

“PELÍCULAS ACTIVAS DE QUITOSANO CARGADAS
CON ACEITES ESENCIALES COMO ESTRATEGIA DE
CONTROL DE LA POLILLA DE LA FRUTA SECA,
Plodia interpunctella (LEPIDOPTERA, PYRALIDAE)”



Películas de
Quitosano

Alumna

Romina Gómez

Director

**Dr. Jorge Omar Werdin
González**

Co Directora

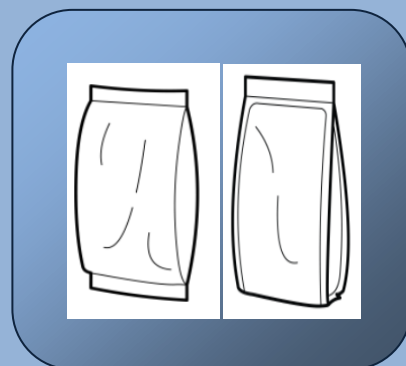
Dra. Luciana Castillo



Aceites Esenciales

ENVASES ACTIVOS

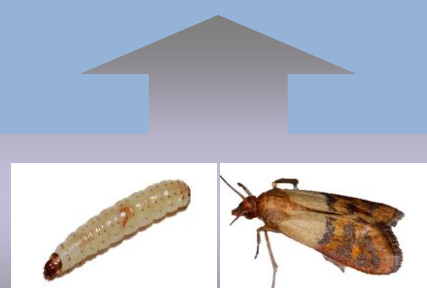
ALIMENTOS ALMACENADOS



Universidad Nacional del Sur

Departamento de Biología, Farmacia y
Bioquímica

Laboratorio de Zoología de Invertebrados II



CONTROL PLAGA: *Plodia interpunctella*

REPELENCIA

PENETRACIÓN

PROPIEDADES MECÁNICAS

ESTABILIDAD TÉRMICA Y ESTRUCTURAL



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

**“PELÍCULAS ACTIVAS DE QUITOSANO CARGADAS
CON ACEITES ESENCIALES COMO ESTRATEGIA DE
CONTROL DE LA POLILLA DE LA FRUTA SECA, *Plodia
interpunctella* (LEPIDOPTERA, PYRALIDAE)”**

Tesis de grado Licenciatura en Ciencias Biológicas

Septiembre 2022

Alumna: Romina Gómez

Director: Dr. Jorge Werdin González

Co-Directora: Dra. Luciana Castillo

En memoria de mi
mamá, Adriana
Leonor.

Agradecimientos

Quiero agradecer a la vida por darme la oportunidad de vivir una experiencia Universitaria, que me dio la posibilidad de generar nuevos conocimientos en el campo de la biología, como así también, desarrollar herramientas en lo personal.

A lo largo de esta experiencia, aprendí a valorar mis errores y entender que el tiempo es individual, que la velocidad en la que transcurran los procesos depende de la toma de decisiones constantes, dotadas de voluntad y aceptación; y que, el error es una opción que como tal, requiere de la repetición para alcanzar el éxito.

Lograr un título, en lo personal implica muchas cosas, en principio el desarraigo de mi ciudad natal y alejarme de los vínculos cercanos, pero al mismo tiempo conocer nuevas personas, establecer nuevas rutinas, y en los momentos de soledad, aliarme con la creatividad. Del mismo modo, encontrarme con situaciones que me sacaran del confort, que aunque por momentos pesara, hoy lo agradezco porque justamente de eso trata la vida, cambios constantes que nos llevan a tomar decisiones que en lo posible nos alineen con nuestro deseo.

A mi Madre, a quién le dedico mi tesis, por impulsarme a la libertad de ser. A quién me inspiró, me acompañó e hizo todo lo posible a su alcance para que pudiera estudiar y entendiera que mi objetivo como mujer, era y es; el de descubrir quién soy, siempre moviéndome en la vida por lo que ame hacer y no por lo que deba hacer. Me dejó el legado de sus palabras sabias, diciéndome que lo importante en la vida es aprender, llenarse la mochila de herramientas y compartir los conocimientos.

A mi Director Jorge, por su dedicación y pasión por la biología, por acompañarme y ayudarme con paciencia, brindándome su tiempo también en escucharme y aconsejarme. Agradecerle por generar y transmitir que trabajar en equipo es una gran familia.

