el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos. Esto se atribuye a la capacidad quelante y a la presencia de un grupo amino con carga positiva que puede interactuar con los compuestos de carga opuesta y que están presentes en la superficie de los microorganismos (Ayala Valencia 2015). Así mismo, en la literatura se ha reportado que este biopolímero posee capacidad antifúngica que le permite suprimir la esporulación y posterior producción de esporas. Esta capacidad antimicrobiana puede ser reforzada a través del uso sustancias naturales como los aceites esenciales que potencian la actividad antimicrobiana del quitosano (Scartazzini et al. 2019).

En la última década, se ha incrementado el uso de productos naturales con el objetivo de la conservación de alimentos. Acorde con Montoya Cadavid (2010), los aceites esenciales se definen como sustancias aromáticas altamente concentradas que provienen de una mezcla de componentes volátiles y productos del metabolismo secundario de las plantas, compuestos en su mayor parte por hidrocarburos del grupo de los terpenos. La extracción de estos aceites esenciales de determinadas hierbas como el orégano, mostaza, romero, entre otros, han sido utilizados con fin de contrarrestar los efectos nocivos de ciertos patógenos. De acuerdo con Zaouali et al. (2010), la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales de romero se debe por la presencia de monoterpenos en su composición.

Esta investigación se fundamentó en la caracterización y evaluación de la efectividad antimicrobiana de películas de quitosano extraído de *Hermetia illucens* reforzado con aceite esencial de romero; por lo tanto, los objetivos planteados en esta investigación fueron los siguientes:

Definir el grado de desacetilación del quitosano extraído de *Hermetia illucens*, determinar las propiedades físicas, mecánicas y de barrera de las películas de quitosano extraído de *Hermetia illucens* reforzado con aceite esencial de romero y evaluar la capacidad antimicrobiana de las películas del

quitosano extraído de *Hermetia illucens* y reforzado con aceite esencial de romero contra *Escherichia coli* y *Salmonella Thyphimurium*.

Materiales y Métodos

Localización del Estudio

La investigación se realizó en la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano en el municipio de San Antonio de Oriente, Francisco Morazán. La medición del grado de desacetilación y la fabricación de las películas se llevó a cabo en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de Zamorano. De igual forma, se evaluaron las propiedades físicas, mecánicas y de barrera de las películas en el mismo laboratorio. Mientras que, los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Zamorano.

Descripción del Estudio

El estudio se desarrolló en cuatro etapas, la primera etapa consistió en la extracción de la quitina pristina de *Hermetia illucens*. La segunda etapa consistió en la preparación y caracterización del quitosano. La tercera etapa consistió en la elaboración de la película. En la cuarta etapa se evaluaron las propiedades físicas, mecánicas y de barrera de las películas, así como su capacidad antimicrobiana.

Materiales y Equipos

Para la elaboración de la película se utilizaron los siguientes materiales: 1) La gelatina B 275 Bloom (Gelnex®, Brasil) se adquirió de un proveedor local. 2) La exuvia de *Hermetia illucens* se adquirió del Laboratorio de Entomología de Zamorano. 3) El glicerol se obtuvo de la empresa “Dimelab (Honduras)”. 4) El aceite esencial de romero proveniente de la empresa “Aura Cacia (Estados Unidos)”. 5). El ácido acético glacial proviene de la empresa “EMSURE®”. 6) Los filtros de papel de celulosa de algodón alfa provinieron de la empresa “Advantec®”.

En el Cuadro 1 se pueden observar los equipos utilizados en el presente estudio, con sus respectivas marcas.

Cuadro 1*Equipo y marca para realización del estudio.*

Equipo	Marca
Balanza analítica	OHAUS Adventure
Molino	Foss CT193 Cyclotec
Estufa con agitador magnético	Barnstead Thermolyne Cimarec
Horno	NOPCO
Horno de Convección	Binder
Bomba al Vacío	Buchi
Micrómetro Digital	Mitituyo
Analizador de Textura	Brookfield CT3 4500
Espectrofotómetro	Agilent Cary 8454
Incubadora	Thermolyne
Sonificador	Fisher Scientific FS14
Licuadaora	Kitchen Aid
Mechero	-

Extracción de Quitina Pristina

Se adoptó el proceso de extracción de quitina pristina descrito por Khayrova et al. (2019), con modificaciones. Se extrajo la quitina pristina en cuatro etapas. La primera etapa consistió en el triturado de la exuvia de la mosca guerrera. Luego de la obtención de una partícula más pequeña de la exuvia, en la segunda etapa se realizó un proceso de desgrasado. Posterior a ello, se realizó un proceso de desmineralización y, por último, se realizó un proceso de desproteínización. En este proceso, se sustituyó la liofilización por deshidratación al vacío (60 °C).

Clasificación y Triturado

Para la extracción de quitina pristina se realizó una clasificación de las muestras en donde se removió cualquier impureza presente. Posterior a ello, se trituró la exuvia con el objetivo de reducir el tamaño de partícula para incrementar la eficiencia de los procesos posteriores. Se procesó por medio de una licuadora marca Kitchen Aid con las siguientes especificaciones: licuadora de 100 mm de ancho, 107.9 mm de profundidad y 222.2 mm de altura.

Desgrasado

Luego de obtener un menor tamaño de partícula por medio del triturado, se comenzó con el proceso de desgrasado. De acuerdo con Khayrova et al. (2019), se añadió 500 mL de cloroformo: metanol (CHCl_3 : CH_3OH ; 7:3) de solución en un cubilete de 1000 mL con 100 g de exuvia de larva triturada. Luego, se agitó durante 4 horas a una temperatura 20 °C. Por último, se realizó un proceso de filtración a través de un filtro de vidrio y se lavó con 50 mL de mezcla orgánica y se le aplicó un deshidratado al vacío a 60 °C.

Desmineralización

Posterior al desgrasado, se realizó un proceso de desmineralización. Se agregaron 1000 mL de HCl al 2% (v/v) al material obtenido y se dejó reposando por 2 horas a 20 °C. Luego se realizó un proceso de filtración para separar los sólidos a través de un filtro de vidrio. Por último, se lavó con 1000 mL agua destilada y se realizó un deshidratado al vacío a 60 °C.

Desproteínización

Luego de obtener un material desgrasado y desmineralizado, se realizó un proceso de desproteínizado. Para ello, se agregó 250 mL de NaOH al 5% (p/v) en un cubilete de 500 mL con 20 g de biomasa desmineralizada. Posterior a esto, se realizó un baño María a una temperatura de 50 °C por 2 horas con agitación ocasional. Luego, se sacó del recipiente y se realizó un proceso de filtración. Mas adelante, se realizó un lavado con agua destilada hasta obtener un pH neutro. Por último, se realizó un deshidratado al vacío a 60 °C.

Preparación y Caracterización del Quitosano

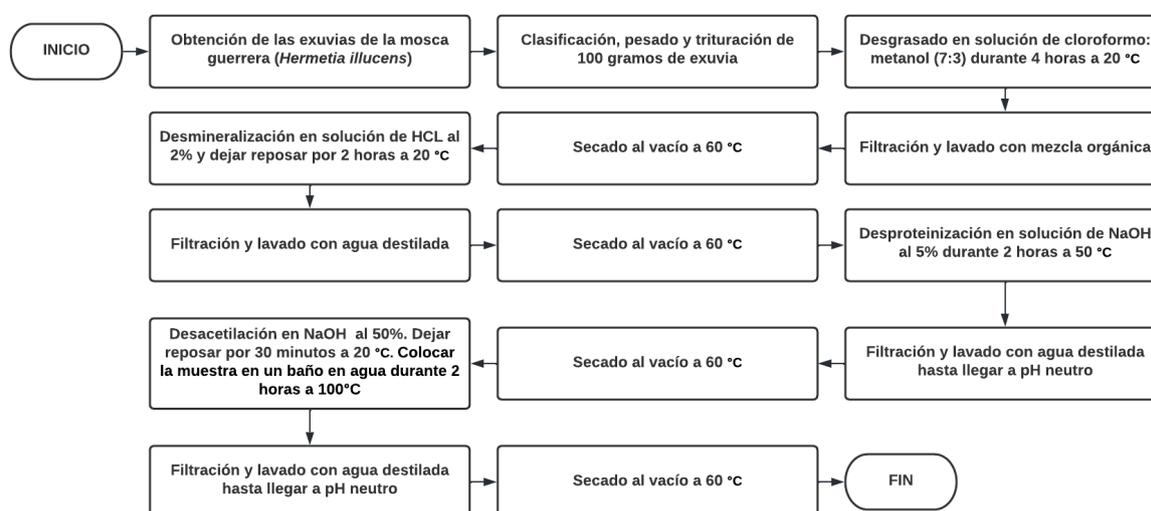
Desacetilación

Al obtener la quitina pristina, se realizó un proceso desacetilación. Este proceso consistió en la eliminación de un grupo acetil ($\text{C}=\text{O}-\text{CH}_3$) dando lugar al grupo amino (NH_2). Se agregó una solución de NaOH al 50% (p/v) a 7.5 g de quitina pristina. Luego, se dejó reposar a una temperatura ambiente

(20 °C) por 30 minutos. Posterior a ello, se colocó la muestra en un baño en agua a una temperatura de 100 °C durante dos horas con agitación ocasional. Luego, se filtró y lavó hasta llegar a un pH neutro con agua destilada y se realizó un deshidratado al vacío a 60 °C. Por último, se trituró la muestra en un molino FOSS CT193 Cyclotec con el fin de reducir el tamaño de partícula de la muestra, haciendo uso de un tamiz de 150 μm . Todo el proceso realizado a la quitina pristina y el quitosano se adoptó de la metodología descrita por Khayrova et al. (2019) y se resume en la Figura 1.

