

---

---

Laboratorio de Zoología de Invertebrados II. Departamento de Biología,  
Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur

---

# PELICULAS ACTIVAS: NUEVAS ALTERNATIVAS PARA EL MANEJO DE INSECTOS PLAGA DE ALIMENTOS ENVASADOS

---



Alumno: Quevedo, Martin Raúl



Director: Jesser, Emiliano



Co-directora: Castillo, Luciana





Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional del Sur

## PELÍCULAS ACTIVAS: NUEVAS ALTERNATIVAS PARA EL MANEJO DE INSECTOS PLAGA DE ALIMENTOS ENVASADOS

Tesis de grado de la Licenciatura en Ciencias Biológicas

Marzo 2023

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Quevedo", written on a light-colored background.

.....  
Alumno: Quevedo, Martín Raúl

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Jesser", written on a light-colored background.

.....  
Director: Jesser, Emiliano

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Luciana Castillo", written on a light-colored background.

.....  
Co-Directora: Castillo, Luciana

## **Agradecimientos**

*A todos aquellos que, con su presencia, han colaborado en la realización de la presente tesis. En especial al Dr. Emiliano Jesser, director de la misma, que, con su bondad, positivismo, motivación y entusiasmo, me empujaron a superar este desafío. También agradecer a la Dra. Luciana Castillo por abrirnos las puertas de su laboratorio, por su apoyo, interés y colaborarnos con los análisis químicos.*

*Mi gratitud también se extiende a mis compañeros de laboratorio, por contarme sus experiencias, compartir momentos y ayudarme en los momentos necesarios. A mis padres, tíos y primas quienes a lo largo de toda mi vida me han apoyado y motivado en mi formación académica, preocupándose cada día en mi avance y desarrollo. Por último, agradezco a mi novia y amigos, por sus incontables apoyos durante todos estos años y porque estuvieron siempre presentes e hicieron que todo fuese más agradable.*

## Resumen

*Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae), también conocido como pollila de la fruta seca, es probablemente el insecto plaga más importante que ataca a los alimentos envasados y almacenados. Ante esta problemática, en los últimos años los científicos se han focalizado en desarrollar nuevas formulaciones que puedan ser utilizadas como alternativas en el manejo de este insecto plaga. Gracias a los avances en la nanotecnología, el desarrollo de películas activas como material de envase permitió brindar una solución ante esta situación, preservando la calidad del alimento, alargando su vida útil y, a su vez, reduciendo el impacto ambiental. En el presente trabajo se desarrollaron y caracterizaron películas a base de quitosano (Qx) conteniendo extracto acuoso de *Schinus areira* (Sapindales, Anacardiaceae) y nanopartículas de plata sintetizadas por biorreducción (NPAg). Una vez obtenidas las películas, se evaluó la eficacia de las mismas para evitar la infestación de larvas de *P. interpunctella* por medio de los bioensayos de penetrabilidad y repelencia. Con respecto al ensayo de penetrabilidad, durante los primeros 15 días no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de penetrabilidad de las películas control y las que contenían el extracto acuoso ( $\approx 60\%$ ). Sin embargo, para las películas con las nanopartículas se reportó un porcentaje de penetrabilidad del 28%, significativamente menor al de la película control. Por otro lado, los resultados del ensayo de repelencia no mostraron diferencias significativas entre las películas control, con extracto de *S. areira* o con NPAg en las larvas bajo estudio. Además, se analizó la estructura, estabilidad térmica y las propiedades mecánicas de estas películas. En líneas generales, la incorporación del extracto o de las NPAg no modificaron significativamente la estructura ni la estabilidad térmica. Sin embargo, en cuanto a las propiedades mecánicas, la incorporación de las NPAg a las películas de Qx, les brindó más rigidez y resistencia en comparación con las películas control, sin disminuir su ductilidad. Los resultados obtenidos son promisorios en el desarrollo de nuevos mecanismos de prevención contra la infestación de *P. interpunctella*.

## INDICE

<b>1. Introducción</b> .....	3
1.1. Relación entre el hombre y los insectos .....	3
1.2. Infestación de artrópodos plaga en los sistemas de producción .....	4
1.3. Insecto en estudio: <i>Plodia interpunctella</i> .....	5
1.3.1. Clasificación.....	5
1.3.2. Biología y ciclo de vida de <i>P. interpunctella</i> .....	5
1.4. Métodos de control de insectos plaga .....	7
1.4.1. Métodos tradicionales.....	7
1.4.2. Métodos alternativos .....	8
1.5. Extractos vegetales .....	8
1.5.1. Aplicaciones de los extractos naturales .....	8
1.5.2. Ventajas y desventajas del uso de extractos vegetales .....	9
1.6. Nanotecnología .....	10
1.6.1. Nanopartículas metálicas .....	10
1.6.2. Aplicaciones de las nanopartículas metálicas .....	11
1.7. Envases activos.....	11
1.7.1. Películas activas como alternativa para el manejo de insectos plaga.....	12
1.8. Objetivo general.....	13
1.8.1. Objetivos específicos.....	13
1.9. Hipótesis.....	13
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	14
2.1. Insectos .....	14
2.2. Productos químicos.....	14
2.3. Extracto vegetal.....	14
2.4. Síntesis de las nanopartículas metálicas .....	14
2.5. Obtención de las películas.....	14
2.6. Caracterización de las películas.....	15

2.6.1. Caracterización estructural .....	15
2.6.2. Estabilidad térmica.....	15
2.6.3. Propiedades mecánicas.....	15
2.7. Bioensayos .....	16
2.7.1. Ensayo de repelencia.....	16
2.7.1. Ensayo de penetrabilidad.....	16
2.8. Análisis estadístico .....	17
<b>3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>18</b>
3.1. Caracterización de las películas activas.....	18
3.1.1. Análisis estructural.....	18
3.1.2. Estabilidad térmica.....	19
3.1.3. Propiedades mecánicas.....	20
3.2. Bioensayos .....	22
<b>4. Conclusión.....</b>	<b>26</b>
<b>5. Referencias bibliográficas.....</b>	<b>27</b>

# 1. Introducción

Desde sus inicios, la taxonomía ha tenido como principal objetivo determinar la cantidad de seres vivos existentes en el planeta. Sin embargo, el número de especies encontradas varía constantemente, debido a los obstáculos que encuentran los taxónomos al momento de determinar nuevas especies y clasificar las ya conocidas (Jiang, 2016). En este contexto y de acuerdo a estudios recientes, el número total estimado de especies descritas es 1.900.000, de las cuales los animales representan el 75% con aproximadamente 1.450.000 especies. Es importante destacar que el número de invertebrados descritos y publicados hoy en día es de 1.350.000 especies, de las cuales alrededor de 1.000.000 pertenecen a la clase Insecta (Chapman, 2009). Por lo tanto, es evidente que la mayor parte del reino animal está constituido esencialmente por los insectos.

## 1.1. Relación entre el hombre y los insectos

Desde tiempos inmemorables se estableció una relación entre la humanidad y los insectos. En un principio estos eran considerados como animales totalmente perjudiciales ya que producían enfermedades y dañaban las cosechas. Sin embargo, con el correr del tiempo y gracias a los nuevos conocimientos se comenzó a valorar a los insectos por su rol ecosistémico (Morris, 2020). En este sentido, desde un punto de vista beneficioso son fundamentales los insectos polinizadores, en especial las abejas que, por ejemplo, permitieron el desarrollo de la apicultura. También son importantes los insectos que actúan como controladores biológicos, especialmente en el manejo sostenible de artrópodos plaga (Lacey *et al.*, 2001). Por otra parte, cabe destacar que existen numerosos insectos (termitas, grillos, orugas, entre otros) que son utilizados en la elaboración de diversas comidas debido a su aporte proteico. Además, estos artrópodos son usados en diversas culturas para la obtención de sustancias con propiedades medicinales (Costa-Neto, 2005).

Atendiendo a la relación perjudicial que pueden establecer los insectos con la sociedad humana, se pueden mencionar a los ponzoñosos o a los causantes de enfermedades. Los primeros generan efectos adversos sobre otro ser vivo por inoculación de sustancias venenosas, mientras que los segundos comprenden, por ejemplo, a los productores de alergias. Por otra parte, hay organismos que pueden causar un impacto negativo desde el punto de vista agrícola y sanitario (vectores de enfermedades), conocidos como artrópodos plaga (Morris, 2020). Es importante resaltar que la palabra “plaga” es un término totalmente circunstancial y antrópico. La misma hace referencia a cuando un animal, planta o microorganismo, aumenta su densidad hasta niveles anormales y, como consecuencia de ello, afecta directa o indirectamente a la especie humana, dañando su salud, construcciones, cultivos, comodidad, etc. (Brechelt, 2004). Sin embargo, es de destacar que ningún organismo es plaga *per se*. Aunque algunos sean en potencia más dañinos que otros, ninguno es intrínsecamente “malo”, sino que esta concepción viene dada exclusivamente por el ser humano.

## 1.2. Infestación de artrópodos plaga en los sistemas de producción

Desde un punto de vista agronómico, la infestación ocasionada por los artrópodos plaga en los sistemas de producción provoca daños de manera directa. La alimentación de los organismos a partir del producto y la contaminación que estos generan en el entorno reducen el poder germinativo de los granos y el valor nutricional de los productos derivados. Por otra parte, los daños indirectos son causados por la propia actividad de los insectos, provocando pérdidas físicas de la mercancía, crecimiento de moho y contaminación por heces y excretas (Rees, 2004). La magnitud de este daño depende estrictamente de la especie y de las condiciones de temperatura y humedad relativa.

En el caso particular de los alimentos almacenados y envasados, la infestación puede ocurrir durante el procesamiento de los mismos, es decir, los insectos están presentes durante el proceso de manufactura, o bien una vez que hayan sido envasados. De esta manera, y atendiendo a ciertos aspectos de la biología, estos insectos plaga se clasifican en perforadores e invasores. Los primeros son aquellos que pueden perforar el envase; mientras que los segundos, colonizan los alimentos a través de orificios preexistentes en los materiales de envase y embalajes, tales como pliegues, costuras y salidas de aire o bien por orificios ocasionados por los insectos perforadores (Stejskal *et al.*, 2017; Aulicky *et al.*, 2019). En nuestra región, los insectos perforadores que se encuentran son las formas adultas de ciertos coleópteros como *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha domina* (F.) y *Lasioderma serricorne* (F.) y las larvas de algunos lepidópteros como *Cadra cautella* (Walker) y *Plodia interpunctella* (Hübner). Esta última plaga, es de las más comunes de encontrar en la industria alimenticia, por lo que será el objeto de estudio de esta tesis. Además, entre los insectos invasores más comunes se hallan *Tribolium castaneum* (Herbst) y *Oryzaephilus surinamensis* (L.).

### 1.3. Insecto en estudio: *Plodia interpunctella*

#### 1.3.1. Clasificación

**Phylum:** Arthropoda

**Subphylum:** Hexapoda

**Clase:** Insecta

**Orden:** Lepidoptera

**Superfamilia:** Pyraloidea

**Familia:** Pyralidae

**Género:** *Plodia*

**Especie:** *Plodia interpunctella* (Hübner).

#### 1.3.2. Biología y ciclo de vida de *P. interpunctella*

*P. interpunctella*, también conocida vulgarmente como polilla de la fruta seca, es un insecto plaga típico de productos almacenados y alimentos procesados. Debido a su gran capacidad de infestación es quizás la plaga más importante de su tipo (Mohandass *et al.*, 2007).

Es un organismo holometábolo, cuyo ciclo de vida involucra los estados de huevo, larva, pupa y adulto (Lámina 1). El comportamiento de ovoposición se encuentra influenciado por los aromas de diferentes alimentos, de esta manera los huevos son colocados sobre o próximas a la superficie del alimento (Nansen y Phillips, 2003). El período larvario es la fase dañina del insecto dado que justamente se alimenta de los productos almacenados y dura aproximadamente la mitad del ciclo de la especie. El período pupal tiene una duración de alrededor de 7 a 9 días; mientras que, el estado adulto presenta una duración de aproximadamente 10 días (Pérez *et al.*, 2012). El ciclo de vida de *P. interpunctella* requiere de entre 25 y 60 días para completarse; sin embargo, el tiempo requerido para completar una generación se ve influenciado por factores como temperatura, dieta, fotoperíodo y otros parámetros biológicos (Allotey y Goswami, 1990). Por ejemplo, a 25 °C y 70 % HR, el tiempo que tarda el huevo en convertirse en adulto es de 34 días (Jesser *et al.*, 2017).

### **Lámina 1: Características morfológicas de *P. interpunctella***

**Adultos:** miden de 15 a 20 mm de envergadura alar. Las alas anteriores en su parte basal son de color grisáceo claro; el resto son de color pardo oscuro, lo mismo que la cabeza y el tórax. Las alas posteriores son de color gris claro. Cuando el insecto está en reposo, pliega las alas a lo largo del cuerpo, quedando las antenas dispuestas hacia atrás, apoyadas a lo largo del cuerpo (INTA, 2010).