A mi codirectora Luciana, por su predisposición, respondiendo a mis inquietudes con gran amabilidad, por compartirme sus conocimientos de química y por ser parte de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio, Emiliano, Natalia y Cristian por integrarme y hacer que el trabajo en equipo sea posible con respeto y compañerismo. En alusión a Emiliano, agradecerle

también, por el tiempo compartido de trabajo, por estar dispuesto a ayudarme en resolver y enseñarme cuestiones típicas de una aprendiz, siempre con buen ánimo y dedicación.

A la Universidad Nacional del Sur, por ser una institución pública que permite la formación de profesionales de excelencia académica y científica.

A mi familia, por su amor e incondicionalidad, apoyando y acompañando en cada paso aun cuando el camino se pusiera difícil.

A mis amigas por los momentos de catarsis, por las risas, por tantas etapas compartidas y por estar en mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
1.1.Problemática de los alimentos almacenados y envasados por infestación de insectos	2
1.2. <i>Plodia interpunctella</i> - Clasificación, biología y manejo	4
1.3.Envases Activos para el manejo de insectos plaga en productos alimenticios almacenados	7
1.4.Hipótesis.....	9
1.5.Objetivo General	9
1.5.1.Objetivos Específicos	10
2. MATERIALES y MÉTODOS.....	11
2.1.Materiales.....	11
2.2.Caracterización de los Aceites Esenciales.....	11
2.3.Cría de insectos.....	11
2.4.Preparación de las Películas Activas.....	12
2.5.Bioensayos.....	12
2.5.1.Ensayos de Repelencia.....	12
2.5.2.Ensayos de Penetración.....	13
2.6.Caracterización de las Películas Activas.....	14
2.6.1.Análisis estructural.....	14
2.6.2.Estabilidad térmica.....	14
2.6.3.Propiedades mecánicas.....	15
2.7.Análisis estadístico.....	15
3. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	16
3.1.Composición química de los Aceites Esenciales.....	15
3.2.Bioensayos.....	17

3.3.Caracterización de las Películas Activas.....	21
3.3.1.Análisis Estructural.....	21
3.3.2.Estabilidad térmica.....	22
3.3.3.Propiedades Mecánicas.....	24
4. CONCLUSIONES.....	27
5. BIBLIOGRAFÍA.....	28

ÍNDICE DE LÁMINA, TABLAS Y FIGURAS

Lámina 1. Características morfológicas de <i>Plodia interpunctella</i>	5
Figura 1. Estructura química del quitosano.....	8
Figura 2. Arena experimental para el bioensayo de Repelencia.....	13
Figura 3. Arena experimental para el bioensayo de penetración.....	14
Tabla 1. Composición química porcentual del AE de geranio y de menta utilizados para la obtención de las películas Qx-AE.....	16
Figura 4. índice de repelencia (IR) para las películas control y Qx-AE de geranio y de menta al 0,5 % p/p (A), 0,25% p/p (B) y 0,10 % p/p (C).....	18
Figura 5. Tasas de Penetración de larvas de <i>Plodia interpunctella</i> en películas Control y Qx-AE que contienen AE de geranio (A) y de menta (B).....	19
Figura 6. Espectros FTIR de las películas control y Qx-AE.....	22
Figura 7. Curvas termogravimétricas de las películas control y Qx-AE.....	23
Tabla 2. Propiedades mecánicas de las películas control y Qx-AE.....	26

RESUMEN

Plodia interpunctella Hübner (Lepidoptera, Pyralidae) es probablemente uno de los insectos plaga más importante que ataca a los alimentos almacenados y envasados. Sus larvas se consideran insectos perforadores de envases muy eficaces, provocando grandes pérdidas. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas tecnologías de envases de alimentos que prevengan la infestación por estos grupos de insectos es crucial. Una alternativa innovadora es la implementación de películas activas que contengan productos bioinsecticidas. En el presente trabajo se prepararon películas a base de quitosano (Qx) conteniendo aceites esenciales (AE) de geranio y de menta con diferentes concentraciones (0% (control), 0,1%, 0,25% y 0,5% p/p). Para evaluar la actividad de las películas Qx-AE frente a la infestación de larvas III de *P. interpunctella* se realizaron ensayos de repelencia y penetración. En ambos bioensayos, las películas a base de Qx conteniendo 0,5 % p/p de AE de geranio y de menta fueron las más eficaces. Estas películas demostraron tener actividad repelente (durante 72 h) y redujeron significativamente la tasa de penetración (durante 15 días) de larvas de *P. interpunctella*. Consecuentemente, se analizó la estructura, estabilidad térmica y las propiedades mecánicas de estas películas. De esta manera, se demostró que la incorporación de los aceites esenciales no modifica la estructura, la estabilidad térmica ni las propiedades mecánicas de las películas a base de Qx.