Figura 1

Flujo de Proceso de Extracción de Quitina Pristina y Preparación de Quitosano.



Grado de Desacetilación

Posterior al obtener el quitosano se determinó el grado de desacetilación del quitosano extraído de *Hermetia illucens* a través de un análisis potenciométrico. Para determinar el contenido de grupos aminos de ambas muestras de quitosano se realizó una titulación potenciométrica ácido-base por duplicado. Se utilizó 20 mL de HCl 0.3M (v/v) y se tituló con una solución de NaOH 0.1M (p/v). Para ello, se disolvió 0.5 g de quitosano en 20 mL de HCl 0.3M. Para aumentar la eficiencia de la titulación, se dejó reposar durante 36 horas a una temperatura de 4 °C con el fin de permitir la hidratación total de las moléculas.

Después de 36 horas, se comenzó con el proceso de titulación a través de método propuesto por Broussignac (1968), con modificaciones. Esta consistió en medir las variaciones de los valores de pH al titular una solución de quitosano (Huaracha Canaza 2016). La disolución se tituló con una solución de NaOH 0.1 M y se midió el cambio de pH cada 2 mL. La titulación se realizó de manera lenta y con agitación continua para homogenizar la solución.

Con los datos obtenidos se desarrolló una representación gráfica de cambio de pH versus el volumen gastado de NaOH 0.1 M. La representación gráfica se desarrolló en el programa Microsoft Excel donde se obtuvo los puntos de inflexión, los cuales permitieron determinar el porcentaje de grupos aminos presentes en la estructura de la macromolécula. La concentración del grupo amino se determinó por la Ecuación 1.

$$\%NH_2 = \frac{16.1(Y - X)}{W} f \quad [1]$$

Donde:

Y= Punto de inflexión mayor (mL).

X= Punto inflexión menor (mL).

f= Molaridad de la solución de NaOH.

W= Peso de la muestra (g).

16.1= Valor relacionado con el peso equivalente del quitosano.

Elaboración de Películas

Elaboración de Solución de Quitosano al 1%

La solución de quitosano se realizó a través del método descrito por Triunfo et al. (2022). Se pesó un gramo de quitosano y a la vez, se midió 99 mL de agua destilada y se agregó 1% de ácido acético, debido a que el quitosano se caracteriza por ser insoluble en agua y soluble en ácidos orgánicos. Posterior a ello, se mezcló el quitosano en una concentración de 1.0 (p/v) con la solución de ácido acético al 1% (v/v) hasta alcanzar la temperatura de 60 ± 2 °C en agitación constante. Cuando

alcanzó la temperatura mencionada anteriormente, se dejó enfriar y se mantuvo en constante agitación a 400 rpm por 24 horas para obtener una mejor solubilización de las moléculas.

Elaboración de Solución de Gelatina al 2%

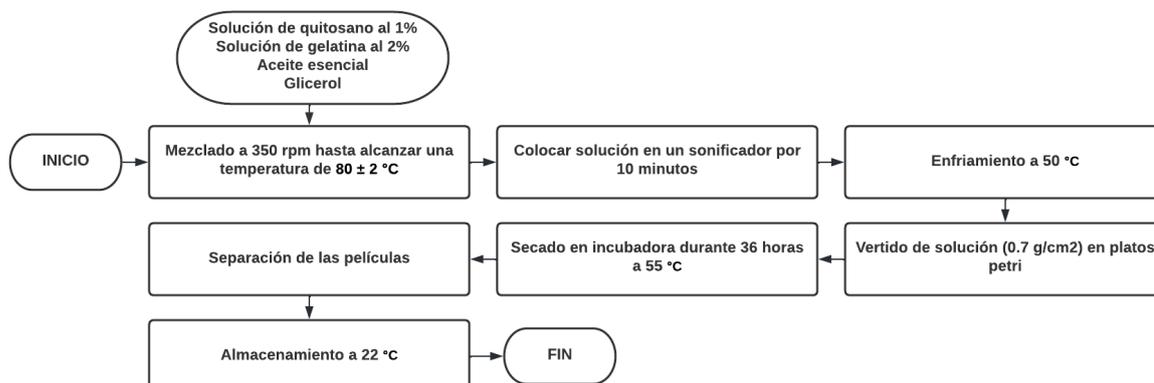
La solución de gelatina se realizó a través del método descrito por Sakthiguru y Sithique (2020) con modificaciones. Se pesó dos g de gelatina y a la vez, se midió 100 mL de agua destilada. Posterior a ello, se mezcló la gelatina en una concentración de 2.0 (p/v) a una temperatura de 60 ± 2 °C en agitación constante. Debido a que es una proteína, al mantenerlo en agitación constante y a altas temperaturas se formó burbujas de aire, por lo tanto, se sometió la solución de gelatina a un tratamiento con ultrasonido durante 10 minutos con el objetivo de eliminar esas burbujas, etapa que fue agregada al proceso.

Elaboración de las Películas por el Método de Casting

Se realizaron pruebas preliminares para establecer la formulación de cada tratamiento. La formulación final se muestra en el Cuadro 2. Se utilizó el método de casting (Vaciado en Placa) para la elaboración de la película. Este método consiste en un proceso de elaboración en el cual un material líquido es vaciado en un molde y luego se solidifica a un determinado tiempo, temperatura y humedad controlada para formar películas homogéneas (Wang et al. 2021). Para la elaboración de la película se mezcló la solución de quitosano al 1%, solución de gelatina al 2%, el aceite esencial y el glicerol en un beaker. Posterior a ello, se colocó en una plancha magnética con agitación constante hasta alcanzar una temperatura de 80 ± 2 °C a 350 rpm. En caso de formación de burbujas, se introdujo al sonificador por 10 min y se dejó enfriar hasta que alcanzó una temperatura de 50 °C. Luego se vertió la solución (0.70 g/cm^2) en platos Petri. Seguidamente, se secó a 55 °C durante 36 horas en la incubadora. Finalmente, se almacenaron las películas a 22 °C. El proceso de la elaboración de las películas se resume en la Figura 2.

Figura 2

Flujo de Proceso de Elaboración de Película.

**Cuadro 2**

Formulación para Elaboración de las Películas, Según Tratamiento.

Tratamiento	Solución de Quitosano (%)	Solución de Gelatina (%)	Aceite esencial de Romero (%)	Glicerol (%)
TRT1	48.875	48.875	1.000	1.250
TRT2	57.450	38.300	3.000	1.250
TRT3	58.650	39.100	1.000	1.250
TRT4	47.875	47.875	3.000	1.250

Nota. TRT = tratamiento. % = porcentaje.

Caracterización de la Película

Se realizó análisis físico-mecánicos, químicos y de barrera a cada tratamiento de la película.

Análisis Físico-mecánicos

Se analizaron las propiedades físicas y mecánicas de interés haciendo uso de un analizador de textura Brookfield CT3 4500. Para ello, se realizó una prueba de extensibilidad de las películas con el fin de obtener la información sobre el porcentaje de deformación, resistencia a la perforación, fuerza de tensión y Módulo de Young.

Grosor.

Se midió el grosor con un micrómetro digital Mitutoyo (Modelo 293-348-30) con una precisión de ± 0.001 mm. Se realizaron 15 mediciones en diferentes puntos al azar para determinar el espesor promedio de cada película.

Resistencia a la Perforación.

De acuerdo con el método propuesto Rocha (2009), para esta prueba se cortaron tiras de un tamaño de 50 mm de longitud y 25 mm de ancho para cada película y se analizó con el texturómetro Brookfield CT3 4500 con una sonda TA44 de 4 mm de diámetro a una velocidad de 1 mm/segundo. La fuerza de perforación se calculó en base al desplazamiento de la sonda hasta lograr la rotura de la película. Así mismo, se midió el grosor medio de cada película para determinar la resistencia a la perforación según la siguiente Ecuación 2.

$$\text{Resistencia a la perforación (h)} = \frac{F_p}{L} \quad [2]$$

Donde:

h = Resistencia a la perforación.

F_p = Pico de fuerza antes de la ruptura (N).

L = Grosor de la película (mm).

Módulo de Young.

Se determinó utilizando un texturómetro Brookfield CT3 4500, en conjunto con una sonda TA-DGA. Se utilizó una distancia entre mordazas de 50 mm a una velocidad inicial de 1 mm/segundo. Para ello, se cortó tiras de 70 mm de largo y 10 mm de ancho de cada película para poder determinar el esfuerzo perpendicular necesario al estiramiento y la fractura de cada película. La prueba de elongación permite obtener tres propiedades: fuerza de tensión a ruptura, deformación y módulo de Young. Se determinó el estrés de tensión, el cual consistió en una relación entre la fuerza necesaria para romper la película (N) y el área de la sección transversal de la misma (m²) (Vicentini 2003). El área transversal se calculó utilizando la información del grosor y ancho de las tiras.