Adultos de *P. interpunctella*

**Huevos:** son pequeños y ovalados con bordes aplanados, de color blanquecino, con un tamaño aproximado de 0,54 - 0,67 mm de largo. Presentan excrecencias redondeadas y carenas prominentes, características que permiten separarlos de otros huevos de insectos plaga (Mohandass *et al.*, 2007).

**Larvas:** el desarrollo larval transcurre por cinco estadios que se diferencian por su color y por su tamaño. En el primer y segundo estadio presenta la cabeza marrón clara y el cuerpo blanco, casi transparente, con setas blanquecinas en el dorso y los laterales. En el tercer estadio la

coloración del cuerpo cambia a amarillo claro, con el primer segmento torácico más oscuro, similar en coloración a la cápsula cefálica. El cuarto estadio tiene el cuerpo amarillo claro con el primer segmento torácico oscuro y la cabeza marrón. Presenta setas traslúcidas en todo el cuerpo, más coloreadas en los dos últimos segmentos abdominales. El último estadio se caracteriza por presentar un cuerpo cilíndrico amarillento con tonalidades rosadas, la cabeza de color marrón, el primer segmento torácico más claro que esta y en el último segmento abdominal, las setas amarillentas. En este estadio se alcanza la mayor longitud del cuerpo con  $7,63 \pm 1,01$  mm como promedio. En este periodo las larvas tejen un capullo para el posterior desarrollo de la pupa (Pérez *et al.*, 2012).



Larva IV de *P. interpunctella*

**Pupas:** son de color variable dependiendo del tiempo de desarrollo. Al principio, es amarillenta, después se torna marrón claro y finalmente marrón oscuro, con una longitud aproximada de  $8,71 \pm 0,56$  mm. Próximo a la eclosión del adulto, adquiere una coloración oscura (McDonough, 2011).

## 1.4. Métodos de control de insectos plaga

### 1.4.1. Métodos tradicionales

Anteriormente se describió que los insectos plaga producen grandes pérdidas en la economía, en la producción de alimentos e impactan en la salud humana. Por estas razones, el manejo de artrópodos plaga ha sido durante muchos años un eje clave para las políticas nacionales destinadas a buscar estrategias que puedan solucionar de manera óptima y eficaz estas cuestiones que preocupan a la sociedad (Ansari *et al.*, 2014).

Entre los primeros insecticidas sintéticos masivos que se desarrollaron se puede nombrar al DDT (1,1,1-tricloro-2,2'-bis(p-clorofenil) etano). Durante el transcurso de la segunda guerra mundial, las industrias promovieron la fabricación de este insecticida con el fin de controlar las enfermedades transmitidas por los artrópodos. De esta manera, el DDT persistió por muchos años como el pesticida predilecto debido a los bajos costos y su acción residual (Betancur Corredor *et al.*, 2013). Paralelamente con el avance de la tecnología, el crecimiento demográfico y la productividad, se intensificó el uso de organoclorados y organofosforados. Posteriormente, estos productos se dejaron de utilizar, promoviéndose el uso de insecticidas carbamatos y especialmente piretroides debido a su menor impacto en la salud humana y el ambiente (Coats, 2012). De esta manera, los insecticidas sintéticos se consolidaron como agentes clave en el manejo de especies plaga, con el fin de reducir las pérdidas causadas por éstas y lograr satisfacer las demandas de la creciente población (Brechelt, 2004).

En la actualidad, la fabricación y utilización de plaguicidas brinda una alternativa para limitar, inhibir y prevenir el crecimiento de insectos, plantas invasoras, malas hierbas y hongos (Meffe y de Bustamante, 2014). Estos plaguicidas son usados para el tratamiento de grandes superficies, el mantenimiento de áreas verdes, en el ganado y animales domésticos, las industrias y en los hogares (Nava-Perez *et al.*, 2012). Sin embargo, estos productos pueden afectar a los ecosistemas. Entre las consecuencias ambientales asociadas a su aplicación en altas concentraciones se encuentran el deterioro de los suelos, el aumento en la pérdida de la biodiversidad y las alteraciones de los ciclos biogeoquímicos (McKnight *et al.*, 2015).

En cuanto a la salud humana, los plaguicidas pueden generar efectos agudos (desequilibrios hormonales y muerte) a corto, mediano y largo plazo, incluso con pequeñas dosis. Además, la aparición de resistencia en las poblaciones de artrópodos llevó a un aumento en las dosis empleadas, generando un deterioro significativo en la salud de los consumidores (Gutiérrez *et al.*, 2015). A nivel fisiológico, cuando los insecticidas sintéticos ingresan al organismo pueden desestabilizar la membrana nerviosa, provocando la apertura sostenida de los canales de sodio o combinarse con las enzimas colinesterasas, inactivándolas y con ello aumenta la actividad de la acetilcolina. Como resultado se genera un aumento del tono muscular, desencadenado por el sistema parasimpático, provocando daños en el organismo. Si la acción es más intensa y persistente se observa efectos neuromusculares por activación de receptores nicotínicos (temblores, convulsiones y parálisis muscular) que conllevan a la muerte (Gómez-Pérez *et*

*al.*, 2011; Coats, 2012). Además, algunos trabajos sugieren que la disminución en la calidad y cantidad de gametos y los problemas de fertilidad pueden asociarse a una exposición prolongada a plaguicidas (Yucra *et al.*, 2008).

#### **1.4.2. Métodos alternativos**

Si bien los métodos químicos son los más comunes, existen otras alternativas propuestas para el manejo de especies plaga, que pueden resultar menos agresivas para la salud y el ambiente y garantizar la seguridad alimentaria (Vega, 2017). Entre los métodos no químicos se pueden encontrar a los métodos directos que actúan sobre el insecto plaga tales como los métodos físicos (temperatura, humedad, rayos UV) y métodos biológicos (controladores biológicos, cristales proteicos, esterilizantes). Por otro lado, están los métodos indirectos que no actúan directamente sobre el insecto. Entre estos se citan a los métodos genéticos, por ejemplo, la introducción de un genotipo deseado o los legislativos a través de la creación y aplicación de leyes para el control de plagas (Jiménez, 2009).

#### **1.5. Extractos vegetales**

En estas últimas décadas se ha generado en la sociedad un interés enfocado hacia el uso de productos de origen natural con el objetivo de cuidar la salud humana y el ambiente. De esta manera, la demanda de este tipo de productos ha crecido notablemente debido a sus propiedades medicinales y potenciales aplicaciones.

En la naturaleza, los metabolitos de las plantas cumplen un rol vital ya sea actuando como reservas, atrayendo polinizadores o para defensa (Bali *et al.*, 2016). Sin embargo, el ser humano ha encontrado otros usos y aplicaciones, pudiéndose obtener de ellas productos de origen natural como los extractos vegetales y los aceites esenciales (AE) (Dhifi *et al.*, 2016).

En el caso de los extractos vegetales, son un conjunto de uno o más componentes encontrados en las plantas obtenidos por procesos mecánicos o destilaciones, a partir de materia prima vegetal. Químicamente están constituidos por alcoholes, ésteres, aldehídos, cetonas, carbohidratos, terpenos, polifenoles, entre otros (Wong-Paz *et al.*, 2015). En general, son líquidos a temperatura ambiente y suelen tener un olor característico. Tienen un índice de refracción y una actividad óptica muy alta (Dhifi *et al.*, 2016). En general, muchas de sus propiedades dependen de la composición del extracto (compuestos y sus respectivas concentraciones). La misma puede variar significativamente, debido al método de extracción, el órgano vegetal utilizado (flores, partes verdes como hojas y tallos, corteza, madera, frutos enteros, semillas o raíces), la temporada de cosecha y el origen de la planta (Yuan *et al.*, 2016).

##### **1.5.1. Aplicaciones de los extractos naturales**

En la actualidad los extractos vegetales son usados principalmente por las empresas de cosmética y perfumerías. Los nuevos descubrimientos que se han realizado a partir de la mejora en la comprensión

de las propiedades químicas y biológicas de dichos productos han permitido despertar el interés de varias empresas del sector alimenticio y de producción química (Dhifi *et al.*, 2016).

Numerosos estudios han demostrado la diversidad de propiedades que presentan los extractos vegetales. Hsieh *et al.* (2001) demostraron que al combinar extractos de fruto del cornejo con canela y cebollín chino se produce un efecto sinérgico que incrementa la actividad antimicrobiana sobre productos almacenados. Por otra parte, se demostró que *Azadirachta indica* (Sapindales, Meliaceae), *Tinospora cordifolia* (Ranunculales, Menispermaceae), *Triticum aestivum* (Poales, Poaceae) presentan múltiples propiedades biológicas y muchas de ellas pueden ser utilizadas en los tratamientos contra el cáncer (Dixit y Ali, 2010). Por su parte, Solowey *et al.* (2014) seleccionaron tres extractos de plantas nativas de Israel (*Urtica membranacea* (Rosales, Urticaceae), *Artemisia monosperma* (Asterales, Asteraceae) y *Origanum sp* (Lamiales, Lamiaceae)) y demostraron que presentan actividad antitumoral sobre líneas celulares mutadas. En cuanto a la actividad antibacteriana, Klančnik *et al.* (2010) evaluaron la acción de diferentes extractos vegetales (té verde, oliva, semilla de uva, entre otros) con ácidos fenólicos sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los resultados obtenidos son prometedores, convirtiéndolos en una alternativa viable para evitar la proliferación de estos organismos. Finalmente, Abdelkhalek *et al.* (2020) estudiaron el efecto antiviral y antifúngico de los compuestos polifenólicos de extracto de *Eucalyptus sp* (Myrtales, Myrtaceae). Este trabajo demostró el efecto inhibitorio de estos extractos en hongos y bacterias sobre cultivos vegetales.

Por último, es importante resaltar las propiedades insecticidas de los extractos vegetales, cuya actividad biológica presenta efectos significativos sobre diferentes insectos plaga (Tedeschi *et al.*, 2011). Ahmed *et al.* (2020) estudiaron las propiedades insecticidas de extractos de *Citrullus colocynthis* (Cucurbitales, Cucurbitaceae), *Cannabis indica* (Rosales, Cannabaceae) y *Artemisia argyi* (Asterales, Asteraceae) sobre *Brevicoryne brassicae* (Aphididae), un hemíptero vector de enfermedades que causa importantes pérdidas en diversos cultivos. Se demostró que la mortalidad de *B. brassicae* aumentó al incrementar el tiempo de exposición y la concentración de los extractos. Benelli *et al.* (2019) estudiaron la actividad insecticida de los extractos y aceites esenciales de *Ocimum gratissimum* (Lamiales, Lamiaceae) sobre insectos de importancia económica y sanitaria como son *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera, Noctuidae), *Musca domestica* (Diptera, Muscidae) y *Culex quinquefasciatus* (Diptera, Culicidae). En este trabajo se mostró que estos componentes son efectivos contra las plagas consideradas y además son amigables con el medio ambiente. En el trabajo de Grauso *et al.* (2020) exploraron los efectos de *Dittrichia viscosa* (Asterales, Asteraceae) sobre nematodos, insectos y parásitos de plantas. Los componentes de dichos extractos evidenciaron tener efectos antialimenticios, mostrando una reducción en la nutrición de larvas *S. littoralis* y afectando el comportamiento de dos clases de pulgones: *Myzus persicae* (Hemiptera, Aphididae) y *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera, Aphididae).

### **1.5.2. Ventajas y desventajas del uso de extractos vegetales**

En comparación con los productos químicos convencionales, que son generalmente persistentes en el medio ambiente y altamente tóxicos, los extractos vegetales son biodegradables y no dejan residuos

persistentes sobre las superficies. De esta manera, el uso de extractos vegetales es una alternativa amigable para humanos y organismos no blancos. Además, la mayoría no son fitotóxicos y son más selectivos (Campos *et al.*, 2016).

Si bien el uso de extractos vegetales presenta grandes beneficios, algunas desventajas como la baja persistencia, alta volatilidad y elevada fotosensibilidad, limitan el uso de los mismos como insecticidas comerciales (Ju *et al.*, 2019). En este sentido, en los últimos años, se han buscado distintas metodologías que permitan sortear estas desventajas. Entre ellas podemos citar a la nanotecnología a través del empleo de nanopartículas metálicas o poliméricas, nanoformulaciones tales como nanoemulsiones y microemulsiones.

## **1.6. Nanotecnología**

### **1.6.1. Nanopartículas metálicas**

Los avances en física y química en la segunda mitad del siglo XIX y las primeras décadas del siglo XX demostraron que existía un mundo nanoscópico, lo que permitió el desarrollo de nanomateriales (NM) con aplicaciones en áreas como la medicina, la industria tecnológica o agrícola. El interés por estos materiales viene dado por las propiedades físicas, químicas y biológicas únicas (McNeil, 2005). Entre los NM actuales se encuentran las nanopartículas (NP), que se caracterizan por presentar sus tres dimensiones en el rango nanométrico. Muchas de ellas son utilizadas como nanoportadores, en las cuales un componente activo se encuentra disuelto, atrapado, encapsulado o unido a una matriz de NM (Strambeanu *et al.*, 2015). En función de la composición, las NP pueden clasificarse en: orgánicas (poliméricas, dendrímeros, liposomas y micelas), inorgánicas (oro, óxidos de hierro, sílice mesoporosa) o híbridas, cuando se combinan los dos tipos de NP (Shahzad y Manzoor, 2019).