PALABRAS CLAVE

Polilla de la fruta seca, quitosano, aceite esencial de menta, aceite esencial de geranio, películas activas, bioensayos, propiedades mecánicas y estabilidad térmica.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Problemática de alimentos almacenados y envasados por infestación de insectos plaga

A lo largo de la historia, el incremento de la población mundial ha exigido un aumento concomitante en la producción agrícola para satisfacer las necesidades alimentarias. Se estima que para el año 2100 habrán 11.000 millones de habitantes. El crecimiento exponencial de la población actual implica una marcada demanda en los sistemas de producción, almacenamiento y distribución de los alimentos (FAO, 2017). Esta situación conlleva, por un lado, a la obtención de beneficios económicos para los países productores de alimentos, y por el otro, a la necesidad de establecer programas y políticas públicas tendientes a la seguridad alimentaria. Cabe mencionar que entre éstos se destacan aquellos en relación con el manejo de artrópodos plaga, dado los graves perjuicios que estos organismos generan tanto en la producción de alimentos como en la calidad nutricional de los mismos (Morrison et al., 2021).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO) estima que anualmente se pierde entre 10-30 % de la producción de alimentos en condiciones de almacenamiento debido a los insectos plaga (Savary et al., 2019; Higuera et al., 2021). A nivel global, estos alimentos pueden ser atacados por más de 600 especies de coleópteros y 70 especies de lepidópteros (Jo et al., 2015) y los daños que generan son pérdidas tanto cualitativas como cuantitativas. Además de la infestación *per se*, que deriva en el consumo parcial o total del alimento, diversos estudios demostraron que la actividad de estos insectos modifica la temperatura, humedad, características organolépticas y microflora del alimento infestado y algunos de ellos son considerados alérgenos y vectores de ciertos patógenos (Sauer et al., 1992; Athanasius et al., 2010; Rajendran, 2020). Cabe destacar que la presencia de insectos vivos, muertos o contaminantes derivados de la infestación (excrementos, exuvias y secreciones) no solo imposibilita el consumo de los alimentos, sino que también impacta negativamente sobre la imagen empresarial y conlleva a pérdidas

económicas para las industrias debido a la reposición de los alimentos y, en ciertas situaciones, a los gastos en litigios legales (Prakan et al., 2022).

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 embalajes, tales como pliegues, costuras y salidas de aire o bien por aquellos ocasionados por los insectos perforadores (Stejskal et al., 2017; Aulicky et al., 2019). Entre los insectos perforadores que se encuentran en nuestra región se pueden mencionar a las formas adultas de ciertos coleópteros como *Sitophilus oryzae* (L.), *Rhyzopertha domina* (F.) y *Lasioderma serricorne* (F.) y las larvas de algunos lepidópteros como *Plodia interpunctella* (Hübner) y *Cadra cautella* (Walker). Entre los insectos invasores más comunes se hallan *Tribolium castaneum* (Herbst) y *Oryzaephilus surinamensis* (L.).

La necesidad de reducir las infestaciones de insectos plaga en alimentos almacenados y envasados ha llevado, en muchos casos, a realizar un uso incorrecto y excesivo de productos químicos altamente tóxicos, sin complementarlos con otras herramientas de control. Esta práctica pone en riesgo la calidad del producto y la salud del consumidor y muchas veces genera rechazos por los excesos de residuos generados (Fahad et al., 2021). La implementación de estrategias de control a partir de nuevos desarrollos tecnológicos y la integración de métodos naturales inicia una era prometedora tanto para el sector científico como para el industrial, de modo de promover un creciente desarrollo económico de los países y de disminuir la hambruna global.

Atendiendo a las problemáticas planteadas, en el presente trabajo se utilizarán larvas de *P. interpunctella* como organismo modelo de insecto perforador para evaluar la bioactividad de películas a base de quitosano cargadas con aceites esenciales.

1.2. *Plodia interpunctella* - Clasificación, biología y manejo

Phylum: Arthropoda

Subphylum: Hexapoda

Clase: Insecta

Orden: Lepidoptera

Superfamilia: Pyraloidea

Familia: Pyralidae

Género: *Plodia*

Especie: *Plodia interpunctella* (Hübner).