Se registró y graficó los datos obtenidos de estrés de tensión (GPa) y deformación para determinar el módulo de Young (el resultado de este parámetro se usó para determinar la pendiente del área lineal de la gráfica). Para establecer el módulo de Young, se utilizó la Ecuación 3, y la tensión

de estrés se calculó mediante la Ecuación 4 y la deformación en la ruptura por medio de la Ecuación 5:

$$\text{Módulo de Young} = \frac{\text{Tensión de estrés (MPa)}}{\text{Deformación}} \quad [3]$$

$$\text{Tensión de estrés} = \frac{C_m}{A_t} \quad [4]$$

Donde:

C_m = Carga máxima (N).

A_t = Área transversal de la película (m^2).

$$\text{Deformación lineal (\%)} = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100 \quad [5]$$

Donde:

L = Longitud final.

L_0 = Longitud inicial.

Opacidad.

Para la medición de la opacidad aparente se adoptó el método utilizado por Shiku et al. (2004). Para ello, se utilizó el espectrofotómetro marca Agilent modelo Cary 8454. Luego, se configuró la banda de longitud de onda de barrido de luz a 500 nm de absorbancia para cada película. Posteriormente, se calibró el equipo, en donde se utilizó el aire como blanco. Por último, para medir la absorbancia, se colocó en la celda tiras de las películas con un tamaño de 50 mm de largo y 10 mm de ancho. La opacidad se calculó utilizando Ecuación 6.

$$\text{Opacidad} = \frac{Abs_{500}}{T} \quad [6]$$

Donde:

Abs_{500} = Absorbancia.

T = grosor de la película, (mm).

Análisis de Barrera

Se realizó análisis de solubilidad en agua y permeabilidad al vapor de agua de cada película.

Solubilidad en Agua.

Se determinó a través del método E96-80 descrito por la norma ASTM (2002), se cortó círculos de cada película con un diámetro de 20 mm, se registró el peso inicial y se colocó en cubilete con 30 mL de agua destilada, durante 24 horas con agitación constante. Posteriormente, se eliminó el agua haciendo uso de un filtro para recuperar todos los sólidos provenientes de la película. Se secó el contenido obtenido después de la eliminación de agua en un horno a 105 °C por 24 horas.

Se registró el peso final luego del secado y se evaluó el porcentaje de solubilidad mediante la Ecuación 7.

$$\% \text{Solubilidad} = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \times 100 \quad [7]$$

Donde:

P_i = Peso inicial.

P_f = Peso final.

Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA).

Se utilizó el método descrito por Gontard et al. (1992), en donde se cortó círculos de 25 mm de diámetro de cada película, se registró su peso y se insertó en la tapa de un vaso volumétrico con 30 mL de agua destilada. Se monitoreó y registró el peso de la película a la misma hora durante nueve días consecutivos. Los datos obtenidos se graficaron y posteriormente se calculó la PVA utilizando la Ecuación 8.

$$\text{PVA} = m \left(\frac{x}{A \Delta P} \right) \quad [8]$$

Donde:

m = Pendiente de la pérdida de peso de la película en función del tiempo (g/día).

A = Área de permeabilidad (m^2).

x = Grosor de la película (m).

ΔP = Diferencia de presiones entre el gel de silicato (0 kPa a 25 °C) y el vapor de agua pura (3.167 kPa a 25 °C).

Análisis Microbiológicos

Para este análisis se usó el método del antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer et al. (1966), en donde se utilizó las muestras de las películas individualmente contra dos bacterias Gram negativa (*Salmonella Typhymurium* y *Escherichia coli*).

De acuerdo con Picazo (2000), el método de antibiograma disco-placa consiste en colocar en la superficie del agar, previamente inoculada, discos impregnados con diferentes antibióticos. Para ello, se cortaron discos de 1 cm de diámetro de las películas con un bisturí esterilizado. Se inoculó cada microorganismo con un hisopo en una placa con agar cuenta estándar. Posteriormente, se colocaron los discos en contacto directo con el medio y se incubaron a una temperatura de 37 °C por 24 horas.

Al haber transcurrido las 24 horas, se determinó la zona de inhibición al medir el halo obtenido con una regla y se le resto el diámetro de la película para evaluar sus capacidades antimicrobianas.

Diseño Experimental

Se usó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con un arreglo factorial 2×2 (Cuadro 3) y tres repeticiones para el análisis de la efectividad antimicrobiana, la evaluación de las pruebas físicas, mecánicas y de barrera de la película. Se analizó un total de 12 unidades experimentales.

Cuadro 3*Descripción de los tratamientos.*

Tratamiento	Relación Quitosano: Gelatina	Aceite esencial de Romero (%)
TRT1	50:50	1
TRT2	60:40	3
TRT3	60:40	1
TRT4	50:50	3

Nota. TRT = tratamiento. % = porcentaje.**Análisis Estadístico**

Para el análisis estadístico de los resultados de las evaluaciones experimentales se utilizó el programa "Statistical Analysis System" (SAS versión 9.4®). Se hizo un análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significancia de 95% y una probabilidad ≤ 0.05 . Se utilizó una separación de medias Duncan para determinar diferencias significativas entre los factores principales y LSMEANS para evaluar las interacciones entre las variables independientes.

Resultados y Discusión

Extracción de Quitina Pristina

Dado que la exuvia posee altos contenidos de lípidos ($\leq 40\%$), se realizó un proceso preliminar de desgrasado (Tan et al. 2021). Esto se debe a que los lípidos o componentes de cera dificultan el proceso de hidrólisis durante la reacción de desacetilación (Khayrova et al. 2022). Por lo tanto, al utilizar una mezcla de solventes orgánicos se extrajo los lípidos presentes en la exuvia y como resultado se obtuvo en promedio 91.83 ± 1.17 g de quitina desgrasada por cada 100 g de muestra inicial (rendimiento = 91.83%). Esto concuerda con el estudio realizado por Khayrova et al. (2019), en donde obtuvieron un rendimiento del 93.00% del material desgrasado.

Posteriormente, se realizó un proceso de desmineralización. En este proceso se utilizó ácidos orgánicos con el fin de remover sales minerales, principalmente el carbonato de calcio. Según Younes y Rinaudo (2015), este tratamiento varía de acuerdo con el grado de mineralización de caparazón, tiempo de extracción, tamaño de partícula, concentración del ácido y proporción del solvente/soluto. En la presente investigación se obtuvo un rendimiento del 64.79% (59.50 ± 3.94 g), por lo que se asemeja al estudio realizado por Khayrova et al. (2019), donde obtuvieron un rendimiento del 59%.

Luego de haber concluido con el proceso de desmineralización, se prosiguió con el desproteínizado. Para ello, se utilizaron soluciones alcalinas para la extracción de proteínas. A la vez, se pueden implementar alternativas para este proceso, las cuales son realizar una desproteínización enzimática o microbiana (Bhavsar et al. 2021). En el caso del presente estudio, se obtuvo 39.50 ± 1.17 g (rendimiento = 66.39%). Estos valores superan al estudio realizado por Khayrova et al. (2019), en donde ellos tuvieron 25 g de quitina pristina (rendimiento = 45.00%).

Preparación del Quitosano

Al haber completado la de extracción de la quitina pristina, se prosiguió con la preparación del quitosano. Para ello, se realizó un proceso de desacetilación, en donde se utilizó una solución alcalina para remover los grupos acetilos. Este proceso le provee propiedades antimicrobianas debido a que tienen la capacidad de realizar interacciones iónicas en la superficie y dentro de las células

bacterianas (Jiang et al. 2021). Así mismo, menciona que las cargas positivas del quitosano ionizan las cargas negativas de la superficie de las células bacterianas provocando una lisis o ruptura de la pared celular. Algunos factores que influyen en el proceso de desacetilación son las concentraciones de las soluciones alcalinas, la temperatura, el tiempo y las condiciones atmosféricas (Younes y Rinaudo 2015). En la presente investigación, se obtuvo 17 ± 1.03 g de quitosano (rendimiento = 42.19%). Estos valores superan al estudio realizado por Khayrova et al. (2019), en donde ellos tuvieron 13 g de quitosano (rendimiento = 52.00%). La extracción y preparación se resume en el Cuadro 4.

Cuadro 4

Rendimiento de Extracción de Quitina Pristina y Preparación de Quitosano.

	Desgrasado \pm D.E.	Desmineralizado \pm D.E.	Desproteínizado \pm D.E.	Desacetilación \pm D.E.
Rendimiento (%)	91.83 ± 1.17	64.79 ± 3.94	66.39 ± 3.33	42.19 ± 1.03
CV (%)	1.27	6.62	8.43	6.20

Nota. D.E. = Desviación Estándar. % = porcentaje. CV = Coeficiente de Variación Rendimiento con base en 100 g de exuvia de *Hermetia illucens*.

Grado de Desacetilación

Acorde a Czechowska-Biskup et al. (2012), el grado de desacetilación es uno de los parámetros principales para caracterizar el quitosano. El grado de desacetilación se define como el porcentaje de grupos aminos libres en el quitosano, que determina la solubilidad de la molécula y su bioactividad. Es decir, se considera quitosano a la quitina que ha sido desacetilada en un 60 - 75% o más. Por otro lado, la solubilidad del quitosano en soluciones acuosas dependerá del pH dado que el pH tiene una relación inversamente proporcional con la solubilidad del quitosano (Diop 2009). De modo que, el grado de desacetilación del quitosano dependerá de las condiciones de reacción y el método de purificación. Por lo tanto, es importante determinar el grado de desacetilación del quitosano antes de su uso. Existen distintos métodos para determinar el grado de desacetilación, uno de los más utilizados es la espectroscopia de infrarrojo transformada de Fourier (FTIR) (Martínez Camacho 2009). En este estudio, se realizó mediante una titulación potenciométrica, en donde se tomaron los puntos de inflexión y posteriormente se calculó el porcentaje de grupos aminos presentes en la molécula. La

medición se realizó por duplicado, y en el Cuadro 5 se puede observar que se obtuvo un promedio de 83.72% para el grado de desacetilación del quitosano utilizado para la elaboración de las películas en la presente investigación.