Gracias a su tamaño nanométrico, adaptabilidad a las superficies, solubilidad y multifuncionalidad, las NP abrieron múltiples caminos para el hallazgo de nuevos desarrollos tecnológicos (Jeevanandam *et al.*, 2018). Las características de las NP provienen en parte del modo en que se sintetizan, pudiendo obtenerse mediante métodos físico-químicos que comúnmente usan solventes con cierta toxicidad o por métodos biológicos que utilizan enzimas, microorganismos o extractos vegetales, resultando en una síntesis con menor impacto sobre el ambiente (Rana *et al.*, 2020). En el caso específico de NP generadas a partir de extractos de plantas, las biomoléculas extraídas actúan como agentes reductores y protectores, evitan la aglomeración y al mismo tiempo reducen la toxicidad para el ambiente. Estas NP se elaboran dentro del concepto de “síntesis verde”, una alternativa viable debido a sus propiedades intrínsecas que tienen como objetivo aumentar la rentabilidad y productividad y, al mismo tiempo, empleando prácticas que respetan el medioambiente (Ijaz *et al.*, 2020).

Particularmente, las NP metálicas, ubicadas dentro del grupo de las NP inorgánicas, se componen de metales como oro, plata, platino, paladio, entre otros (Pathania *et al.*, 2021). Estas nanopartículas se han utilizado en diversas áreas como la electrónica, la cosmética, los recubrimientos, el embalaje y la biotecnología médica (Mittal *et al.*, 2013).

### **1.6.2. Aplicaciones de las nanopartículas metálicas**

Ante la creciente demanda de alimentos debido al aumento de la población, las tecnologías destinadas a la agricultura han desempeñado un rol clave en la mejora de productividad de los cultivos (Singh *et al.*, 2020). En el área de los insecticidas, la nanotecnología ha sido utilizada como una herramienta esencial en el desarrollo de nuevas formulaciones para el manejo de insectos plaga (Bhattacharyya *et al.*, 2010). En este sentido, las NP metálicas han cobrado gran importancia en este campo debido a su mayor actividad y a su menor impacto ambiental (Pascoli *et al.*, 2019). Gul *et al.* (2014) estudiaron la eficiencia de la aplicación de nano-sílice en la superficie de las hojas y tallos de la planta del tomate contra el ataque de *S. littoralis*. Las NP afectan el potencial reproductivo de las hembras, causando una reducción de la densidad de las poblaciones y a la vez minimiza los daños y mejora el rendimiento de los cultivos. Por otro lado, en el trabajo de Hua *et al.* (2015) se comparó el efecto del nano-carbonato de calcio con el carbonato de calcio coloidal cuando se rociaban en las hojas de *Citrus sp* (Sapindales, Rutaceae) con el fin de evaluar su incidencia sobre la mosca de la fruta. Luego de llevar a cabo los ensayos, los resultados mostraron que el nano-carbonato de calcio tiene una mejor eficiencia de protección contra la ovoposición de la mosca que el carbonato de calcio coloidal gracias a su fácil absorción.

### **1.7. Envases activos**

El plástico es el material más utilizado por la industria alimentaria para el desarrollo de envases. Esto se debe a su bajo costo, alta versatilidad y sus óptimas propiedades mecánicas y de barrera. Sin embargo, su uso masivo ha llevado a la acumulación de miles de toneladas de residuo plástico en el medio ambiente (Bianco *et al.*, 2021). Dado que este material no es biodegradable, una gestión adecuada de los residuos plásticos sería el reciclaje (Michaud *et al.*, 2010). Sin embargo, los residuos plásticos provenientes de envases para alimentos generalmente están contaminados por restos de comida, por lo que el reciclaje no es una gestión práctica para estos materiales (Ncube *et al.*, 2021). Es por esta razón que las innovaciones en el envasado de alimentos son claves para prevenir la contaminación, permitiendo ofrecer una mayor seguridad, contención y comercialización en la distribución de los alimentos (Drago *et al.*, 2020). De esta manera, se impulsó el uso de biopolímeros como una nueva alternativa para el desarrollo de materiales de envases, por ser no tóxicos y biodegradables (Tamang *et al.*, 2022). Dentro de este grupo de polímeros se pueden citar al quitosano, almidón, celulosa, quitina, colágeno, entre otros (Udayakumar *et al.*, 2021).

El quitosano (Qx) es un polímero que se obtiene a partir de la desacetilación de la quitina (poli-N-acetilglucosamina) y está formado por unidades de glucosamina con enlace  $\beta$ -1,4 (2-amino-2-desoxi- $\beta$ -D-glucosa) y de N-acetilglucosamina (Rahel *et al.* 2013; Mujtaba *et al.*, 2019). Es uno de los principales biomateriales que se utiliza como matriz para el desarrollo de nanopartículas, nanoemulsiones, hidrogeles y películas activas biodegradables (Rahangdale *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2019). El potencial

de este material para la elaboración de estas películas viene dado por sus buenas propiedades mecánicas y la capacidad de encapsular y liberar ciertos compuestos de manera controlada (Shen y Kamdem, 2015; Valencia-Sullca *et al.*, 2018).

### ***1.7.1. Películas activas como alternativa para el manejo de insectos plaga***

En las últimas décadas se ha producido un gran desarrollo tecnológico en el envasado de los alimentos para satisfacer las demandas de los consumidores en cuanto a métodos más naturales de conservación y a formas de control del envasado y almacenamiento para asegurar la calidad y seguridad del alimento. Entre las innovaciones más interesantes en este campo se encuentran los envases activos que son sistemas quimioactivos o bioactivos que mejoran la salubridad y la calidad del alimento envasado y aumentan su vida útil, manteniendo las propiedades organolépticas y nutricionales del mismo (Han *et al.*, 2018; Kuai *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2021). En estos envases, sustancias activas como extractos vegetales o aceites esenciales se combinan con una matriz polimérica, permitiendo controlar la liberación de los agentes bioactivos (Ju *et al.*, 2019). En este sentido, se ha demostrado que los envases activos a base de biopolímeros que contienen estos agentes son efectivos para el control microbiano y para evitar la degradación oxidativa del alimento (Ribeiro-Santos *et al.*, 2017; Requena *et al.*, 2017; Tao *et al.*, 2021). En los últimos años, también se han usado este tipo de envases activos para evitar la infestación de los alimentos por parte de los insectos plaga. A modo de ejemplo se puede citar el trabajo de Lee *et al.* (2017) quienes desarrollaron una película multicapa de polietileno tereftalato y metilciclohexeno conteniendo aceite esencial de ajo y cebolla, que permitió reducir significativamente la penetración de las larvas de *P. interpunctella*. Por otro lado, Jo *et al.* (2015) desarrollaron una película anti-insectos utilizando AE de canela y polivinil alcohol. Los resultados mostraron que las películas tuvieron efecto repelente, disminuyendo el porcentaje de larvas sobre la superficie de las mismas. Otro trabajo para destacar es el realizado por Lee *et al.* (2019) donde fabricaron una película multicapa de polipropileno/tereftalato de polietileno/polietileno de baja densidad, que contenía aceite esencial de anís y capas de timol para evaluar su performance frente al ataque de insectos en envases de pan. Los resultados revelaron que la película disuadió a los insectos de acercarse al producto almacenado e impidió el crecimiento de bacterias en el pan, corroborando así los efectos antimicrobianos y repelentes. Asimismo, Jesser *et al.* (2022) desarrollaron películas activas a base de Qx conteniendo AE de menta y geranio para estudiar sus efectos insecticidas sobre larvas de *P. interpunctella*. Los resultados revelaron que las películas de Qx con AE de geranio y menta al 0,5% p/p mostraron el mayor efecto repelente a las 72 h y redujeron a un 10% el porcentaje de penetración de las larvas durante los primeros 15 días. Por otra parte, Barone *et al.* (2021) reportó el aumento del interés hacia los beneficios higiénico-sanitario de estos envases durante la pandemia COVID-19, mostrando el rol que pueden cumplir en la protección y conservación de los alimentos.

## 1.8. Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es desarrollar y caracterizar películas a base de quitosano (Qx) que contengan extracto acuoso de *Schinus areira* (Sapindales, Anacardiaceae) y nanopartículas de plata (NPAg), obtenidas por biorreducción, así como también evaluar la eficacia de las películas frente al control de insectos plaga de alimentos envasados.

### 1.8.1. Objetivos específicos

- Formular nanopartículas de plata a partir de la biorreducción del extracto acuoso de *S. areira*.
- Elaborar y caracterizar fisicoquímicamente y mecánicamente películas a base de Qx que contengan extractos de *S. areira* o NPAg.
- Estudiar el efecto inhibitorio de las películas activas conteniendo el extracto de *S. areira* o NPAg sobre la capacidad de penetración de larvas de *P. interpunctella*.
- Evaluar el efecto repelente de las películas activas conteniendo el extracto de *S. areira* o NPAg sobre el comportamiento de larvas de *P. interpunctella*.

## 1.9. Hipótesis

- La obtención de NPAg es posible mediante la biorreducción del extracto acuoso de *S. areira*.
- El extracto de *S. areira* o NPAg es factible de incorporar a una matriz de Qx para obtener películas activas.
- La incorporación de extracto de *S. areira* o de NPAg mejoran las propiedades físico-químicas y mecánicas de las películas de Qx.
- El agregado de extracto de *S. areira* o de NPAg a una matriz de Qx inhibe la capacidad de penetración de las larvas de *P. interpunctella*.
- Las películas a base de Qx conteniendo extracto de *S. areira* o de NPAg poseen efectos repelentes en las larvas de *P. interpunctella*.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1. Insectos

Los insectos se obtuvieron a partir de colonias de *P. interpunctella* (sin previa exposición a ningún insecticida) mantenidas en el laboratorio de Zoología de Invertebrados II (UNS). Para obtener estas colonias, larvas encontradas en productos de dietética fueron colocadas en dieta artificial y criadas en condiciones controladas. Las crías se desarrollaron en contenedores plásticos (13 cm diámetro × 30 cm alto) cubiertos por una tela de malla fina para permitir la ventilación. Cada recipiente contenía una mezcla de harina de maíz, harina de trigo, cereales, leche en polvo, levadura en polvo, miel y glicerina (8:4:2:2:1:1:1 p/p). La cría se mantuvo bajo condiciones atmosféricas controladas ( $27 \pm 1$  °C, 45-50% HR y un fotoperíodo luz/oscuridad de 16:8 h).

### 2.2. Productos químicos

Para la síntesis de las nanopartículas metálicas se utilizó nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Para las películas se usó Qx con una desacetilación del 75/80%, Tween 80 como surfactante y glicerol como agente plastificante. Todos los productos fueron adquiridos en Sigma-Aldirch Alemania.

### 2.3. Extracto vegetal

Para la elaboración del extracto acuoso de *S. areira* inicialmente se pesaron 20 g de hojas (sin moler), se introdujeron en una solución con 200 mL de etanol y 200 mL de agua destilada y luego se mantuvo a 60°C durante 4 h. Posteriormente, se dejó enfriar y se almacenó a 4 °C. Al día siguiente, se filtró el extracto y se agitó durante 2,5 h para evaporar el etanol, obteniéndose un volumen final de 150 mL.

### 2.4. Síntesis de las nanopartículas metálicas

Para la síntesis de las nanopartículas metálicas se utilizó nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). En primera instancia se preparó una solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  2 mM, pesando 339,7 mg de  $\text{AgNO}_3$  a los cuales se le agregó 100 mL de agua. Para sintetizar las NPAg, se tomaron 20 mL de esta solución y se agregó 20 mL del extracto acuoso de *S. areira*. Luego, esta solución se mantuvo a 50 °C durante 2 h. El cambio de color de las soluciones indicó la formación de las NPAg.

### 2.5. Obtención de las películas

Para la preparación de las películas, se usó Qx de peso molecular medio con un grado de desacetilación del 75/80%, Tween 80 como surfactante y glicerol como agente plastificante. Todos estos productos fueron adquiridos en Sigma-Aldirch (Alemania). Para la preparación de películas activas a base de Qx se utilizó una metodología previamente estandarizada (Jesser *et al.*, 2022). En primera instancia, a 100 mL de agua se le adicionaron 1,5 mL de ácido acético. Luego se agregaron 1,5 g de Qx a esta solución, alcanzando una relación de 100:1.5 (v/p). Esta dispersión se mantuvo bajo agitación magnética a temperatura ambiente. Posteriormente, se filtró para eliminar cualquier partícula insoluble.