Plodia interpunctella (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae), también conocido como polilla de la fruta seca, es un lepidóptero cosmopolita que ataca a toda clase de frutas secas, granos, harinas y productos manufacturados derivados (Jia et al., 2018). Es un insecto holometábolo y su comportamiento de ovoposición está influenciado por los olores de los alimentos, sobre los cuales la hembra deposita los huevos. Mohandass et al. (2007) y Pérez et al. (2012) informaron que la cantidad de huevos por hembra varía de 40 a 400, con un promedio de 177, siendo la alimentación, la temperatura y la humedad relativa (HR) las principales variables que modifican este parámetro (McDonough et al., 2011). El período larval, que es la fase dañina del insecto al alimentarse de los productos almacenados, dura aproximadamente la mitad del ciclo de la especie. El período pupal tiene una duración que varía entre 7 y 9 días. Finalmente, el estado adulto se extiende durante aproximadamente 10 días (Pérez et al., 2012). El ciclo de vida de *P. interpunctella*, desde la eclosión del huevo hasta la muerte del adulto, requiere de entre 25 y 60 días según las condiciones ambientales. A 25 °C y 70 % HR, el ciclo se completa en 34 días (Mohandass et al., 2007).

Lámina 1.1: Características morfológicas de *P. interpunctella*

Adultos: Miden entre 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, al igual 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 el color y tamaño de las larvas. En el primer y segundo estadio presentan la cabeza marrón clara y el cuerpo blanco, casi transparente. 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. En el cuarto estadio las larvas tienen el cuerpo amarillo claro con el primer segmento torácico oscuro y la cabeza marrón. Además, presentan setas traslúcidas en todo el cuerpo, más coloreadas en los dos últimos segmentos abdominales. El último estadio se caracteriza por su color amarillo con tonalidades rosadas en el cuerpo, la cabeza de color marrón, el primer segmento torácico más claro y en el último segmento abdominal, setas amarillentas. En este estadio las larvas alcanzan la mayor longitud de su cuerpo con un promedio de $7,63 \pm 1,01$ mm. En este periodo tejen un capullo para el posterior desarrollo de la pupa (Pérez et al., 2012).



Larva III de *P. interpunctella*

Pupas: Son de color variable dependiendo del tiempo de desarrollo; al principio, son amarillentas, después se tornan marrón claro y finalmente marrón oscuro, con una longitud aproximada de $8,71 \pm 0,56$ mm. Próximo a la eclosión del adulto, adquieren una coloración oscura (McDonough et al., 2011).

El empleo de fumigantes es una de las técnicas de control más habituales en los sistemas de almacenamiento de productos alimenticios para el manejo de *P. interpunctella* y de otros insectos plaga (Florão et al., 2004; Docampo et al., 2014; Costa-Belecheni et al., 2020). Las características fisicoquímicas de estos productos aseguran una dispersión homogénea dentro del sistema, además de presentar altos niveles de eficacia. De esta manera, el uso de la fosfina y el bromuro de metilo han sido claves para el manejo de *P. interpunctella*. Sin embargo, los efectos nocivos ambientales y sanitarios que estos productos generan, sumados a las fallas de control debido al desarrollo de resistencia (Gomes et al., 2015), han llevado a la búsqueda de nuevas alternativas de manejo. Diversas agencias internacionales han promovido la eliminación de ciertos organofosforados y carbamatos como productos de control en los sistemas de almacenamiento y están dando lugar a enfoques de manejos integrados (Badii et al., 2007; Vázquez y Pérez, 2017). Entre éstos se destaca el uso de plaguicidas derivados de las plantas (Maes et al., 2019; Isman, 2020).

El uso de plaguicidas de origen botánico no es una novedad ya que éstos se remontan a la antigua China, Egipto, Grecia y la India, hace dos milenios atrás. Incluso se reporta el inicio de su utilización en Europa y América del Norte, 150 años antes de la aparición de los plaguicidas sintéticos (Pérez López, 2012). Los insecticidas de origen vegetal se encuentran en forma de polvos, extractos o aceites esenciales (AE) (Arias et al., 2017). Los AE son el producto final del metabolismo secundario de las plantas y están formados por constituyentes químicos volátiles, así como compuestos aromáticos y alifáticos que tienen olor, sabor y actividad biológica (Ordaz et al., 2011). Los AE son una mezcla compleja de hasta 100 compuestos químicos orgánicos provenientes de la familia de los terpenos (hemiterpenos, monoterpenos y triterpenos), fenilpropanoides y lactonas, entre otros (Lammari et al., 2020; Alonso-Gato et al., 2021). Los monoterpenos suelen ser las moléculas más abundantes de los AE, destacándose los monoterpenos oxigenados (1,8-cineol, linalol, alcanfor, carvacrol), los hidrocarbonados (α -pineno, β -pineno, limoneno, p-cimeno) y ésteres monoterpénicos (acetato de linalilo) (Bhavaniramya et al., 2019; Li et al., 2019; Silva et al., 2021).