Cuadro 5

Grado de desacetilación.

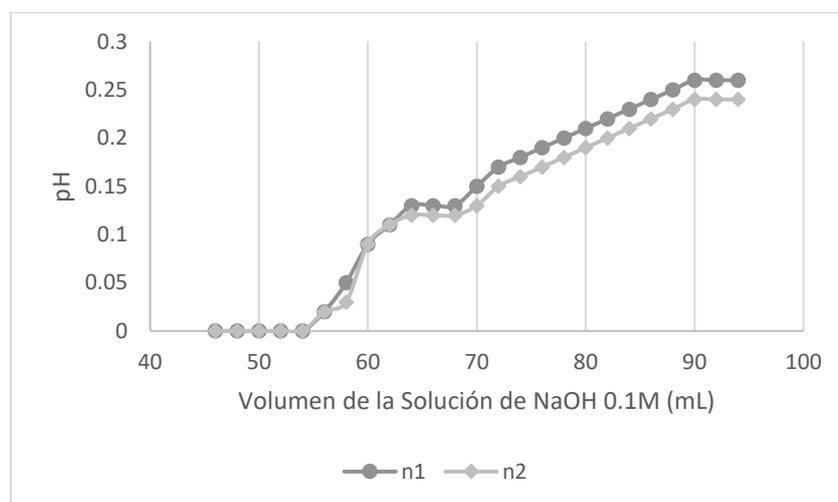
	Media \pm D.E.
Grado de Desacetilación (%)	83.72 \pm 0.00
CV (%)	0.00

Nota. % = porcentaje. D.E. = Desviación Estándar. C.V. = Coeficiente de Variación.

La determinación del contenido de grupos aminos en el quitosano se realizó por el método de titulación potenciométrica ácido-base propuesto por Broussignac (1968). En la Figura 3 se puede observar el punto de inflexión menor **X** y el punto de inflexión mayor **Y** de cada repetición, ambos expresados como volúmenes. La diferencia entre ambas abscisas es la cantidad de ácido requerido para protonar los grupos aminos del quitosano. Se puede observar en la Figura 1 que ambos duplicados presentaron un grado de desacetilación del 83.72%. El punto de inflexión mayor **Y** fue de 90 y 92 mL de NaOH. Por otra parte, el punto de inflexión menor **X** fue de 64 y 66 mL de NaOH, respectivamente.

Figura 3

Determinación del grado de desacetilación por titulación potenciométrica de la solución de quitosano Hermetia illucens. (Ácido clorhídrico 0.3 M por hidróxido de sodio 0.1 M).



Nota. n = número de muestras.

Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en el Grosor de las Películas

El grosor de una película puede verse influenciado por la formulación de esta. Los resultados obtenidos en el Cuadro 6 difieren de los valores obtenidos por Bohórquez et al. (2016), en películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de Tomillo y Romero. Los valores reportados variaron en un rango entre 0.063 a 0.104 mm, esta diferencia se puede deber principalmente a la cantidad de solución agregada por plato Petri. En el estudio antes mencionado se agregó 10 g de solución por plato Petri. Por otro lado, en la presente investigación se agregó 0.7 g de solución por cm², equivalente a 48.58 g de solución por plato Petri de 69.40 cm².

Cuadro 6

Grosor de películas.

Tratamiento	Relación Quitosano: Gelatina	Aceite esencial de Romero (%)	Grosor (mm) ± D.E.
TRT 1	50:50	1	0.191 ± 0.004 ^{AB}
TRT 2	60:40	3	0.184 ± 0.001 ^B
TRT 3	60:40	1	0.192 ± 0.005 ^A
TRT 4	50:50	3	0.173 ± 0.003 ^C
CV (%)			1.99

Nota. ^{A-C} Medias con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). TRT = tratamiento. % = porcentaje.

mm = milímetro. P = Probabilidad. D.E. = Desviación Estándar. CV = Coeficiente de Variación.

En el Cuadro 6 se observa que las variables independientes, relación de quitosano: gelatina y porcentaje de aceite esencial de romero, tuvieron un efecto significativo en los valores de grosor obtenidos ($P \leq 0.05$). Los tratamientos con mayor porcentaje de aceite esencial (TRT 2 y 4) presentaron un menor grosor, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Sánchez-González et al. (2010), al aumentar en un 3% aceite esencial de bergamota causó una disminución significativa en el grosor de películas de quitosano. Bohórquez et al. (2016), reportaron en su estudio que la adición de aceites esenciales disminuye significativamente el grosor de las películas en comparación a un control sin aceite esencial; sin embargo, al variar las concentraciones de este, no causó un efecto significativo en el grosor. Por otro lado, los resultados de grosor obtenidos por Fakhreddin Hosseini et al. (2013), indican que la concentración de aceites esenciales sí afecta significativamente el espesor de las

películas. Lo cual podría explicarse por la modificación de la composición de la matriz polimérica al incorporar aceites esenciales (Sánchez-González et al. 2010).

De acuerdo con la investigación realizada por Ahmed y Ikram (2016), los tratamientos con una relación de quitosano: gelatina (50:50) tuvieron un menor grosor, en comparación con los tratamientos que tenían una relación (60:40). No obstante, el grosor de dichos tratamientos fue estadísticamente igual, lo cual concuerda con los valores obtenidos en el tratamiento uno y tres del presente estudio. Además, según Alvarado et al. (2007) en su estudio demuestra que las películas con mayor concentración de quitosano obtuvieron un mayor espesor.

La probabilidad mostrada en el Cuadro 7 indica que no hubo una interacción entre la relación quitosano: gelatina y el porcentaje de aceite esencial ($P > 0.05$). Por lo que dichos factores juntos no tienen un efecto significativo en el grosor de las películas.

Cuadro 7

Probabilidad e Interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en el Grosor.

Variable	P
Relación Quitosano: Gelatina	0.0339
Aceite Esencial de Romero	0.0009
Relación Quitosano: Gelatina * Aceite Esencial de Romero	0.0793
CV (%)	1.99

Nota. P = Probabilidad. CV = Coeficiente de Variación. % = porcentaje.

Adicionalmente, la incorporación de gelatina en películas aumenta el grosor de estas de manera lineal, acorde a Montenegro Rojas (2020).

Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Resistencia a Perforación de las Películas

De acuerdo con la norma ASTM (2021), la resistencia a la perforación es el índice de la resistencia que ofrece un material plástico al ser desgarrado en un determinado punto de la superficie. Para ello, las películas no pueden tener un espesor mayor a 0.25 mm. Por lo tanto, las películas cumplen con los parámetros establecidos según esta norma mencionada anteriormente.

Los datos recopilados por Rosales-Oballos et al. (2012), indican que la incorporación de aceites esenciales en las películas tuvo un efecto significativo sobre la fuerza de ruptura, en donde se

produjeron películas con menores valores de resistencia de perforación. No obstante, en el presente estudio podemos observar que en el Cuadro 8 el tratamiento dos y cuatro, los cuales contienen mayor porcentaje de aceite esencial (3%), presentaron valores altos de resistencia a la perforación. Por otra parte, Sánchez-González et al. (2010) indicó que las películas con quitosano presentaron mejores propiedades mecánicas que aquellas que tenían añadido aceite esencial de bergamota. Por lo que el tratamiento dos, con mayor cantidad de quitosano (60%), presentó mayor resistencia a la perforación. Adicionalmente, la gelatina posee buenas propiedades mecánicas, por lo tanto, una alternativa para mejorar las propiedades mecánicas de las películas es la combinación de proteínas y polisacáridos (Elsabee y Abdou 2013), en este caso quitosano y gelatina.

Cuadro 8

Resistencia a la perforación de las películas.

Tratamiento	Relación Quitosano: Gelatina	Aceite esencial de Romero (%)	Resistencia a la perforación (N/mm) ± D.E.
TRT 1	50:50	1	15.66 ± 1.18 ^C
TRT 2	60:40	3	49.02 ± 2.51 ^A
TRT 3	60:40	1	33.54 ± 3.31 ^B
TRT 4	50:50	3	38.32 ± 3.35 ^B
CV (%)			9.17

Nota. ^{A-C} Medias con letras diferentes que indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). TRT = tratamiento. % = porcentaje. N = newton. mm = milímetro. P = Probabilidad. D.E. = Desviación Estándar. CV = Coeficiente de Variación.

En el Cuadro 9 se muestra que las variables independientes de esta investigación presentaron un efecto significativo sobre los resultados obtenidos de la resistencia a la perforación ($P \leq 0.05$). Por otro lado, la interacción entre la relación quitosano: gelatina y el porcentaje de aceite esencial de romero no tuvieron un efecto significativo ($P > 0.05$) sobre la resistencia de las películas.

Cuadro 9

Probabilidad e interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Resistencia a la Perforación.

Variable	P
Relación Quitosano: Gelatina	0.0002
Aceite Esencial de Romero	< 0.0001
Relación Quitosano: Gelatina * Aceite Esencial de Romero	0.0943
CV (%)	9.17

Nota. P = Probabilidad. CV = Coeficiente de Variación. % = porcentaje.