A continuación, se pesaron 80 g de la dispersión y se agregó 30 mL de extracto de *S. areira* o NPAg, glicerol al 0,3 % (p/p) y Tween 80 al 0,1 % (p/p) (los porcentajes se expresan respecto al peso final, que incluye la dispersión y el extracto o las NPAg). Como control, se empleó una mezcla de Qx, glicerol y Tween 80 en las proporciones antes mencionadas, pero sin el agregado del extracto acuoso ni de NPAg. Las mezclas se homogeneizaron a temperatura ambiente (25 °C), utilizando un homogeneizador de rotor-estator (Scilogex D-500 Homogenizer) durante 10 min a 15000 rpm. Posteriormente, 42 mL de las mezclas fueron vertidos sobre una placa de vidrio enmarcada con un molde de metal (169 cm<sup>2</sup>). Las muestras se colocaron en una cámara de vacío durante 24 h para eliminar las burbujas de aire. A continuación, las películas resultantes se secaron a 25 °C, 60 % HR durante 48 h y se usaron para la caracterización y los bioensayos.

## **2.6. Caracterización de las películas**

### **2.6.1. Caracterización estructural**

Las películas fueron analizadas mediante Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR) en un espectrofotómetro ThermoNicolet Nexus (EE.UU.). Los espectros se obtuvieron directamente sobre muestras de las películas control y las que contienen extracto de *S. areira* o las nanopartículas. Para esta caracterización, se realizaron 100 barridos en modo de transmisión con una resolución de 4 cm<sup>-1</sup> en el rango de 4000–400 cm<sup>-1</sup> y bajo atmósfera de nitrógeno.

### **2.6.2. Estabilidad térmica**

La estabilidad térmica de las películas se determinó utilizando una balanza termogravimétrica (TA Instruments, Discovery Series, EE.UU.). Las muestras se calentaron desde 30 °C hasta 700 °C a 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno.

### **2.6.3. Propiedades mecánicas**

Las propiedades mecánicas de las películas control y las que contienen *S. areira* o NPAg se determinaron empleando una máquina de ensayos universales (Instron modelo 3369) según la norma ASTM D882-02. Los ensayos se realizaron a 23 °C con una celda de carga de 50 N y una separación inicial entre mordaza de 50 mm, utilizando una velocidad de 50 mm/min hasta la rotura de la muestra. Se cortaron especímenes rectangulares a partir de las películas (2,54 x 10 cm) y se midió el espesor de cada uno de ellos en diez puntos aleatorios utilizando un micrómetro manual (0–25 ± 0,01 mm, Venier, China). Las propiedades mecánicas determinadas fueron el módulo de Young, la resistencia a la tracción y la deformación a la rotura. El módulo de Young es una medida de la rigidez o la resistencia a la deformación elástica de un material cuando se aplica una carga. La resistencia a la tracción se calculó como la fuerza máxima dividida por el área de la sección transversal de cada espécimen, mientras que la deformación a la rotura se determinó como el porcentaje de alargamiento a la rotura con respecto a la longitud inicial (Pranoto *et al.*, 2005). Se ensayaron diez especímenes de cada película, registrándose el valor medio y la desviación estándar para cada propiedad.

## 2.7. Bioensayos

A fin de seleccionar las películas más efectivas frente al ataque de *P. interpunctella* y evaluar el efecto repelente e inhibidor de la penetración, se realizaron dos bioensayos diferentes con larvas del IV estadio.

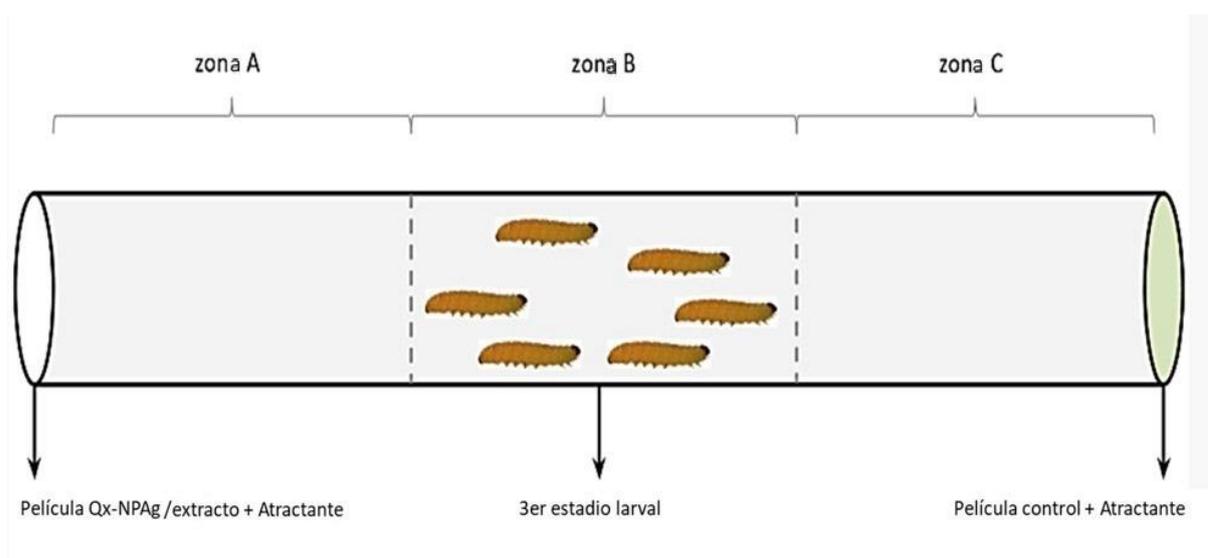
### 2.7.1. Ensayo de repelencia

Con el fin de evaluar el efecto repelente de las películas activas, se realizó un ensayo basado en el método de Jo *et al.* (2015) con modificaciones. Como arena se utilizó un tubo de vidrio de 20 cm de largo y 2 cm de diámetro. En uno de los extremos del tubo se colocó un recipiente conteniendo alimento atrayente cubierto por la película conteniendo extracto de *S. areira* o NPAg (tratamientos) y luego se adicionaron 10 insectos a la zona central del tubo. Posteriormente, se cerró el otro extremo con un recipiente conteniendo alimento atrayente cubierto con la película control. En el tubo se delimitaron tres áreas: tratada (A), neutra (B) y control (C) (Fig.1). Se realizaron 6 réplicas por cada tratamiento y se evaluó la distribución de los insectos a distintos intervalos de tiempo durante 72 h. Con los datos se calculó un Índice de Repelencia (IR) a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Índice de repelencia (IR)} = \frac{\text{Número de insectos en C} - \text{Número de insectos en A}}{\text{Número de insectos en C} + \text{Número de insectos en A}}$$

Las películas se consideraron repelentes cuando el valor de IR fue superior a 0,1 o atrayentes cuando el valor de IR fue inferior a -0,1. Los valores entre estos límites indicaron que las películas no afectaron el comportamiento de los insectos.

**Figura 1.** Arena experimental para el bioensayo de repelencia.



### 2.7.1. Ensayo de penetrabilidad

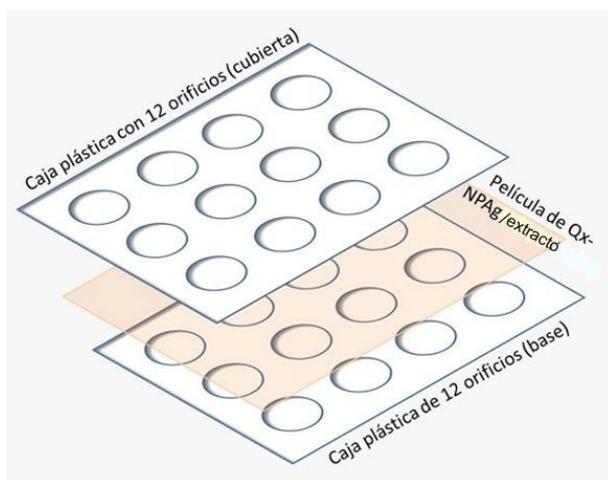
Este tipo de bioensayo permite evaluar la capacidad de perforación y penetración de *P. interpunctella*. Para llevar a cabo este experimento se utilizaron dos cajas plásticas (A y B) de 12,5 cm

x 8,4 cm de lado y 2 cm de espesor, que poseen 12 compartimentos. En cada uno de los orificios de la caja A se colocó alimento attractante (galletitas: Harina de trigo, azúcar, chips de cacao, huevo en polvo y olio margarina, aromatizante de vainilla, entre otros microingredientes) y en cada uno de los de la caja B, una larva. Entre ambas cajas se colocó las películas conteniendo el extracto de *S. areira* o las NPAg (tratamiento). Como referencia se usó la película control. Las dos cajas se sujetaron con abrazaderas de aluminio con tornillos de bloqueo (Fig.2). Los ensayos se repitieron cuatro veces para cada tipo de película. Las arenas experimentales se mantuvieron a  $27 \pm 1$  °C, 50 % HR y 16:8 h L:O de fotoperíodo con un dispositivo que actuaba a modo de prensa, con el objetivo de evitar que los insectos se escapen (abrazaderas de aluminio). El número de larvas que penetraron cada película se registró diariamente durante 15 días. Por último, se calculó un porcentaje de penetración basado en la ecuación de Lee (Lee *et al.*, 2017):

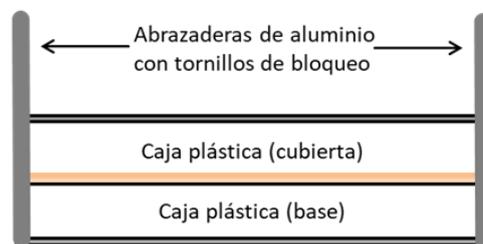
$$\text{Porcentaje de penetración}(\%) = \frac{\text{Número de larvas que penetraron la película}}{\text{Número inicial de larvas}} \times 100$$

**Figura 2.** Arena experimental para el bioensayo de penetración.

2 A.



2 B.



A. Vista superior de la arena de penetración, incluidas cajas de plástico con 12 orificios y películas a base de Qx.

B. Vista frontal de la arena de penetración, incluidas cajas de plástico, películas a base de Qx y abrazaderas de aluminio con tornillos de bloqueo.

## 2.8. Análisis estadístico

Los valores obtenidos de las propiedades de las películas y de los bioensayos realizados se sometieron a análisis ANOVA. La comparación de los valores fue realizada por Diferencia Mínima Significativa (DMS) a un nivel de significancia  $p=0,05$ . Los análisis estadísticos fueron realizados con SPSS 25.0.

# Resultados y Discusión

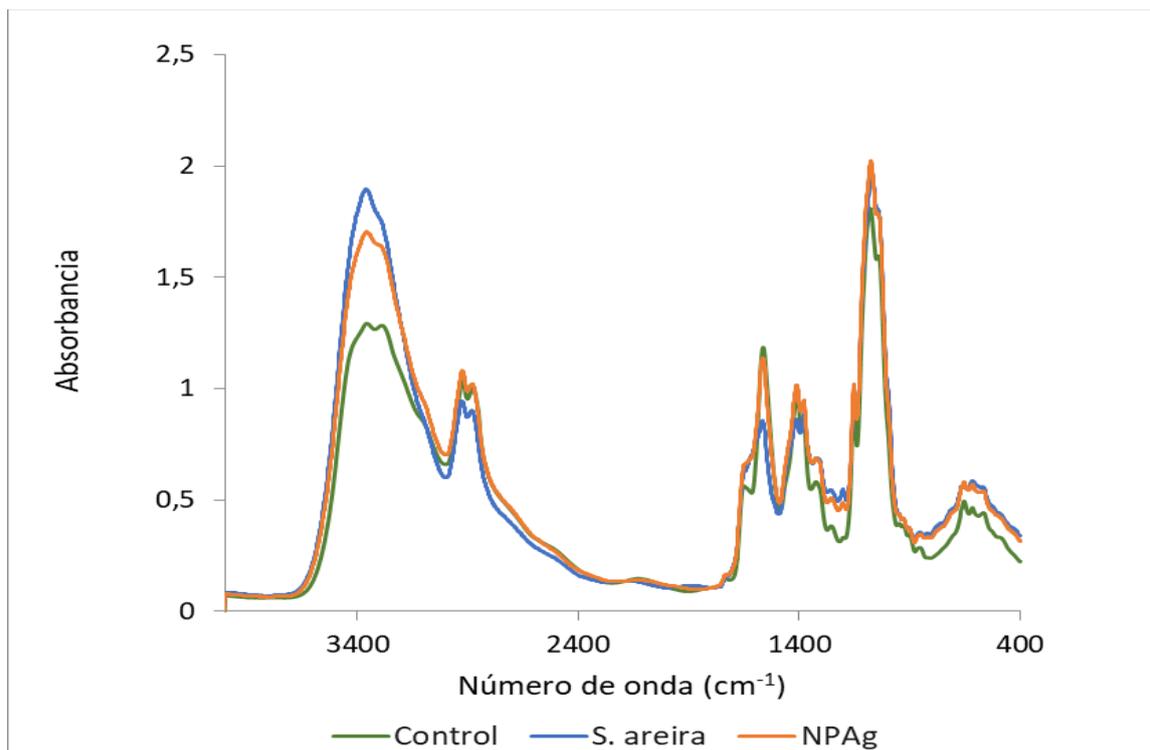
## 3.1. Caracterización de las películas activas

### 3.1.1. Análisis estructural

Los posibles cambios estructurales debido a la incorporación del extracto de *S. areira* o sus NP en la películas a base de Qx se analizaron mediante espectroscopía FTIR. La Figura 3 muestra los espectros FTIR de las películas control y las que contienen extracto de *S. areira* o NPAg. El espectro de la película control presenta las bandas características de este polisacárido, como reportan otros autores (Feng *et al.*, 2012; Ospina *et al.*, 2019; Tan *et al.*, 2019). Las principales bandas se detectan en 3600–3200  $\text{cm}^{-1}$  (vibraciones de estiramiento N-H y O-H), 2927 y 2882  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de estiramiento C-H), 1645  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de estiramiento CO del enlace amida residual), 1567  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de flexión N-H), 1379  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de flexión C-H), 1152  $\text{cm}^{-1}$  (estiramiento anti-simétrico C-O-C) y 1140–960  $\text{cm}^{-1}$  (vibración de estiramiento C-O). La banda en 1735  $\text{cm}^{-1}$  podría estar relacionada con Tween 80, que se utiliza como tensioactivo hidrofílico en todas las películas obtenidas (Fu *et al.*, 2015).