Diversas vías de acción se han propuesto para explicar el efecto insecticida de los AE. Frecuentemente actúan como neurotóxicos ya que bloquean la acción de

neurotransmisores tales como acetilcolina, L-glutamato, ácido γ -aminobutírico, dopamina, serotonina, norepinefrina y octopamina. De esta manera, alteran el metabolismo, la frecuencia cardíaca, el movimiento y comportamiento del insecto. La ausencia de algunos de los receptores mencionados en humanos y otros vertebrados define la acción selectiva de los AE, sin perturbar el comportamiento ni la salud de los mismos (Pavela y Benelli, 2016; Das et al., 2021).

Se ha reportado que los AE generan toxicidad en insectos de los órdenes lepidóptera, coleóptera, hemíptera, díptera, ortóptera, phthiraptera e isóptera (Campolo et al., 2018). Particularmente, los constituyentes de los AE al entrar en contacto, ser respirados o ingeridos por los insectos pueden provocar múltiples efectos como agentes repelentes, insecticidas por contacto y fumigante, antialimentarios, inhibidores del crecimiento y fecundidad, entre otros (Yang et al., 2017; Ghabbari et al., 2018). Además, debido a su complejidad química, los AE al ser usados como insecticidas reducen la presión de selección sobre los insectos plaga y a su vez, su rápida degradación causa menos daño, tanto en el ambiente como en la salud humana. Se ha demostrado que diversos AE, tanto libres como formando parte de nanoformulaciones, producen efectos letales y subletales en distintos insectos plaga de interés económico (*P. interpunctella*, *T. castaneum*, *R. dominica*, *L. serricorne* y *S. oryzae*) y sanitario (*Blatella germanica* y *Culex pipiens pipiens*) (Werdin González et al., 2017; Jesser et al., 2017, 2020 a,b,c; Yeguerman et al., 2020, 2022).

1.3. Envases activos para el manejo de insectos plaga en productos alimenticios almacenados

El plástico es el material más utilizado por la industria alimentaria para el desarrollo de envases debido a su bajo costo y peso, alta versatilidad y flexibilidad, transparencia, capacidad de termo y autosellado y sus óptimas propiedades mecánicas y de barrera. Sin embargo, el uso masivo y la incorrecta disposición final de los mismos han conducido a la acumulación de miles de toneladas de residuo plástico en el medio ambiente. A modo de ejemplo, se estima que a nivel mundial se producen anualmente cerca de 50 kg de residuos plásticos por habitante según la Asociación Europea de Plásticos (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, dado que los residuos plásticos provenientes de envases para alimentos generalmente están contaminados por restos de comida, el reciclaje no es una gestión práctica para estos materiales (Ncube et al., 2021). Esta situación llevó a considerar el uso de biopolímeros como una alternativa sustentable para el desarrollo de envases (Licardello, 2017). Estos materiales son polímeros de origen natural, producidos por organismos vivos y que están constituidos por moléculas en forma de cadenas de bloques químicos repetitivos y contruidos a partir de recursos renovables, no tóxicos y biodegradables (Conejo Reyes et al., 2020; Atanase, 2021; Tamang et al., 2022).

Actualmente, la producción de envases a partir de biopolímeros es baja; sin embargo, se proyecta que el mercado de estos materiales crezca significativamente en pocos años (Haloen et al., 2020). Hoy en día se cuenta con una vasta variedad de biopolímeros biodegradables que pueden ser utilizados para el desarrollo de envases tales como el quitosano, almidón, celulosa, quitina, colágeno (Udayakumar et al., 2021).

El quitosano (Qx) es un polisacárido biodegradable con actividad antioxidante y antimicrobiana, que se obtiene mayoritariamente a partir de la desacetilación de la quitina (Genskowsky et al., 2015; Siripatrawan y Vitchayakitti, 2016). Su estructura química consiste en unidades de glucosamina y N-acetilglucosamina (Wang et al., 2020), como se muestra en la Figura 1.

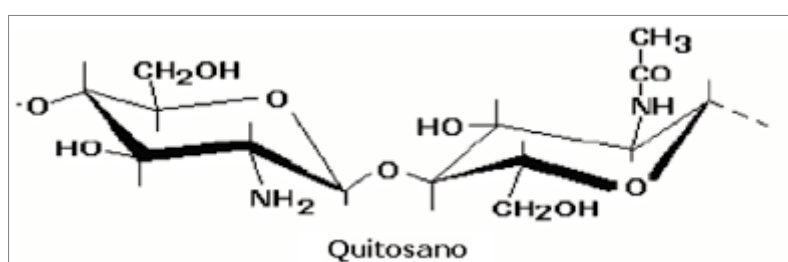


Figura 1. Estructura química del quitosano.