Además, otro factor que influye sobre la resistencia a la perforación es el glicerol. Según Zavala Arrendo et al. (2017), incorporar un plastificante corrige la rigidez molecular del quitosano, reduciendo así las fuerzas intermoleculares a lo largo de la cadena polimérica. Por lo tanto, al incrementar la cantidad de plastificante se aumenta la fuerza requerida para romper la película.

Efecto de la Relación Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en el Módulo de Young de las Películas

En el estudio realizado por Rayas et al. (2003), se definieron el módulo de Young como la relación del esfuerzo con la deformación unitaria que experimenta un objeto al ser sometido a cargas externas. Este es un indicador que permite determinar las propiedades mecánicas de las películas y su composición, puede tener un efecto sobre dichas propiedades. Para ello, se necesita calcular los valores de fuerza de tensión y deformación lineal. De acuerdo con Pal et al. (2022), la fuerza de tensión lo definieron como el estrés máximo que un material tolera antes de romperse cuando se le aplica una determinada carga. Así mismo, este factor tiene una relación directamente proporcional con el módulo de Young. Por otro lado, la deformación lineal se definió como el cambio de longitud por unidad de longitud original de una línea recta (Ayala Estrada 1984). Este factor tiene una relación inversamente proporcional con el módulo de Young.

En el Cuadro 10 se presentan los resultados obtenidos del análisis de módulo de Young. Se puede observar que existen diferencias estadísticas entre todos los tratamientos. De acuerdo con los resultados, los tratamientos que poseen un 3% de aceite esencial de romero (TRT 3 y 4) presentaron un menor módulo de Young. Esto concuerda con los resultados por Castro Jiván et al. (2021), que indican que la adición de aceite esencial de árbol de té a la matriz debilita las uniones de hidrógeno, provocando una menor resistencia a la fractura. Así mismo, los datos obtenidos por Stanescu et al. (2021), son similares a los datos de la presente investigación, en donde se obtuvieron valores de 5.5-6 GPa debido a la mayor densidad de la matriz que es proporcionada por la interacción que existe entre el quitosano y gelatina.

Cuadro 10*Módulo de Young.*

Tratamiento	Relación Quitosano: Gelatina	Aceite esencial de Romero (%)	Módulo de Young (GPa) ± D.E.
TRT 1	50:50	1	7.89 ± 0.67 ^A
TRT 2	60:40	3	3.50 ± 0.06 ^C
TRT 3	60:40	1	5.26 ± 0.19 ^B
TRT 4	50:50	3	2.29 ± 0.15 ^D
CV (%)			7.87

Nota. ^{A-C} Medias con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). TRT = tratamiento. % = porcentaje.

GPa = gigapascales. P = Probabilidad. D.E. = Desviación Estándar. CV = Coeficiente de Variación.

En el Cuadro 11 se observa la probabilidad e interacción de nuestras variables independientes con respecto a la variable respuesta. Se obtuvo diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en las variables independientes, así como en la interacción entre ellas.

Cuadro 11

Probabilidad e interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en el Módulo de Young.

Variable	P
Relación Quitosano: Gelatina	0.0168
Aceite Esencial de Romero	< 0.0001
Relación Quitosano: Gelatina * Aceite Esencial de Romero	0.0001
CV (%)	7.87

Nota. P = Probabilidad. CV = Coeficiente de Variación. % = porcentaje.

Adicionalmente, otros factores que pueden tener un efecto sobre el módulo de Young son los plastificantes. De acuerdo Srinivasa et al. (2007), con la adicción de pequeñas cantidades de glicerol en películas puede reducir hasta un 50% de los valores del módulo de Young.

Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Opacidad

La opacidad de las películas es influenciada por el tipo y la concentración de sus componentes (Atarés y Chiralt 2016). Además, la opacidad se relaciona directamente con el aspecto visual de las películas, por lo que debe ser atractivo para el consumidor (Escobar Guadarrama 2020). El grado de transparencia de las películas depende de la estructura del polímero utilizado, entre más cristalino más opaca será la película y entre más amorfo será más transparente. De igual forma, su grosor incide en la opacidad (Crippa 2006).

En el Cuadro 12 se puede observar que no hay diferencias significativas entre los tratamientos. Sin embargo, según Sánchez-González et al. (2010), las películas se vuelven menos opacas con la adición de aceites esenciales. Esto se debe a que las películas de quitosano están constituidas por cadenas densamente empaquetadas que provocan su opacidad. Dicha estructura se ve afectada por la presencia de la fase dispersa del aceite, donde los cuerpos lipídicos interrumpen la matriz continua de quitosano, causando así una estructura más abierta y una película más transparente.

Cuadro 12

Opacidad.

Tratamiento	Relación Quitosano: Gelatina	Aceite esencial de Romero (%)	Opacidad (UA/mm) \pm D.E. ^{N/S}
TRT 1	50:50	1	11.90 \pm 1.04
TRT 2	60:40	3	11.81 \pm 0.70
TRT 3	60:40	1	11.10 \pm 0.43
TRT 4	50:50	3	11.71 \pm 0.71
CV (%)			6.68

Nota. N/S = no hay diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos. TRT = tratamiento. P = Probabilidad. % = porcentaje. UA = unidades de absorbancia. mm = milímetros. D.E. = Desviación Estándar. CV = Coeficiente de Variación.

Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Solubilidad

La solubilidad es una propiedad física que poseen las biopelículas para disolverse en el agua (Arham et al. 2015). Por consiguiente, la solubilidad que se desee en una película será según el uso y aplicación que se le quiera dar. En el caso de los productos con alto contenido de humedad se debe evitar el uso de películas con una alta solubilidad. Por lo tanto, la solubilidad de las películas está relacionada a la hidrofiliidad de las mismas (Ahmed y Ikram 2016).

El Cuadro 13 indica que el Tratamiento 3, el cual posee un 60% de contenido de quitosano, obtuvo un valor menor de solubilidad en comparación al Tratamiento 1. Lo cual se debe a la naturaleza hidrofóbica del quitosano. El quitosano se caracteriza por ser insoluble en agua y soluble en ácidos orgánicos, como el ácido acético glacial (Villar Calero 2021). Por otro lado, estudios demuestran que la adición de gelatina en películas de quitosano aumenta la solubilidad en agua. Por lo que los tratamientos que poseen una relación quitosano: gelatina del 50:50, presentaron una mayor solubilidad. Esto se debe a la naturaleza hidrofílica de la gelatina y su solubilidad en agua.

Cuadro 13*Solubilidad en Agua.*

Tratamiento	Relación Quitosano: Gelatina	Aceite esencial de Romero (%)	Solubilidad (%) ± D.E.
TRT 1	50:50	1	91.32 ± 1.16 ^{AB}
TRT 2	60:40	3	84.59 ± 4.47 ^{BC}
TRT 3	60:40	1	76.01 ± 7.37 ^C
TRT 4	50:50	3	94.82 ± 4.45 ^A
CV (%)			5.50

Nota. ^{A-C} Medias con letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). TRT = tratamiento. P = Probabilidad.

% = porcentaje. D.E. = Desviación Estándar. CV = Coeficiente de Variación.

En el Cuadro 14, la variable relación quitosano: gelatina, presentó diferencias significativas ($P \leq 0.05$). Por otro lado, en el porcentaje de aceite esencial de romero no se obtuvo diferencias significativas ($P > 0.05$), al igual que la interacción entre ambas variables. Lo que indica que el porcentaje de aceite esencial de romero no tuvo un efecto significativo en la variable dependiente, solubilidad. No obstante, según los resultados obtenidos por García et al. (2004), indican que la adición de aceite esencial de Tomillo aumentó significativamente la solubilidad de películas de quitosano en agua. Esto se debe a que hubo una ruptura de la matriz de la película al agregar dicho aceite. Por otro lado, Fakhreddin Hosseini et al. (2013), demuestran en su estudio que el aumento del porcentaje de aceite esencial de canela en 1 y 1.5%, causó una disminución del 45% de solubilidad en películas de quitosano y gelatina. Lo cual se debe al incremento de enlaces cruzados en la matriz polimérica.

Cuadro 14*Probabilidad e interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Solubilidad.*

Variable	P
Relación Quitosano: Gelatina	0.0036
Aceite Esencial de Romero	0.0707
Relación Quitosano: Gelatina * Aceite Esencial de Romero	0.3923
CV (%)	5.50

Nota. P = Probabilidad. CV = Coeficiente de Variación. % = porcentaje.

Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA)

Acorde a Huaracha Canaza (2016), definió la permeabilidad al vapor de agua como la cantidad de vapor que traspasa la superficie de un material por un determinado tiempo y diferencial de presión. Esta es una propiedad mecánica de una película que demuestra la habilidad que tiene para proteger los alimentos en contra del deterioro inducido por agua y mantener sus características organolépticas. En el Cuadro 15 se observan los datos recopilados de PVA, expresados en $\text{g/día}\cdot\text{m}\cdot\text{kPa}$, los cuales mostraron diferencias significativas entre tratamientos.