En general, no se observan grandes diferencias entre los espectros de las películas conteniendo tanto el extracto natural como las nanopartículas metálicas en comparación con la película control. En tal sentido, no se detectan bandas adicionales de vibración o cambios significativos en la posición de las bandas, lo que demuestra que no se produjeron nuevos enlaces en las películas. Sin embargo, puede apreciarse un notable aumento en la intensidad del pico en 3500–3200  $\text{cm}^{-1}$  que podría estar relacionado con la presencia del extracto. Este pico está asociado a los grupos funcionales O-H, que también están presentes en el quitosano, pero en el caso del extracto corresponden a los secoiridoides/flavonoides/ácidos fenólicos presentes en el mismo (Elhawary *et al.*, 2022). En el espectro de la película que contiene las nanopartículas metálicas y el extracto, la altura de este pico es menor que el de la película que presenta sólo el extracto. Esto podría deberse a que parte de esos grupos se consumieron en la reducción del nitrato de plata. Otra diferencia se observa en las intensidades del hombro en 1645  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración de estiramiento C=C de anillos aromáticos (Barud *et al.*, 2013; Franca, *et al.*, 2014; Edison y Sethuraman, 2013), donde la presencia del extracto aumenta la intensidad del mismo. En este caso no se observa diferencia de altura entre las películas que contienen extracto solamente y aquellas que además del extracto tienen nanopartículas de plata en su formulación. Esto pone en evidencia que los grupos asociados a esta señal no participarían en la reducción del nitrato. Las bandas entre 1280 y 960  $\text{cm}^{-1}$ , asociadas al estiramiento de los grupos C-O, presentan una mayor intensidad para las películas que contienen extracto. Esto mismo sucede para las bandas localizadas entre 680 y 610  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden al estiramiento del grupo C-H.

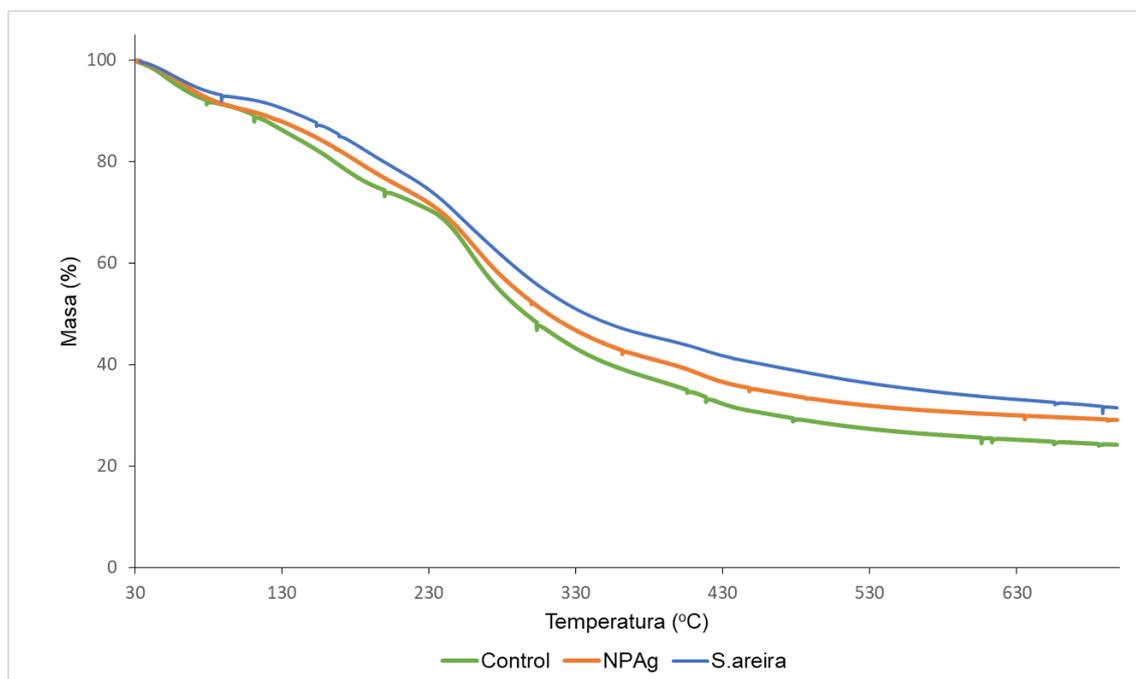
**Figura 3.** Espectros FTIR de las películas control y las que contienen el extracto de *S. areira* y NPAg.



### 3.1.2. Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de las películas es un factor crucial para diversas aplicaciones, principalmente para la fabricación de envases. En tal sentido, esta propiedad se analizó mediante termogravimetría tanto para las películas control, como para aquellas que contienen el extracto de *S. areira* y las NPAg. En la Figura 4 se presentan las curvas de masa porcentual en función de la temperatura para los tres tipos de película analizadas. Como puede verse, la curva correspondiente a la película control presenta varias caídas (pérdidas de masa) en el rango de temperaturas analizado. La primera caída (30 - 80 °C) se asocia con el agua adsorbida y la masa de ácido acético residual en la matriz polimérica (González *et al.*, 2000; Yeh *et al.*, 2006). La segunda pérdida de masa, que ocurre entre los 80 y 190 °C, puede atribuirse a la pérdida de agua estructural, la cual queda atrapada en la red polimérica y a las cadenas de bajo peso molecular del quitosano (Shen y Kamdem, 2015). Los siguientes eventos térmicos pueden atribuirse a la primera etapa de degradación del quitosano (190 - 280 °C) (Lin y Pascall, 2014) y del Tween 80 (280 - 410 °C) (Sánchez-González *et al.*, 2010), respectivamente. La última pérdida de masa está directamente relacionada con la etapa final de descomposición del quitosano en el rango de temperaturas analizado (Damasceno *et al.*, 2020).

**Figura 4.** Curvas termogravimétricas de las películas control y las que contienen extracto de *S. areira* y NPAg.



En lo que respecta a las curvas de las películas que contienen sólo el extracto y aquellas que presentan nanopartículas en su formulación, puede verse que la forma general de la curva es muy similar a la de las películas control. Sin embargo, es posible apreciar pequeñas variaciones relacionadas principalmente con la cantidad de masa presente luego de cada evento de degradación y las temperaturas a las que estos ocurren, evidenciando un leve incremento de la estabilidad térmica de las películas. Este comportamiento puede atribuirse a una mayor organización en la matriz polimérica, generando una estructura más homogénea (Noshirvani *et al.*, 2017) y a la fuerte interacción que existe entre el extracto y las nanopartículas con las cadenas de quitosano, tal como se visualizó por FTIR. Es importante destacar, las diferencias apreciables en cuanto a la masa remanente al finalizar el ensayo. Las películas que contienen nanopartículas en su composición mostraron mayor porcentaje de masa residual al llegar a los 700 °C que el control, mientras que las películas que sólo contienen extracto presentaron porcentajes aún más altos. Esto puede deberse principalmente a la cantidad relativa de biomasa presente en el extracto, que frente al incremento de la temperatura se carbonizan y a la presencia propia de las nanopartículas.

### 3.1.3. Propiedades mecánicas

En la Tabla 1 se observan los espesores de las tres películas a base de Qx. En principio se puede observar que, el espesor de las películas de quitosano conteniendo las partículas metálicas no es significativamente ( $p > 0,05$ ) diferente al de la película control. Sin embargo, las películas que contienen sólo el extracto de *S. areira* tienen un espesor significativamente mayor que el de la película control. Este aumento podría deberse a la disrupción causada por las gotas de extracto en las cadenas de quitosano, la cual se vuelve más significativa con el incremento de la cantidad relativa de extracto en

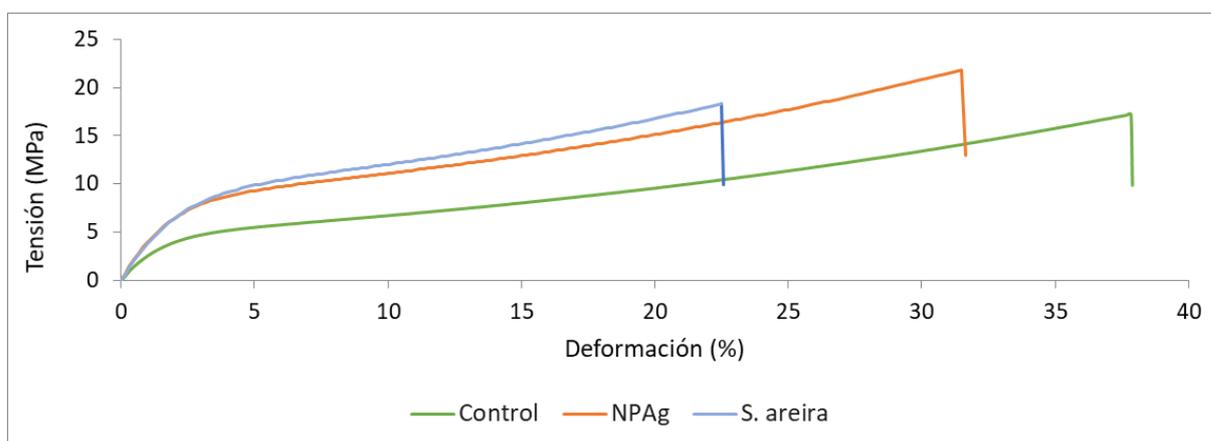
las películas. Esto condice con lo observado por otros autores (Tongnuanchan y Benjakul, 2012; Hromiš *et al.*, 2015; Rambabu *et al.*, 2019).

**Tabla 1.** Espesor y propiedades mecánicas de las películas control y las que contienen extracto de *S. areira* y NPAg.

Película	Espesor ( $\mu\text{m}$ )	Módulo elástico (MPa)	Resistencia mecánica (MPa)	Deformación en la rotura (%)
Control	$21,75 \pm 3,20^a$	$239,46 \pm 31,05^a$	$18,10 \pm 3,38^a$	$34,37 \pm 3,23^a$
<i>S. areira</i>	$32,75 \pm 4,99^b$	$360,95 \pm 45,78^b$	$15,32 \pm 3,24^a$	$18,04 \pm 4,04^b$
NPAg	$23,67 \pm 2,08^a$	$327,98 \pm 52,89^b$	$23,86 \pm 1,91^b$	$31,89 \pm 1,13^a$

\*En cada columna (variable), distintas letras indican diferencias estadísticas significativas entre las películas ( $p < 0,05$ ).

**Figura 5.** Curvas tensión-deformación representativas de las películas control y las que contienen extracto de *S. areira* y NPAg.



Las curvas representativas de tensión-deformación se presentan en la Figura 5 en tanto que las principales propiedades mecánicas se resumen en la Tabla 1. A partir de las curvas se observa que la película control presenta un comportamiento mecánico característico de este polisacárido (Kumari *et al.*, 2021). Los valores promedio de las propiedades mecánicas de esta película coinciden con los reportados por Söğüt y Seydim (2018) para películas de Qx obtenidas por casting. La incorporación del extracto de *S. areira* y de las partículas metálicas en la matriz de Qx condujo a un aumento significativo en el módulo elástico de las películas resultantes. Particularmente, esta propiedad mecánica está relacionada con la rigidez del material, es decir, la resistencia del material a ser deformado elásticamente y queda principalmente determinado por las fuerzas de enlace interatómico. El incremento observado podría estar relacionado con una buena interacción interfacial del extracto natural como de las partículas metálicas con las moléculas de Qx. Nuevamente, se evidencia que una mayor presencia de extracto en la formulación de la película induce cambios más significativos en la estructura de las cadenas de quitosano.