Este polisacárido tiene un gran potencial para el desarrollo de envases debido a su capacidad de formar películas con permeabilidad selectiva a gases (CO₂ y O₂) y buenas propiedades mecánicas. Además, el Qx presenta la capacidad de encapsular y de liberar ciertos compuestos de manera controlada (Shen y Kamdem, 2015; Valencia-Sullca et al., 2018). El uso progresivo de este polímero y las numerosas investigaciones

que se están llevando a cabo, denotan una extensa variedad de aplicaciones en las áreas de alimentos, agricultura, microbiología, ciencias médicas, farmacéutica y cosmética (Molina Zerpa et al., 2017).

En los últimos años, los avances en el campo tecnológico han llevado al desarrollo de envases activos como método novedoso para prolongar la vida útil de alimentos perecederos (Shamma et al., 2021). Los envases activos 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 (Kuai et al., 2021; Shamma et al., 2021). En este sentido, se ha demostrado que los envases activos a base de biopolímeros que contienen AE son efectivos para el control microbiano y para evitar la degradación oxidativa del alimento (Ribeiro-Santos, 2017; Requena et al., 2017; Tao et al., 2021).

Es importante destacar que el envasado es también la última defensa de los productores de alimentos contra los insectos plaga. La mayoría de los materiales de embalaje pueden ser perforados, con diferentes tiempos de penetración dependiendo de la especie de insecto y etapa de vida, del tipo de producto contenido y del material de embalaje (Liciardello, 2017). Por esta razón, el desarrollo de materiales activos con AE para envases promete solucionar los inconvenientes que provocan los insectos plaga en productos almacenados.

1.4. Hipótesis

Las películas activas de Qx cargadas con AE de geranio y de menta generan repelencia e inhiben la perforación por larvas de *P. interpunctella*.

1.5. Objetivo general

Desarrollar y caracterizar películas a base de Qx cargadas con AEs y evaluar la bioactividad de las mismas sobre larvas del tercer estadio de *P. interpunctella*.

1.5.1. Objetivos específicos

- Desarrollar películas activas a base de Qx cargadas con AE de geranio y de menta.
- Analizar la estructura y las propiedades mecánicas de las películas activas.
- Estudiar el efecto de las películas activas sobre el comportamiento de larvas del tercer estadio de *P. interpunctella*.
- Evaluar la capacidad de las películas activas para prevenir la infestación por parte de larvas del tercer estadio de *P. interpunctella*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

Para las películas se empleó Qx de peso molecular medio con un grado de desacetilación del 75-85 % y Tween 80 como agente emulsificante (Sigma-Aldrich, Alemania). El AE de geranio, *Geranium maculatum* L. (Geraniales, Geraniaceae) y de menta, *Mentha piperita* L. (Lamiales, Lamiaceae) se obtuvieron de Swiss-Just (fabricado bajo la supervisión y control de Ulrich Justrich AG, Walzenhausen, Suiza). El ácido acético glacial se adquirió a través de Merck (Alemania). Como plastificante se utilizó glicerol (Anedra, Argentina).

2.2. Caracterización de Aceites Esenciales

La composición química de los AEs se determinó mediante cromatografía gaseosa asociada a espectrometría de masas (CG-EM) con un cromatógrafo Hewlett-Packard 6890 conectado a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5972A equipado con una columna capilar (HP-5, 25 m x 0,25 mm, 0,25 μ m de espesor de película). El gas portador fue helio con un flujo de 1 mL/min. La temperatura del horno se mantuvo a 50 °C durante 2 min, se calentó a 5 °C/min hasta 200 °C y luego se mantuvo a esta temperatura durante 15 min. Los espectros de masas se registraron a 70 eV. El rango de masa fue de m/z 35 – 350 uma y la temperatura del bloque de inyección fue de 280 °C. Los compuestos se identificaron comparando sus índices de retención (índices de Kovats) con los de compuestos conocidos y también comparando sus espectros de masas con los almacenados en las bases de datos de MS (NBS75K.L MS DATA). Los porcentajes relativos de cada uno de los compuestos se obtuvieron directamente a partir de la relación de las áreas de los picos de CG.