Las películas de quitosano presentan propiedades moderadas de permeabilidad al oxígeno, buenas propiedades de barrera al dióxido de carbono, pero alta permeabilidad al vapor de agua (Sánchez-González et al. 2010). Por consiguiente, se puede observar en el Cuadro 13 que los Tratamientos 2 y 3 con una relación de quitosano: gelatina del 60: 40, presentaron una mayor permeabilidad al vapor de agua. Esto se debe a que hay una menor longitud en las cadenas poliméricas, que facilitarían la difusión del vapor de agua a través de la película (Leceta et al. 2013). Adicionalmente, el tratamiento uno con una relación de quitosano:gelatina del 50:50, presentó el resultado más bajo de PVA. Esto se debe a que la combinación de gelatina y quitosano reduce la PVA debido a que la interacción entre ambos componentes reduce los espacios intersticiales en la matriz polimérica, por ende, permite una menor tasa de difusión de agua a través de la película (Ahmed y Ikram 2016).

Cuadro 15

Permeabilidad al Vapor de Agua.

Tratamiento	Relación Quitosano: Gelatina	Aceite esencial de Romero (%)	PVA ($\text{g/día}\cdot\text{m}\cdot\text{kPa}$) \pm D.E.
TRT 1	50:50	1	0.00028 ± 0.000026^D
TRT 2	60:40	3	0.30850 ± 0.023078^B
TRT 3	60:40	1	0.40755 ± 0.026085^A
TRT 4	50:50	3	0.20550 ± 0.015677^C
CV (%)			9.55

Nota. ^{A-C} Medias con letras diferentes que indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). TRT = tratamiento. P = Probabilidad. % = porcentaje. PVA = permeabilidad al vapor de agua g = g. m = grosor. kPa = kilopascal. D.E. = Desviación Estándar. CV = Coeficiente de Variación.

Por otro lado, los Tratamientos 2 y 4, que poseen un mayor porcentaje de aceite esencial, presentaron valores moderados de PVA en comparación al Tratamiento 3. Esto se debe a que la incorporación de aceites esenciales tiene un efecto significativo sobre la permeabilidad al vapor de agua. Los compuestos lipídicos tienden a mejorar las propiedades de barrera contra el agua en las películas, debido a su naturaleza hidrofóbica que disminuye la capacidad de absorción de agua de las películas (Sánchez-González et al. 2010).

El Cuadro 16 demuestra que las variables independientes del presente estudio presentaron diferencias significativas sobre los datos recopilados de permeabilidad al vapor de agua, así como en la interacción entre la relación quitosano: gelatina y el porcentaje de aceite esencial de Romero ($P \leq 0.05$).

Cuadro 16

Probabilidad e interacción de Quitosano: Gelatina y Aceite Esencial de Romero en la Permeabilidad al Vapor de Agua (PVA).

Variable	P
Relación Quitosano: Gelatina	< 0.001
Aceite Esencial de Romero	0.0058
Relación Quitosano: Gelatina * Aceite Esencial de Romero	< 0.001
CV (%)	9.55

Nota. P = Probabilidad. CV = Coeficiente de Variación. % = porcentaje.

Adicionalmente, otro factor que influyó en la permeabilidad al vapor de agua es el glicerol. Los plastificantes como el glicerol o sorbitol tienen la capacidad de reducir las interacciones entre biopolímeros. Por lo tanto, su adición aumenta el espacio intermolecular, provocando un incremento en la permeabilidad de las películas, debido a que favorece la adsorción-desorción de las moléculas de agua (Aguilar-Méndez et al. 2012).

Efecto de la Relación Quitosano:Gelatina y Aceite Esencial de Romero en las Propiedades Antimicrobianas de las Películas

Según Romani Sanchez (2016), la actividad antimicrobiana es la capacidad que posee un determinado compuesto para inhibir el crecimiento de una población bacteriana. En el Cuadro 17 se muestra los resultados obtenidos en la evaluación del halo de inhibición en milímetros (mm) de la película contra *Salmonella Thyphimurium* y *Escherichia coli*. Los tratamientos 2, 3 y 4 no presentaron diferencias estadísticas contra *Salmonella Thyphimurium*. Por otro lado, el tratamiento dos y tres no presentaron diferencias estadísticas contra *Escherichia coli*. De acuerdo con el estudio realizado por Park et al. (2004), el quitosano con un 75% de desacetilación inhibió el crecimiento de bacterias Gram negativas como *E. coli*, *S. Thyphimurium* y *P. aeruginosa*. En esta investigación el grado de desacetilación del quitosano fue de $84.44 \pm 1.23\%$ y según Liu et al. (2004), la capacidad antimicrobiana del quitosano es causada por la interacción electrostática entre los grupos aminos del quitosano y los grupos fosforilos de los fosfolípidos, los cuales son componentes estructurales de la membrana celular de las bacterias. Por lo que la capacidad antimicrobiana es proporcional al grado de desacetilación. Sin embargo, Qin et al. (2006), en su estudio indican que la capacidad antimicrobiana del quitosano se debe al quitosano insoluble en agua, que debido al pH neutro de la célula hace que la molécula se precipite y se acumule en la superficie, formando así una capa impermeable alrededor de la célula y bloqueando los canales, los cuales, son cruciales para las células vivas. La formación de dicha capa impide el transporte de solutos y puede causar una desestabilización de la pared celular, causando así una fuga de constituyentes celulares, lo cual puede provocar la muerte celular.

Cuadro 17*Propiedades antimicrobianas de las películas.*

Tratamiento	Relación Quitosano: Gelatina	Aceite esencial de Romero (%)	Halo de Inhibición (mm) ± D.E.	
			<i>Salmonella</i> <i>Thyphimurium</i>	<i>Escherichia coli</i>
TRT 1	50:50	1	1.15 ± 0.07 ^B	0.07 ± 0.02 ^C
TRT 2	60:40	3	2.15 ± 0.21 ^A	3.00 ± 0.70 ^A
TRT 3	60:40	1	1.50 ± 0.28 ^{AB}	2.50 ± 0.28 ^{AB}
TRT 4	50:50	3	1.50 ± 0.00 ^{AB}	1.65 ± 0.13 ^B
CV (%)			13.22	17.35

Nota. ^{A-C} Medias con letras diferentes que indican diferencias significativas entre tratamientos ($P \leq 0.05$). TRT = tratamiento. mm =

milímetros. % = Porcentaje. D.E. = Desviación Estándar. CV = Coeficiente de Variación.

Las propiedades antimicrobianas del aceite esencial tienen menor incidencia contra las bacterias Gram negativas, que contra las Gram positivas. Esto se atribuye a la presencia de una membrana externa hidrofílica en bacterias gram negativas que impide la penetración de los aceites esenciales de naturaleza hidrofóbica a la membrana celular (Al-Bayati 2008; Ambrosio et al. 2017). Según por Ravichandran et al. (2011), los aceites esenciales afectan la integridad de la membrana citoplasmática e interfieren los procesos metabólicos celulares de la bacteria. Esto se debe a que los compuestos 1,8 cineol, alcanfor y α -pineno son terpenos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de romero que le proporcionan las propiedades antimicrobianas (Zaouali et al. 2010).

El Cuadro 18 indica que las variables independientes tuvieron diferencias significativas sobre los resultados recopilados de propiedades antimicrobianas de las películas ($P \leq 0.05$). No obstante, no se presentó tuvo un efecto significativo la interacción entre ambas variables.

Cuadro 18

Probabilidad e interacción de relación de quitosano: gelatina y aceite esencial de Romero en las propiedades antimicrobianas de las películas.

Variable	<i>Salmonella</i> <i>Thyphimurium</i> (P)	<i>Escherichia coli</i> (P)
Relación Quitosano: Gelatina	0.0426	0.0034
% Aceite Esencial de Romero	0.0426	0.0180
Relación Quitosano: Gelatina * Aceite Esencial de Romero	0.3832	0.0908
CV (%)	13.2235	17.35

Nota. P = Probabilidad. CV = Coeficiente de Variación. % = porcentaje.

Según lo recopilado por Hashem Hos et al. (2008), a pesar de que el quitosano posee propiedades antimicrobianas, este no tiene la capacidad de migración de agentes activos. Es decir, el quitosano no se difundió a través del agar adyacente, no obstante, este tiene la capacidad de inhibir a los microorganismos que entra en contacto directo con los sitios activos del polímero.

Conclusiones

El grado de desacetilación obtenido del quitosano extraído de la exuvia de *Hermetia illucens* se encuentra dentro de los valores establecidos para ser considerado como quitosano.

La incorporación de aceite esencial reduce el grosor y el módulo de Young, y mejora las propiedades mecánicas de resistencia de perforación.

Las películas con menor cantidad de quitosano mejoraron su permeabilidad al vapor de agua y aumenta los valores de solubilidad.

El uso de quitosano en las películas y la adición de aceite esencial de romero presentan actividad antimicrobiana en ambas bacterias evaluadas, *Escherichia coli* y *Salmonella Typhimurium*.

Recomendaciones

Realizar un proceso de blanqueado para obtener mejores propiedades ópticas de las películas. Así mismo, al realizar dicho proceso se lograría incrementar el rendimiento de la extracción y la obtención en un mayor grado de desacetilación del quitosano.

Efectuar un proceso de purificación para la eliminación de posibles impurezas presentes en el polímero y realizar una prueba de biodegradabilidad de las películas.

Evaluar el efecto de la mezcla de gelatina, quitosano y aceite esencial de romero en productos hortofrutícolas mediante un estudio de vida anaquel.