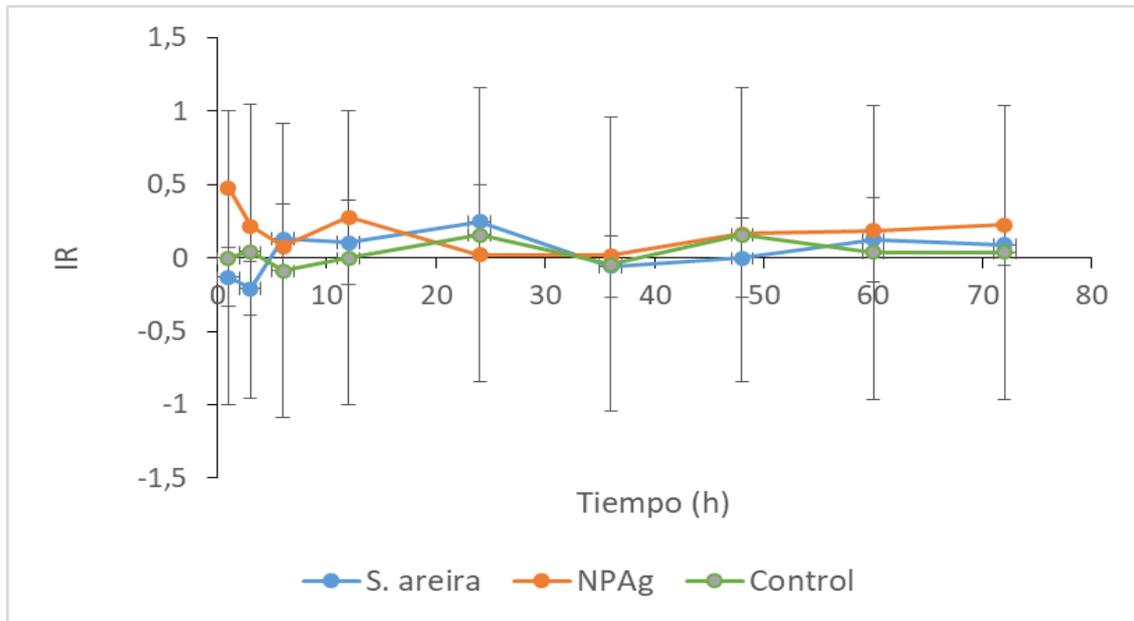
Respecto a la resistencia mecánica de las películas, se observa un notable incremento con la incorporación del extracto con las partículas metálicas, no siendo así el caso de la incorporación del extracto natural que conserva la resistencia de la película control. Este resultado demuestra el efecto reforzante de las NPAg como se ha demostrado en trabajos previos (Yoksan y Chirachanchai, 2010).

La deformación a la rotura de las películas conteniendo sólo el extracto natural se reduce significativamente. Teniendo en cuenta que esta propiedad indica la deformación que experimentan las películas en la rotura, este resultado evidencia que el movimiento de las cadenas de Qx se encuentra mayormente restringido por la incorporación del extracto, como han reportado otros autores (Ferreira *et al.*, 2014). Sin embargo, las partículas metálicas sumado al extracto permiten conservar la ductilidad, es decir, la capacidad de deformarse hasta la rotura de las películas de base Qx. Este comportamiento podría deberse a una menor presencia del extracto natural como consecuencia de su consumo en la reducción del nitrato de plata, lo que se traduce en una menor alteración estructural de las cadenas de Qx. Por lo tanto, las NPAg permiten no sólo incrementar la resistencia mecánica de las películas, propiedad necesaria para mantener la integridad estructural frente a esfuerzos, sino que también le otorga a las mismas una apropiada ductilidad.

### **3.2. Bioensayos**

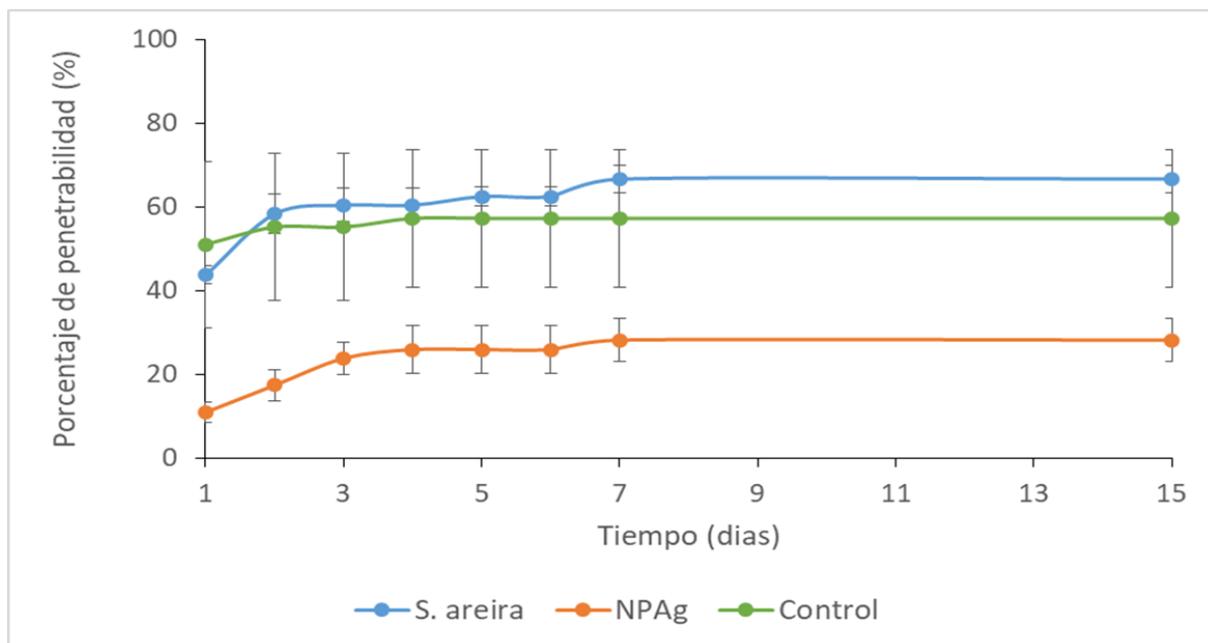
Los resultados del ensayo de repelencia para las películas control y las que contienen extracto de *S. areira* y NPAg empleando larvas de *P. interpunctella* durante 72 h se muestran en la Figura 6. A partir de los valores obtenidos es posible apreciar que no hay diferencias significativas entre las películas activas y el control, lo que indicaría que las películas conteniendo el extracto y las NP no tienen efectos repelentes sobre las larvas bajo estudio.

**Figura 6.** Índice de repelencia (IR) de las películas conteniendo extracto de *S. areira* y NPAG en larvas de *P. interpunctella*. Cada punto representa el valor medio del índice de repelencia con su respectivo error estándar (n= 6 réplicas).



Los resultados del ensayo de penetrabilidad en las películas conteniendo el extracto de *S. areira* y NPAG empleando larvas de *P. interpunctella* se muestran en la Figura 7. En base a los valores obtenidos luego de analizar la capacidad penetrante de las larvas durante 15 días, se observa que no hay diferencias significativas entre la película control y la que contiene extracto de *S. areira*, mostrando porcentajes de penetración similares ( $\approx 50\%$ ), entre los días 2 a 15. Por otro lado, las películas conteniendo NPAG presentan porcentajes de penetración significativamente menores que los obtenidos para la película control. En la Figura 3 se puede observar una etapa de leve aumento gradual de la penetrabilidad entre los días 2 y 6, alcanzado un valor constante luego de los 7 días. Es importante resaltar que los valores de penetrabilidad se encontraron por debajo del 30% e incluso del 20% en los primeros días, evidenciando de esta manera la eficacia de estas películas frente al control de insectos plaga.

**Figura 7.** Porcentaje de penetrabilidad de las larvas de *P. interpunctella* en películas conteniendo extracto de *S. areira* y NPAg. Cada punto representa el valor medio de penetrabilidad con su respectivo error estándar (n = 4 réplicas).



Como se ha mencionado anteriormente, una de las principales propiedades por la que se destacan los extractos vegetales es la actividad insecticida. Existen varios trabajos que han demostrado la actividad letal y subletal de los extractos vegetales en distintos insectos plaga (Tembo *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2017; Bouyad *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2017; Dolma *et al.*, 2021). La bioactividad de los extractos vegetales se debe a la inhibición del neurotransmisor acetilcolinesterasa y a la unión a los receptores GABA y octopaminérgicos, lo que provoca afecciones a nivel nervioso. Por otro lado, se comprobó que pueden inhibir la respiración mitocondrial al restringir el transporte de electrones durante la fosforilación oxidativa, dañar el intestino medio o afectar el desarrollo embriológico (Pavela *et al.*, 2019). En concordancia con este trabajo, Rattan (2010) demostró que los extractos pueden bloquear los efectos estimulantes de glucosa, afectando la nutrición de larvas de lepidópteros.

Por otra parte, la intervención de la nanotecnología ha permitido desarrollar nuevas nanoformulaciones, como las nanopartículas metálicas, que son una alternativa prometedora para el manejo de insectos plaga, dado sus dimensiones nanométricas, la forma y la carga de estas partículas (Kaur *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). Numerosos trabajos han reportado la bioactividad de nanopartículas metálicas sobre diferentes artrópodos plaga (Akintelu *et al.*, 2021; Sosenkova y Egorova, 2011; Manimegalai *et al.*, 2022; El-Monairy *et al.*, 2022). En cuanto a los mecanismos de acción, Bharani y Namasivayan (2017) demostraron que las nanopartículas de plata generan desnaturalización de las proteínas, ruptura de membrana y estrés oxidativo. Además, sugirieron que las afecciones a diferentes estructuras y procesos fisiológicos está dada por las propiedades físicas y químicas particulares de estas partículas. Asimismo, Benelli *et al.* (2018) describen cómo la nanopartícula puede difundir a través de la cutícula de los insectos gracias a su tamaño nanométrico, provocando cambios fisiológicos tales como

la deshidratación (al destruir la capa de cera), alteraciones en la pigmentación, necrosis en la hipodermis y reducción en el número de células regenerativas.

Como se mencionó previamente, en el campo de los envases activos conteniendo productos de origen natural como los AE, son escasos y recientes los trabajos que informan la actividad repelente e inhibidora de la penetrabilidad sobre larvas de *P. interpunctella* (Jo *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2013. Lee *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2018). Sin embargo, según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que plantea la incorporación de nanopartículas de plata elaboradas con extracto de *S. areira* en películas de Qx para prevenir la infestación de larvas de *P. interpunctella*. En cuanto a estas películas, se observó que las que contienen el extracto de *S. areira* no mostraron actividad repelente ni inhibidora de la penetrabilidad de las larvas. Esto podría deberse a que la efectividad de los extractos vegetales depende de la especie vegetal, del tipo de insecto, así como también del tiempo y modo de aplicación (Kim *et al.*, 2003). Por otra parte, las películas elaboradas con NPAg no produjeron repelencia, pero si redujeron el porcentaje de penetrabilidad de las larvas en comparación con las películas control y las que contienen sólo el extracto de *S. areira*. Estos resultados podrían explicarse teniendo en cuenta por un lado las propiedades intrínsecas de estas nanopartículas metálicas, por otro lado, por los resultados de los ensayos de propiedades mecánicas, en donde se observó una mayor resistencia de las películas que contienen NPAg. Por lo tanto, estas películas tienen propiedades mecánicas adecuadas que permiten la manipulación de las mismas y su utilización como material de envase activo para el manejo de insectos plaga.

## 4. Conclusión

Este estudio describe el desarrollo de películas a base de quitosano conteniendo extracto acuoso vegetal de *S. areira* y NPAg como material activo para prevenir la infestación de larvas de *P. interpunctella* en alimentos envasados. Si bien no mostraron efectos repelentes a lo largo de las 72 h, las películas que contienen las NPAg redujeron significativamente la tasa de penetración de las larvas respecto del control, con un porcentaje menor al 30%. La incorporación del extracto vegetal ni de las nanopartículas no modificó la estructura ni alteró la estabilidad térmica de la película control. Además, la presencia de las NPAg incrementó la rigidez y la resistencia mecánica, conservando la ductilidad de las películas control. Es importante resaltar que este estudio aporta nueva información sobre el potencial de las películas a base de quitosano conteniendo las NPAg para prevenir la infestación de *P. interpunctella* en alimentos envasados. Aun así, se requieren más estudios en cuanto a la actividad de estas películas en relación a los alimentos para su uso a escala comercial.