2.3. Cría de Insectos

Se seleccionaron larvas del tercer estadio de colonias de *P. interpunctella* mantenidas a 27 ± 1 °C, 45-50 % HR, fotoperíodo 16:8h L:O y alimentadas con una mezcla de harina de maíz, harina de trigo, leche en polvo, miel y glicerina de grado analítico (2:1:1:1:1 p/p). Las larvas del tercer estadio se identificaron por el tamaño de la cabeza.

2.4. Preparación de las Películas Activas

El Qx (1% p/p) se disolvió en una solución acuosa de ácido acético glacial (1 % p/p, 100 mL) a 25°C. Después de agitar durante 12 h, la dispersión se filtró para eliminar cualquier partícula insoluble. Bajo agitación magnética, se adicionaron glicerol (0,3 % p/p) y Tween 80 (0,1 % p/p). Luego se agregó AE de geranio o de menta a la dispersión en diferentes concentraciones (0% (control), 0,1%, 0,25% y 0,5% p/p). Las mezclas de Qx-AE se emulsionaron a temperatura ambiente (25°C) utilizando un ultra-homogeneizador de rotor-estator (Scilogex D-500 Homogenizer) durante 10 min a 15000 rpm. Posteriormente, las mezclas de Qx-AE (32 mL) se vertieron sobre una placa de vidrio enmarcada con un molde de metal (169 cm²). Las muestras se colocaron en una cámara de vacío durante 24 h para eliminar las burbujas de aire. A continuación, las películas se secaron a 25 °C, 60 % HR durante 48 h.

2.5. Bioensayos

Con el fin de seleccionar las películas con actividad repelente e inhibidora de la penetración de *P. interpunctella* más efectivas, se realizaron dos bioensayos diferentes con larvas del tercer estadio.

2.5.1. Ensayos de Repelencia

El bioensayo se realizó siguiendo el método utilizado por Jo et al. (2019) con modificaciones. Se utilizó un cilindro de vidrio (longitud: 20 cm y diámetro: 2 cm) como arena experimental. El tubo se dividió en tres zonas (A, B, C) para medir la actividad repelente de las películas Qx-AE. La zona A contenía la película de prueba (Qx+AE de geranio o menta con concentraciones de 0,1%, 0,25 % y 0,5% p/p) + 2 g de alimento attractante (galletas). La zona C contenía la película control y la misma cantidad de alimento attractante. Se colocaron diez larvas de *P. interpunctella* en la zona media del cilindro (zona B) (Figura 2). Para cada película y concentración, cada experimento se repitió seis veces. Todas las arenas experimentales se mantuvieron a 27 ± 1 °C, 50% HR y fotoperíodo 16:8 h L:O. Durante 72 h se contó el número de larvas en la zona A y C. Se calculó un índice de repelencia (IR) de la siguiente manera:

$$\text{Índice de repelencia (IR)} = (C-A)/(C+A)$$

Donde C es el número de insectos en la zona C (película control) y A es el número de insectos en la zona A (películas Qx-AE). Las películas se consideraron repelentes cuando el valor de IR fue superior a 0,1 o atrayentes cuando el valor fue inferior a -0,1. Valores de IR entre -0,1 y 0,1 indican que las películas no afectan el comportamiento de los insectos.

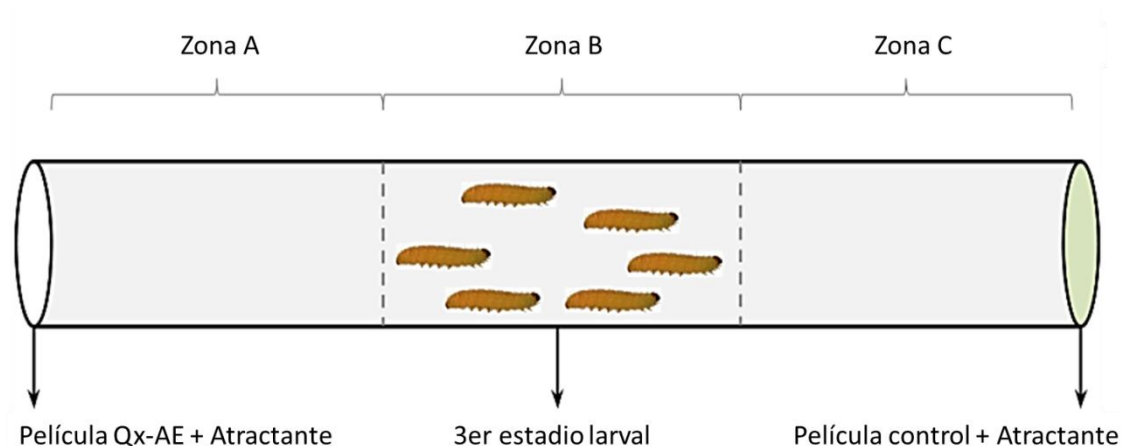


Figura 2. Arena experimental para el bioensayo de repelencia.