Referencias

- Aguilar-Méndez A, San Martín-Martínez E, Espinoza Herrera NL, Sánchez-Flores M, Cruz-Orea A, Ramírez-Ortíz ME. 2012. Caracterización y aplicación de películas a base de gelatina-carboximetilcelulosa para la preservación de frutos de guayaba. *Sociedad Mexicana de Ciencias y Tecnología de Superficie y Materiales*. 1–7.
- Ahmed S, Ikram S. 2016. Chitosan and gelatin based biodegradable packaging films with UV-light protection. *J Photochem Photobiol B*. 163:115–124. eng. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.08.023.
- Al-Bayati FA. 2008. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. *J Ethnopharmacol*. 116(3):403–406. eng. doi:10.1016/j.jep.2007.12.003.
- Alvarado JdD, Almeida A, Arancibia M, Aparecida de Carvalho R, Amaral Sobral Pjd, Barbosa Habitante AM, Monterrey-Quintero ES, Sereno A. 2007. Método directo para la obtención de quitosano de desperdicios de camarón para la elaboración de películas biodegradables. *Afinidad*; [consultado el 29 de may. de 2022]. 64(531):605–611. <https://cutt.ly/0Jhwo4f>.
- Ambrosio CMS, Alencar SM de, Sousa RLM de, Moreno AM, Da Gloria EM. 2017. Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*. 97(5):128–136. doi:10.1016/j.indcrop.2016.11.045.
- Arham R, Mulyati MT, Metusalach M, Salengke S. 2015. Physical and mechanical properties of agar based edible film with glycerol plasticizer. *International Food Research Journal*. 1669–1675.
- Arroyave Sierra OJ, Chamorro Rengifo J, Ochoa Muñoz AF. 2019. Crecimiento de larvas de mosca soldado alimentadas con gallinaza, porcínaza y alimento para ponedoras. *Rev Colombiana Cienc Anim. RECIA*. 11(2):730. doi:10.24188/recia.v11.n2.2019.730.
- [ASTM] American Society for Testing and Materials. 2002. *Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials*. West Conshohocken, PA: ASTM International. 9 p. 2002; [actualizado 2002]. doi:10.1520/E0096-00E01.
- [ASTM] American Society for Testing and Materials. 2021. *Standard Test Method for Puncture-Propagation Tear Resistance of Plastic Film and Thin Sheeting*. West Conshohocken, PA: ASTM International. 2021; [actualizado 2021]. doi:10.1520/D2582-21.
- Atarés L, Chiralt A. 2016. Essential oils as additives in biodegradable films and coatings for active food packaging. *Trends in Food Science & Technology*. 48(1):51–62. doi:10.1016/j.tifs.2015.12.001.
- Ayala Estrada R. 1984. *Esfuerzo y Deformación en Dos Dimensiones [Mtr]*. Monterrey, México: Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Ayala Valencia G. 2015. Efecto Antimicrobiano del Quitosano: una Revisión de la Literatura. *Rev. Scientia Agroalimentaria*. 2:32–38.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*. 36(3):41–44.
- Bhavsar PS, Dalla Fontana G, Zoccola M. 2021. Sustainable Superheated Water Hydrolysis of Black Soldier Fly Exuviae for Chitin Extraction and Use of the Obtained Chitosan in the Textile Field. *ACS Omega*. 6(13):8884–8893. eng. doi:10.1021/acsomega.0c06040.

- Bohórquez NV, Enciso NAA, Hernández WA. 2016. Efecto del almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de tomillo y romero. *Matéria (Rio J.)*. 21(1):141–156. doi:10.1590/S1517-707620160001.0013.
- Broussignac P. 1968. A natural polymer not well known by the industry. *Chim Ind Genie Chim*. 99(9):1241–1247.
- Castro JI, Valencia-Llano CH, Valencia Zapata ME, Restrepo YJ, Mina Hernandez JH, Navia-Porras DP, Valencia Y, Valencia C, Grande-Tovar CD. 2021. Chitosan/Polyvinyl Alcohol/Tea Tree Essential Oil Composite Films for Biomedical Applications. *Polymers (Basel)*. 13(21). eng. doi:10.3390/polym13213753.
- Crippa A. 2006. Estudio do Desempenho do Filmes Multicamadas em Embalagens Termoformadas [Ing]. Curitiba, Paraná do Brazil: Universidad Federal do Paraná.
- Czechowska-Biskup R, Rokita B, Ulański P, Rosiak JM. 2012. Determination of degree of deacetylation of chitosan - Comparison of methods. *Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives*; [consultado el 29 de may. de 2022]. 7:1–23. https://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.psjd-9668be5e-5eca-4b30-8f83-12381cdf834e/c/17_01_005.pdf.
- Diop JD. 2009. Preparation and Characterization of Gelatin and Chitosan Films [Ing]. Massachusetts, United States.
- Elsabee MZ, Abdou ES. 2013. Chitosan based edible films and coatings: a review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 33(4):1819–1841. eng. doi:10.1016/j.msec.2013.01.010.
- Escobar Guadarrama JA. 2020. Elaboración y Caracterización de Biopelículas Elaboradas con Quitosano y Adicionadas con Partículas [Lic]. Toluca, México.
- Fakhreddin Hosseini S, Rezaei M, Zandi M, Ghavi FF. 2013. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chem*. 136(3-4):1490–1495. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2012.09.081.
- Frías AC, Izem Lema I, Gavilán García A. 2003. La situación de los envases de plástico en México. *Gaceta Ecológica*. (69):67–82.
- García M, Pinotti A, Martino M, Zaritzky N. 2004. Characterization of composite hydrocolloid films. *Carbohydrate Polymers*. 56(3):339–345. doi:10.1016/j.carbpol.2004.03.003.
- Gontard N, Guilbert S, Cuq J-L. 1992. Edible Wheat Gluten Films: Influence of the Main Process Variables on Film Properties using Response Surface Methodology. *Journal Food Science*. 57(1):190–195. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb05453.x.
- Hashem Hos M, Hadi Razav S, Mohammad A S, Ahmad Shah S, Ghorbani H A. 2008. Improving Antibacterial Activity of Edible Films Based on Chitosan by Incorporating Thyme and Clove Essential Oils and EDTA. *Journal of Applied Sciences*. 8(16):2895–2900. doi:10.3923/jas.2008.2895.2900.
- Huaracha Canaza MA. 2016. Estudio de la Permeabilidad al Vapor de Agua en Películas Modificadas de Quitosano [Ing]. Arequipa, Perú: Universidad Nacional de San Agustín Arequipa. 177 p. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v14n2/v14n2a11.pdf>.
- Jiang Y, Yin H, Zhou X, Wang D, Zhong Y, Xia Q, Deng Y, Zhao Y. 2021. Antimicrobial, antioxidant and physical properties of chitosan film containing *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. peel extract/montmorillonite and its application. *Food Chem*. 361:130111. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2021.130111.

- Khayrova A, Lopatin S, Shagdarova B, Sinitsyna O, Sinitsyn A, Varlamov V. 2022. Evaluation of Antibacterial and Antifungal Properties of Low Molecular Weight Chitosan Extracted from *Hermetia illucens* Relative to Crab Chitosan. *Molecules*. 27(2). eng. doi:10.3390/molecules27020577.
- Khayrova A, Lopatin S, Varlamov V. 2019. Black Soldier Fly *Hermetia illucens* as a Novel Source of Chitin and Chitosan. *International Journal of Sciences*. 8(04):81–86. doi:10.18483/ijSci.2015.
- Leceta I, Guerrero P, Ibarburu I, Dueñas MT, La Caba K de. 2013. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*. 116(4):889–899. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022.
- Martínez Camacho AP. 2009. Propiedades Estructurales y Fungistáticas de Biopelículas de Quitosano Obtenidos de Ensilados de Desecho de Camarón [Mtr]. Ciudad de México, Mexico: Universidad de Sonora. 104 p.
- Montenegro Rojas MJ. 2020. Efecto del alcohol de polivinilo (PVOH) en las propiedades físico-mecánicas de biopelículas elaboradas con aislado proteico de Sacha Inchic [Ing]. Tarapoto, Perú: Universidad Nacional de San Martín. 93 p.
- Montoya Cadavid G. 2010. Aceites Esenciales. 1ª ed. Manizales, Colombia: Universidad Nacional de Colombia - Manizales. ISBN: 978-958-8280-26-4.
- [OCDE] (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos). 2022. La contaminación por plástico crece sin cesar, en tanto que la gestión de residuos y el reciclaje se quedan cortos, dice la OCDE. [sin lugar]: [sin editorial]; [consultado el 16 de jun. de 2022]. <https://www.oecd.org/centrodemexico/medios/perspectivas-globales-del-plastico.htm>.
- Ortega Cardona CE, Aparicio Fernández X. 2020. Quitosano: una alternativa sustentable para el empaque de alimentos. *Revista Digital Universitaria*. 21(5):245. doi:10.22201/cuaieed.16076079e.2020.21.5.4.
- Pal T, Pramanik S, Verma KD, Naqvi SZ, Manna PK, Kar KK. 2022. Fly ash-reinforced polypropylene composites. En: Kar KK, editor. *Handbook of Fly Ash*. Vol. 9. [sin lugar]: Elsevier. p. 243–270.
- Picazo JJ. 2000. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. España. 54 p.
- Qin, C.; Li, H.; Xiao, Q.; Liu, Y.; Zhu, J.; Du, Y. (2006): Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. In *Carbohydrate Polymers* 63 (3), pp. 367–374. DOI: 10.1016/j.carbpol.2005.09.023.
- Ravichandran M, Hettiarachchy NS, Ganesh V, Ricke SC, Singh S. 2011. Enhancement of Antimicrobial Activities of Naturally Occurring Phenolic Compounds by Nanoscale Delivery Against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 And *Salmonella Typhimurium* In Broth And Chicken Meat System. *Journal of Food Safety*. 31(4):462–471. doi:10.1111/j.1745-4565.2011.00322.x.
- Rayas JA, Rodríguez-Vera R, Martínez A. 2003. Medición del módulo de Young en el hule látex usando ESPI. *Revista Mexicana de Física*. 555–564.
- Rocha GO. 2009. Obtenção e Caracterização de Filmes Biodegradáveis a partir de Misturas de Amido de Mandioca e Extrato Protéico de Soja [Mtr.]. [sin lugar]: Universidade Federal Rural Do Rio de Janeiro. 75 p.
- Romani Sanchez L. 2016. Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos aislados de la semilla de *Persea americana* Mill. “palta jass” frente a *Escherichia coli*. ATCC 35218, Ayacucho 2016. [Lic]. Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 69 p.