## 5. Referencias bibliográficas

- Abdelkhalek, A., Salem, M.Z., Kordy A. M., Salem A. Z., Behiry, S. I. (2020). Antiviral, antifungal, and insecticidal activities of Eucalyptus bark extract: HPLC analysis of polyphenolic compounds. *Microb. Pathog*, 147, 104383.
- Ahmed, M., Peiwen, Q., Gu, Z., Liu, Y., Sikandar, A., Hussain, D., Ji, M. (2020). Insecticidal activity and biochemical composition of *Citrullus colocynthis*, *Cannabis indica* and *Artemisia argyi* extracts against cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.). *Sci. Rep.*, 10, 1-10.
- Akintelu, S. A., Folorunso, A. S., Oyebamiji, A. K., Olugbeko, S. C. (2021). Mosquito repellent and antibacterial efficiency of facile and low-cost silver nanoparticles synthesized using the leaf extract of *Morinda citrifolia*. *Plasmonics*, 1-12.
- Allotey, J., Goswami, L. (1990). Comparative biology of two phycitid moths, *Plodia interpunctella* (Hubn.) and *Ephestia cautella* (Wlk.) on some selected food media. *Int. J. Trop. Insect Sci.*, 11, 209-215.
- Ansari, M. S., Moraiet, M. A., Ahmad, S. (2014). Insecticides: impact on the environment and human health en: Environmental deterioration and human health. Malik, A., Grohmann, E., Akhtar, R. (Ed). Springer. Dordrecht, Países Bajos.99-123.
- Aulicky R., Vendl T., Stejskal V. (2019).Evaluation of contamination of packages containing cereal fruit bars by eggs of the pest Indian meal moth (*Plodia interpunctella*-Lepidoptera) due to perforations in their polypropylene foil packaging. *Journal of food science and technology*. 56, 3293-3299.
- Bali, A. S., Batish, D. R., Singh, H. P. (2016). Allelopathic effect of aromatic plants: Role of volatile essential oils. *J. Global. Biosci.*, 5, 4386-4395.
- Barone, A. S., Matheus, J. R. V., de Souza, T. S. P., Moreira, R. F. A., Fai, A. E. C. (2021). Green-based active packaging: Opportunities beyond COVID-19, food applications, and perspectives in circular economy— A brief review. *CRFSFS*, 20, 4881-4905.
- Barud, H., Júnior, A., Saska, S., Mestieri,(2013).Antimicrobial Brazilian propolis (EPP-AF) containing biocellulose membranes as promising biomaterial for skin wound healing, *eCAM*, 1-10.
- Benelli, G. (2018). Mode of action of nanoparticles against insects. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 12329-12341.
- Benelli, G., Pavela, R., Maggi, F., Wandjou, J. G. N., Koné-Bamba, D., Sagratini, G., Caprioli, G. (2019). Insecticidal activity of the essential oil and polar extracts from *Ocimum gratissimum* grown in Ivory Coast: Efficacy on insect pests and vectors and impact on non-target species. *Ind. Crops. Prod.*, 132, 377-385.
- Betancur-Corredor, B., Pino, N., Peñuela, G. A., Cardona-Gallo, S. (2013). Biorremediación de suelo contaminado con pesticidas: caso DDT. *Gestión y Ambiente*, 16, 119-135.

- Bharani, R. A., Namasivayam, S. K. R. (2017). Biogenic silver nanoparticles mediated stress on developmental period and gut physiology of major lepidopteran pest *Spodoptera litura* (Fab.)(Lepidoptera: Noctuidae)—An eco-friendly approach of insect pest control. *Journal of environmental chemical engineering*, 5, 453-467.
- Bhattacharyya, A., Bhaumik, A., Rani, P. U., Mandal, S., Eparti, T. T. (2010). Nano-particles-A recent approach to insect pest control. *Afr. J. Biotechnol.*, 9, 3489-3493.
- Bianco C., Isso F., Moskat M. (2021). Plásticos en América Latina: Breve Reseña de su Producción, Consumo e Impacto Ambiental. GAIA. Documento consultado mayo 2022.
- Bouayad, N., Rharrabe, K., Ghailani, N. N., Jbilou, R., Castañera, P., Ortego, F. (2013). Insecticidal effects of Moroccan plant extracts on development, energy reserves and enzymatic activities of *Plodia interpunctella*. *Spanish journal of agricultural research*, 11, 189-198.
- Brechelt, A. (2004). El manejo ecológico de plagas y enfermedades. Rozas, M.E., Valveknes, A., Bejarano, F. (Eds). *Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina (RAP-AL)*. Santiago, Chile.1-36.
- Campos, E. V., De Oliveira, J. L., Pascoli, M., De Lima, R., Fraceto, L. F. (2016). Neem oil and crop protection: from now to the future. *Front. Plant Sci.*, 7, 1494.
- Chapman, A. D. (2009). Numbers of living species in Australia and the world.
- Coats, J. R. (2012). Mode of action of Pyrethroids en: *Insecticide mode of action*. Coats, J. R. (Ed). Academic Press. Iowa, USA.16 pp.
- Costa-Neto, E. M. (2005). Entomotherapy, or the medicinal use of insects. *J. Ethnobiol.*, 25, 93-114.
- Damasceno, E. T., Almeida, R. R., de Carvalho, S. Y., Vieira, S. S., Mano, V., Guimarães, L. G. D. L. (2020). Nano-encapsulation of *lippia origanoides* kunth. Essential oil by chitosan-caffeic acid nanogel. *Química Nova*, 43, 16-23.
- Dhifi, W., Bellili, S., Jazi, S., Bahloul, N., Mnif, W. (2016). Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines*, 3, 25.
- Dixit, S., Ali, H. (2010). Anticancer activity of medicinal plant extract-a review. *J. Chem. & Cheml. Sci.*, 1, 79-85.
- Dolma, S. K., Suresh, P. S., Singh, P. P., Sharma, U., Reddy, S. G. (2021). Insecticidal activity of the extract, fractions, and pure steroidal saponins of *Trillium govonianum* W all. Ex D. D on for the control of diamondback moth (*Plutella xylostella* L.) and aphid (*Aphis craccivora* K och). *Pest management science*, 77, 956-962.
- Drago, E., Campardelli, R., Pettinato, M., Perego, P. (2020). Innovations in smart packaging concepts for food: an extensive review. *Foods*, 9, 1628.
- Edison, T., Sethuraman, M. (2013). Biogenic robust synthesis of silver nanoparticles using *Punica granatum* peel and its application as a green catalyst for the reduction of an

- anthropogenic pollutant 4-nitrophenol, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 104, 262-264.
- Elhawary, S., Hala, E. H., Mokhtar, F. A., Sobeh, M., Mostafa, E., Osman, S., El-Raey, M. (2022). Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extract of *Jasminum officinal* L. Leaves and Evaluation of Cytotoxic Activity Towards Bladder (5637) and Breast Cancer (MCF-7) Cell Lines [Retraction]. *Int. J. Nanomedicine*, 17, 2805-2806.
  - El-Monairy, O. M., El-Sayed, A. A., Emara, M. M., Abdel-Meguid, A. D. (2022). Larvicidal Activity of Green Synthesized Silver Nanoparticles and Chitosan Nanoparticles Encapsulated Aloe vera Gel Extract against *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Current Materials Science: Formerly: Recent Patents on Materials Science*, 15, 102-114.
  - Feng, F., Liu, Y., Zhao, B., Hu, K. (2012). Characterization of half N-acetylated chitosan powders and films. *Procedia Engineering*, 27, 718–732.
  - Ferreira A. S., Nunes C., Castro A., Ferreira P., Coimbra, M. A. (2014). Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties, *Carbohydr. Polym.*, 113, 490– 499.
  - Franca, J., De Luca, M., Ribeiro, T. (2014). Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14-478.
  - Fu, X., Kong, W., Zhang, Y., Jiang, L., Wang, J., Lei, J. (2015). Novel solid–solid phase change materials with biodegradable trihydroxy surfactants for thermal energy storage. *RSC Advances*, 5, 68881–68889.
  - Gómez-Pérez, R., Rojas, G., Miranda-Contreras, L., Cruz, I., Berrueta, L., Salmen, S., Osuna, J. A. (2011). Efectos de exposición ocupacional a plaguicidas sobre la integridad de la cromatina espermática. *RVEM*, 9, 67-78.
  - Gonzalez, V., Guerrero, C., Ortiz, U. (2000). Chemical structure and compatibility of polyamide–chitin and chitosan blends. *J. Appl. Polym. Sci.*, 78, 850–857.
  - Grauso, L., Cesarano, G., Zotti, M., Ranesi, M., Sun W., Bonanomi, G., Lanzotti, V. (2020). Exploring *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter phytochemical diversity to explain its antimicrobial, nematicidal and insecticidal activity. *Phytochem Rev.*, 19, 659-689.
  - Gul, H. T., Saeed, S., Khan, F. Z. A., Manzoor, S. A. (2014). Potential of nanotechnology in agriculture and crop protection: *A. Appl. Sci. Bus. Econ.*, 1, 23-28.
  - Gutiérrez, W., Cerda, P., Plaza-Plaza, J. C., Mieres, J. J., Paris, E., Ríos, J. C. (2015). Caracterización de las exposiciones a plaguicidas entre los años 2006 y 2013 reportadas al Centro de Información Toxicológica de la Pontificia Universidad Católica de Chile. *Rev. Med. Chil.*, 143, 1269-1276.
  - Han, G. D., Kum, H. J., Chun, Y. S., Na, J., Kim, W. (2017). Repellency and attractancy of plant extracts against *Plodia interpunctella* and *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, 74, 33-35.

- Han, J. W., Ruiz-Garcia, L., Qian, J. P., Yang, X. T. (2018). Food packaging: A comprehensive review and future trends. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 17, 860-877.
- Hill, D. S. 1990. *Pest of Stored Products and Their Control*. Belhaven Press. London, UK. 274 pp.
- Hromiš N.M., Lazić V.L., Markov S.L., Vaštag Z.G., Popović S.Z., Šuput D.Z., Džinić N., Velićanski, A.S. (2015). Popović, Optimization of chitosan biofilm properties by addition of caraway essential oil and beeswax, *J. Food Eng.* 158, 86–93.
- Hsieh, P. C., Mau, J. L., Huang, S. H. (2001). Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiol.*, 18, 35-43.
- Hua, K. H., Wang, H. C., Chung, R. S., Hsu, J. C. (2015). Calcium carbonate nanoparticles can enhance plant nutrition and insect pest tolerance. *J. Pestic. Sci.*, 40, 208-213.
- Ijaz, M., Zafar, M., Iqbal, T. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles by using various extracts: a review. *Inorg. Nano-Met. Chem.*, 51, 744-755.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah, M.K. (2018). Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.*, 9, 1050-1074.
- Jesser, E. N., Werdin-González, J. O., Murray, A. P., Ferrero, A. A. (2017). Efficacy of essential oils to control the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Asia Pac. Entomol.*, 20, 1122-1129.
- Jesser, E., Castillo, L., Alonso, Y., Urrutia, R. I., Murray, A. P., Domini, C., Werdin-González, J. O. (2022). Development of active biodegradable films based on chitosan and essential oil to prevent infestation of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Food Packaging and Shelf Life*, 34, 100999.
- Jiang, Z. (2016). How many species are there on Earth? *Chinese Science Bulletin*, 61, 2337-2343.
- Jiménez, E. (2009). *Métodos de control de plagas*. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- Jo, H. J., Park, K. M., Na, J. H., Min, S. C., Park, K. H., Chang, P. S., Han, J. (2015). Development of anti-insect food packaging film containing a polyvinyl alcohol and cinnamon oil emulsion at a pilot plant scale. *J. Stored Prod. Res.*, 61, 114-118.
- Ju, J., Chen, X., Xie, Y., Yu, H., Guo, Y., Cheng, Y., Yao, W. (2019). Application of essential oil as a sustained release preparation in food packaging. *Trends Food. Sci. Technol.*, 92, 22-32.
- Kaur, G., Sharma, S., Mir, S. A., Dar, B. N. (2021). Nanobiocomposite Films: a “Greener Alternate” for Food Packaging. *Food Bioproc. Tech.*, 14, 1013-1027.
- Khan, S., Taning, C. N. T., Bonneure, E., Mangelinckx, S., Smagghe, G., Shah, M. M. (2017). Insecticidal activity of plant-derived extracts against different economically important pest insects. *Phytoparasitica*, 45, 113-124.

- Kim, I.H., Han, J., Na, J. H., Chang, P.S., Chung, M.S., Park, K. H., Min, S.C. (2013). Insect-resistant food packaging film development using cinnamon oil and microencapsulation technologies. *Journal of Food Science*. 78, 229-237.
- Kim, S. I., Roh, J. Y., Kim, D. H., Lee, H. S., Ahn, Y. J. (2003). Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis*. *Journal of Stored products research*, 39, 293-303.
- Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *J. Microbiol. Methods*, 81, 121-126.
- Kuai, L., Liu, F., Chiou, B.S., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T.H., Zhong, F. 2021. Controlled release of antioxidants from active food packaging: A Review. *Food Hydrocoll.*, 120, 106992.
- Kumari, S., Singh, R. P., Chavan, N. N., Sahi, S. V., Sharma, N. (2021). Characterization of a novel nanocomposite film based on functionalized chitosan–Pt–Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hybrid nanoparticles. *Nanomaterials*, 11, 1275.
- Lacey, L. A., Frutos, R., Kaya, H. K., Vail, P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biol. Control.*, 21, 230-248.
- Lee J.S., Chang Y., Park M.A., Oh J., Ha J. (2020). Insect-repellent activity of PET-based film with star anise essential oil and its pilot-scale production for food packaging. *Food Packaging and Shelf Life*. 25,100539.
- Lee, J. S., Park, M. A., Yoon, C. S., Na, J. H., Han, J. (2019). Characterization and preservation performance of multilayer film with insect repellent and antimicrobial activities for sliced wheat bread packaging. *J. Food Sci.*, 84, 3194-3203.
- Lee, S. H., Chang, Y., Na, J. H., Han, J. (2017). Development of anti-insect multilayered films for brown rice packaging that prevent *Plodia interpunctella* infestation. *J. Stored Prod. Res.*, 72, 153-160.
- Li, C., Han, Y., Gao, T., Zhang, J., Xu, D. X., Wāng, Y. (2022). Insecticidal activity of metallic nanopesticides synthesized from natural resources: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 1-36.
- Lin, S. J., Pascall, M. A. (2014). Incorporation of vitamin E into chitosan and its effect on the film forming solution (viscosity and drying rate) and the solubility and thermal properties of the dried film. *Food Hydrocoll.* 35, 78–84.
- Manimegalai, T., Raguvaran, K., Kalpana, M., Ajarem, A. J. S., Allam, A. A., Khim, J. S., Maheswaran, R. (2022). Bio efficacy of synthesised silver nanoparticles using *Dicrocephala integrifolia* leaf extract and their insecticidal activity. *Materials Letters*, 314, 131860.
- McDonough M.X., Mason L.J., Woloshuk C.P., 2011. Susceptibility of stored product insects to high concentrations of ozone at different exposure intervals. *Journal of Stored Product Research*. 47, 306-310.

- McKnight, U. S., Rasmussen, J. J., Kronvang, B., Binning, P. J., Bjerg, P. L. (2015). Sources, occurrence and predicted aquatic impact of legacy and contemporary pesticides in streams. *Environ. Pollut.* 200, 64-76.
- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *J. Leukoc. Biol.*, 78, 585-594.
- Meffe, R., de Bustamante, I. (2014). Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: a first overview of the situation in Italy. *Sci. Total Environ.* 481, 280-295.
- Michaud, J.C., Farrant L., Jan O. (2010). Environmental Benefits of Recycling e 2010 Update. *Wrap Report. Material Change for a Better Environment.* 1-255.
- Mittal, A.K., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2013). Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. *Biotechnol. Adv.*, 31, 346–356.
- Mohandass, S., Arthur, F. H., Zhu, K., Throne, J. E. (2007). Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. *J. Stored Prod. Res.*, 43, 302-311.
- Morris, B. (2020). *Insects and agriculture en: Insects and human life.* Morris, B. (Ed) Routledge. New York. USA. 109-145.
- Mujtaba, M., Morsi, R. E., Kerch, G., Elsabee, M. Z., Kaya, M., Labidi, J., Khawar, K. M. (2019). Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *Int. J. Biol. Macromol.* 121, 889-904.
- Nansen, C., Phillips, T. W. (2003). Ovipositional responses of the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) to oils. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 96, 524-531.
- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8, 17-29.
- Ncube L.K., Ude A.U., Ogunmuyiwa E.N., Zulkifli R., Beas I.N. (2021). An Overview of Plastic Waste Generation and Management in Food Packaging Industries. *Recycling.* 6, 1- 25.
- Noshirvani, N., Ghanbarzadeh, B., Gardrat, C., Rezaei, M. R., Hashemi, M., Le Coz, C., Coma, V. (2017). Cinnamon and ginger essential oils to improve antifungal, physical and mechanical properties of chitosan-carboxymethyl cellulose films. *Food Hydrocolloids*, 70, 36–45.
- Ospina, J. D., Grande, C. D., Monsalve, L. V., Adv~Ancula, R. C., Valencia, M. E., Fan, J., Rodrigues, D. (2019). Evaluation of the chitosan films of essential oils from *Origanum vulgare* L (oregano) and *Rosmarinus officinalis* L (rosemary). *Revista Cubana Délelõ tt Plantas Medicinales*, 24.
- Pascoli, M., Jacques, M.T., Agarrayua, D.A., Avila, D.S., Lima, R., Fraceto, L.F. (2019). Neem oil based nanopesticide as an environmentally-friendly formulation for applications in sustainable agriculture: An ecotoxicological perspective *Sci. Total Environ...*, 677, 57-67.
- Pathania, D., Sharma, M., Kumar, S., Thakur, P., Torino, E., Janas, D., Thakur, S. (2021). Essential oil derived biosynthesis of metallic nano-particles: Implementations above essence. *SM&T*, 30, e00352.

- Pavela, R., Maggi, F., Iannarelli, R., Benelli, G. (2019). Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. *Acta tropica*, 193, 236-271.
- Pérez, J. C., Ramírez, S., Suris, M. (2012). Biología de *Plodia interpunctella* Hubner sobre garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones de laboratorio. *Revista de Protección Vegetal*, 27, 90-94.
- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT- Food Sci. Technol.*, 38, 859-865.
- Rahangdale, D., Joshi, N., Kumar, A. (2019). Chitosan and Its Derivatives: A New Versatile Biopolymer for Various Applications en: *Functional Chitosan*. Sougata, J., Subrata, J. (Ed). Springer. Singapore, Singapore.1-42.
- Rahel, J., Jonasova, E., Nesvorna, M., Klubal, R., Erban, T., Hubert, J. (2013). The toxic effect of chitosan/metal-impregnated textile to synanthropic mites. *Pest Manag. Sci.*, 69, 722-726.
- Rambabu, K., Bharath, G., Banat, F., Show, P. L., Cocolletzi, H. H. (2019). Mango leaf extract incorporated chitosan antioxidant film for active food packaging. *Int. J. Biol. Macromol.*, 126, 1234-1243.
- Rana, A., Yadav, K., Jagadevan, S. (2020). A comprehensive review on green synthesis of nature-inspired metal nanoparticles: Mechanism, application and toxicity. *J. Clean. Prod.*, 272, 122880.
- Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop protection*, 29, 913-920.
- Rees, D. (2004). Impacts of infestation en: *Insects of stored products*. Rees, D. (Ed). CSIRO publishing. Melbourne.Australia.2.
- Requena, R., Vargas, M., Chiralt, A. (2017). Release kinetics of carvacrol and eugenol from poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) (PHBV) films for food packaging applications. *Eur. Polym. J.*, 92, 185-193.
- Ribeiro-Santos, R., Andrade, M., Sanches-Silva, A. (2017). Application of encapsulated essential oils as antimicrobial agents in food packaging. *Curr. Opin. Food Sci.*, 14, 78-84.
- 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.
- Shahzad, K., Manzoor, F. (2019). Nanoformulations and their mode of action in insects: a review of biological interactions. *Drug Chem. Toxicol.*, 42, 1-11.
- Sharma S., Barkauskaite S., Jaiswal S. (2021). Essential Oils as Additives in Active Food Packaging. *Food Chem.*, 343-128403

- Shen Z., Kandem D.P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *Int. J. Biol. Macromol.*, 74, 289-296.
- Singh, A., Dhiman, N., Kar, A.K., Singh, D., Purohit, M.P., Ghosh, D., Patnaik, S. (2020). Advances in Controlled Release Pesticide Formulations: Prospects to Safer Integrated Pest Management and Sustainable Agriculture. *J. Hazard. Mater.* 385, 121525.
- SÖĞÜT, E., Seydim, A. C. (2018). Development of Antioxidant Chitosan Films Incorporated with Quinoa Extract. *EJFST*, 2, 19-27.
- Solowey, E., Lichtenstein, M., Sallon, S., Paavilainen, H., Solowey, E., Lorberboum-Galski, H. (2014). Evaluating medicinal plants for anticancer activity. *The Scientific World Journal*.
- Song, A.Y., Choi, H.Y., Lee, E.S., Ham, J., Min, S.C. (2018). Development of anti-insect microencapsulated polypropylene films using a large-scale film coating system. *Journal of Food Science*. 82, 1011-1016.
- Sosenkova, L. S., Egorova, E. M. (2011). The effect of particle size on the toxic action of silver nanoparticles. In *Journal of Physics: Conference Series* (Vol. 291, No. 1, p. 012027). IOP Publishing.
- Stejskal V., Bostlova M., Nesvorna M., Volek V., Dolezal V., Hubert J. (2017). Comparison of the resistance of mono- and multilayer packaging films to stored-product insects in a laboratory test. *Food Control*. 73, 566-573.
- Strambeanu, N., Demetrovici, L., Dragos, D., Lungu, M. (2015). Nanoparticles: Definition, classification and general physical properties. *Nanoparticles' Promises and Risks: Characterization, Manipulation, and Potential Hazards to Humanity and the Environment*, 3-8.
- Tamang, N., Shrestha, P., Khadka, B., Mondal, M.H., Saha, B., Bhattarai, A. (2022). A Review of Biopolymers Utility as Emulsion Stabilizers. *Polymers*. 14, 1- 20.
- Tan, W., Dong, F., Zhang, J., Zhao, X., Li, Q., Guo, Z. (2019). Physical and antioxidant properties of edible chitosan ascorbate films. *J. Agric. Food Chem*, 67, 2530–2539.
- Tao, R., Sedman, J., Ismail, A. (2021). Antimicrobial activity of various essential oils and their application in active packaging of frozen vegetable products. *Food Chem.*, 360, 129956.
- Tedeschi, P., Leis, M., Pezzi, M., Civolani, S., Maietti, A., Brandolini, V. (2011). Insecticidal activity and fungitoxicity of plant extracts and components of horseradish (*Armoracia rusticana*) and garlic (*Allium sativum*). *J. Environ. Sci. Health*, 46, 486-490.
- Tembo, Y., Mkindi, A. G., Mkenda, P. A., Mpumi, N., Mwanauta, R., Stevenson, P. C., Belmain, S. R. (2018). Pesticidal plant extracts improve yield and reduce insect pests on legume crops without harming beneficial arthropods. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1425.
- Tongnuanchan, S., Benjakul, T. (2012). Prodran, Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils, *Food Chem*. 134, 1571–1579,

- Udayakumar, G. P., Muthusamy, S., Selvaganesh, B., Sivarajasekar, N., Rambabu, K., Banat, F., Show, P. L. (2021). Biopolymers and composites: Properties, characterization and their applications in food, medical and pharmaceutical industries. *J. Environ. Chem. Eng.*, 9, 105322.
- Urretabizkaya, D., Vasicek, J.P., Saini, E.D.(2010). Insectos perjudiciales de importancia agronómica.I Lepidópteros. Ediciones INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria).77.1-73.
- Valencia-Sullca, C., Vargas, M., Atarés, L., Chiralt, A. (2018). Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer films containing essential oils. *Food Hydrocoll*, 75, 107-115.
- Vega, A. M. (2017). Agentes causales de daños a plantas en: Control de plagas y enfermedades forestales. Úbeda I. H. (Ed). Mundi-Prensa. Madrid, España.14-43.
- Wong-Paz, J. E., Contreras-Esquivel, J. C., Rodríguez-Herrera, R., Carrillo-Inungaray, M. L., López, L. I., Nevárez-Moorillón, G. V., Aguilar, C. N. (2015). Total phenolic content, in vitro antioxidant activity and chemical composition of plant extracts from semiarid Mexican region. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, 8, 104-111.
- Wu, H., Lei, Y., Lu, J., Zhu, R., Xiao, D., Jiao, C., Li, M. (2019). Effect of citric acid induced crosslinking on the structure and properties of potato starch/chitosan composite films. *Food Hydrocoll.*, 97, 105208.
- Yeh, J. T., Chen, C. L., Huang, K. S., Nien, Y. H., Chen, J. L., Huang, P. Z. (2006). Synthesis, characterization, and application of PVP/chitosan blended polymers, *J. Appl. Polym. Sci.* 101, 885–891.
- Yoksan, R., Chirachanchai, S. (2010). Silver nanoparticle-loaded chitosan–starch-based films: Fabrication and evaluation of tensile, barrier and antimicrobial properties. *Mater. Sci. Eng. C*, 30, 891-897.
- Yuan, Y., Huang, M., Pang, Y. X., Yu, F. L., Chen, C., Liu, L. W.,Hu, X. (2016). Variations in essential oil yield, composition, and antioxidant activity of different plant organs from *Blumea balsamifera* (L.) DC. at different growth times. *Molecules*, 21, 1024.
- Yucra, S., Gasco, M., Rubio, J., Gonzales, G. F. (2008). Exposición ocupacional a plomo y pesticidas órganofosforados: efecto sobre la salud reproductiva masculina. *Revista Peruana de medicina experimental y salud pública*, 25, 394-402.