- Rosales-Oballos Y, Raybaudi-Massilia R, Mosqueda-Melgar J, Tapia de Daza MS, Tomé-Boshian E. 2012. Propiedades mecánicas, de barrera y antimicrobianas de películas de quitosano y películas de alginato de sodio con aceites esenciales y nisina. *Rev. Fac Farm.* 7–16.
- Sakthiguru N, Sithique MA. 2020. Fabrication of bioinspired chitosan/gelatin/allantoin biocomposite film for wound dressing application. *Int J Biol Macromol.* 152:873–883. eng. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.02.289.
- Sánchez-González L, Cháfer M, Chiralt A, González-Martínez C. 2010. Physical properties of edible chitosan films containing bergamot essential oil and their inhibitory action on *Penicillium italicum*. *Carbohydrate Polymers.* 82(2):277–283. doi:10.1016/j.carbpol.2010.04.047.
- Scartazzini L, Tosati JV, Cortez DHC, Rossi MJ, Flôres SH, Hubinger MD, Di Luccio M, Monteiro AR. 2019. Gelatin edible coatings with mint essential oil (*Mentha arvensis*): film characterization and antifungal properties. *J Food Sci Technol.* 56(9):4045–4056. eng. doi:10.1007/s13197-019-03873-9.
- Shiku Y, Yuca Hamaguchi P, Benjakul S, Visessanguan W, Tanaka M. 2004. Effect of surimi quality on properties of edible films based on Alaska pollack. *Food Chem.* 86(4):493–499. doi:10.1016/j.foodchem.2003.09.022.
- Srinivasa PC, Ramesh MN, Tharanathan RN. 2007. Effect of plasticizers and fatty acids on mechanical and permeability characteristics of chitosan films. *Food Hydrocolloids.* 21(7):1113–1122. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.08.005.
- Stanescu P-O, Radu I-C, Leu Alexa R, Hudita A, Tanasa E, Ghitman J, Stoian O, Tsatsakis A, Gingham O, Zaharia C, et al. 2021. Novel chitosan and bacterial cellulose biocomposites tailored with polymeric nanoparticles for modern wound dressing development. *Drug Deliv.* 28(1):1932–1950. eng. doi:10.1080/10717544.2021.1977423.
- Tan YN, Chin YL, Chen WN. 2021. Comparison of Sustainable Lipid and Protein Removal Methods for the Isolation of Insect Chitin from Black Soldier Fly Exoskeleton. *ACS Food Sci. Technol.* 1(4):698–706. doi:10.1021/acsfoodscitech.0c00104.
- Triunfo M, Tafi E, Guarnieri A, Salvia R, Scieuzo C, Hahn T, Zibek S, Gagliardini A, Panariello L, Coltelli MB, et al. 2022. Characterization of chitin and chitosan derived from *Hermetia illucens*, a further step in a circular economy process. *Sci Rep.* 12(1):6613. eng. doi:10.1038/s41598-022-10423-5.
- Vanegas Hinojosa MG. 2014. Obtención de Películas Biodegradables a partir de Mezclas de Quitosano de Cáscaras de Camarón y Agentes Plastificantes [Ing]. Quito: Universidad Central del Ecuador. 162 p.
- Vicentini NM. 2003. *Elaboração e caracterização de filmes comestíveis à base de fécula de mandioca para uso em pós-colheita [Ph.D].* Botucatu, Brazil: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 216 p. https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/103261/vicentini_nm_dr_botfca.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- Villar Calero KA. 2021. *Formulación de Biopelículas de Quitosano funcionalizadas con aceite esencial de *Mintostachys mollis* “Muña” con propiedad antioxidante y antimicrobiana [Lic].* Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 99 p.
- Wang H, Ding F, Ma L, Zhang Y. 2021. Edible films from chitosan-gelatin: Physical properties and food packaging application. *Food Bioscience.* 40(6):100871. doi:10.1016/j.fbio.2020.100871.

- Younes I, Rinaudo M. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs*. 13(3):1133–1174. eng. doi:10.3390/md13031133.
- Zaouali Y, Bouzaine T, Boussaid M. 2010. Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chem Toxicol*. 48(11):3144–3152. eng. doi:10.1016/j.fct.2010.08.010.
- Zavala Arrendo M, Castañeda Ramírez JC, Rivera Arredondo M, De la Fuente Salcido, Norma Margarita. 2017. Evaluación de Propiedades Mecánicas y Permeabilidad al Vapor de Agua de Películas de Quitosano. *Jóvens en la Ciencia*. 3(2):27–31.

Anexos

Anexo A

Rendimiento de la Extracción de Quitina Pristina y Preparación de Quitosano a partir de 100 g de exuvia.

	Desgrasado (g)	Desmineralizado (g)	Desproteinizado (g)	Desacetilación (g)
Rep 1	93	57	37	17
Rep 2	92	65	43	15
Rep 3	90	62	41	18
Rep 4	92	58	35	17
Rep 5	91	54	38	16
Rep 6	93	61	43	17
Rendimiento (%)	91.83	64.79	66.39	42.19

Nota. Rep = Repetición. g = g. % = porcentaje

Anexo B

Rendimiento de la Extracción de Quitina Pristina y Preparación de Quitosano a partir de 100 g de exuvia

	Desgrasado	Desmineralizado	Desproteínizado	Desacetilación
G	93	55	25	13
Rendimiento (%)	93.00	59.14	45	52.00

Nota. Tomado de Khayrova et al. (2019).

Anexo C

Correlación entre las Propiedades Físico-mecánicas.

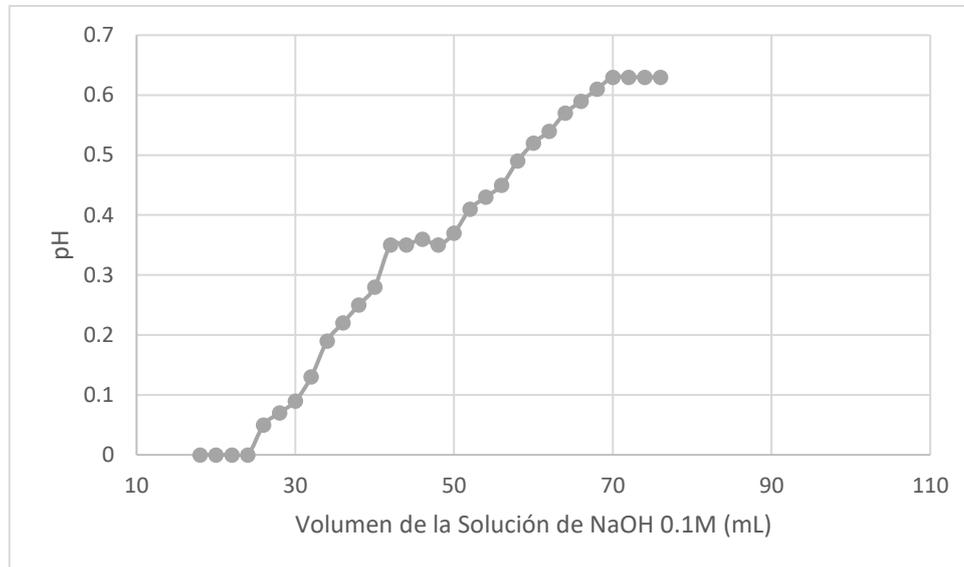
	G*	RP*	MY*	SA*	PVA*
G	1.00000	-0.58191	0.87710	-0.59555	-0.05621
RP	-0.58191	1.00000	0.1406	0.7791	0.2843
MY	0.87710	-0.85943	1.00000	-0.13705	-0.52616
SA	-0.59555	-0.22094	-0.13705	1.00000	-0.76744
PVA	-0.05621	0.71567	-0.52616	-0.76744	1.00000

Nota. * = $P > 0.05$. P = probabilidad. G = grosor. RP = resistencia a la perforación. MY = módulo de Young. SA = solubilidad en agua. PVA

= permeabilidad al vapor de agua.

Anexo D

Determinación del grado de desacetilación por titulación potenciométrica de la solución de quitosano comercial. (Ácido clorhídrico 0.3 M por hidróxido de sodio 0.1 M).



Anexo E

Determinación del grado de desacetilación por titulación potenciométrica de la solución de quitosano extraído de Hermetia illucens. (Ácido clorhídrico 0.3 M por hidróxido de sodio 0.1 M).