2.5.2. Ensayos de Penetración

La capacidad de perforación y penetración de las larvas de *P. interpunctella* a través de películas Qx-AE se evaluó mediante un ensayo de penetración. Para la elaboración de la arena experimental se utilizaron dos cajas de plástico (12,5 cm x 8,4 cm) con 12 pocillos (diámetro: 2,5 cm y profundidad: 2 cm). En una de las cajas, se agregó 1 g de galletas como alimento atrayente en cada pocillo. En la otra caja, se colocó una larva del tercer estadio en cada pocillo. Entre ambas cajas se colocaron las películas de prueba (Qx +AE de geranio y menta con concentraciones de 0,1 %, 0,25 % y 0,5 % p/p) o control. Todas las piezas se fijaron mediante abrazaderas de aluminio con tornillos de bloqueo (Figura 3). Para cada película y concentración los experimentos se repitieron cuatro veces. Las arenas experimentales se mantuvieron a 27 ± 1 °C, 50 % HR y 16:8 h L:O de fotoperíodo.

El número de larvas que penetraron cada película se registró diariamente durante 15 días. Se calculó una tasa de penetración como:

Tasa de penetración (%)= (Número de larvas que penetraron las películas)/(Número inicial de larvas) X 100

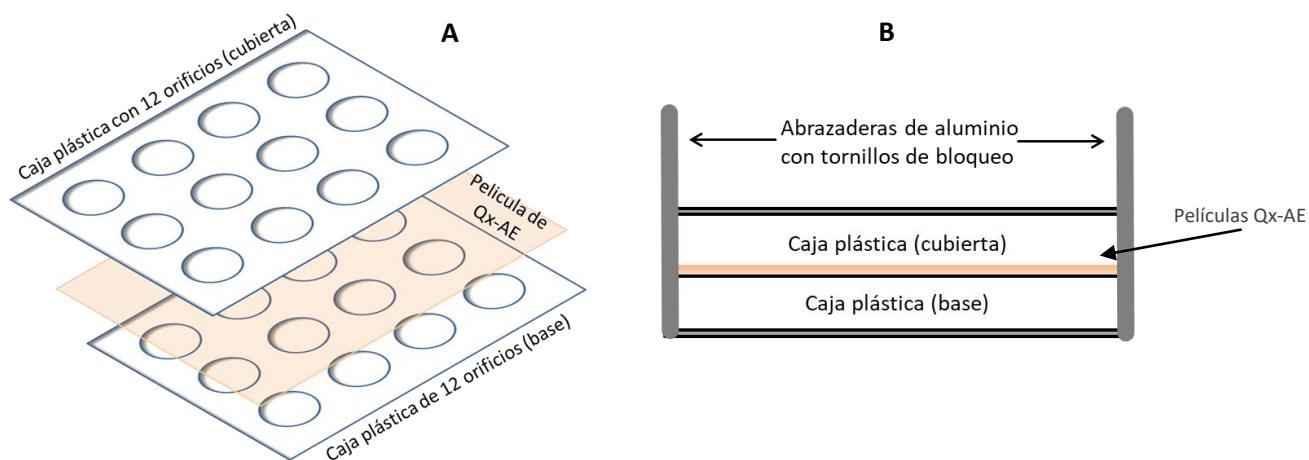


Figura 3. Arena experimental para el bioensayo de penetración.

A. Vista superior de la arena de penetración, incluidas cajas de plástico con 12 orificios y películas Qx-AE.
B. Vista frontal de la arena de penetración, incluidas cajas de plástico, películas y abrazaderas de aluminio con tornillos de bloqueo.

2.6. Caracterización de las Películas Activas

Sobre la base de los resultados de los bioensayos, se seleccionaron las películas más eficientes para ser caracterizadas. Estas se acondicionaron previamente durante 48 h a 23 ± 2 °C y 50 ± 5 % HR utilizando una solución de glicerol (Anedra, Argentina).

2.6.1. Análisis 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 las muestras de película control y Qx-AE en modo de transmisión a partir de 100 barridos con una resolución de 4 cm^{-1} en el rango de $4000\text{--}400 \text{ cm}^{-1}$ bajo atmósfera de nitrógeno.

2.6.2. Estabilidad térmica

La estabilidad térmica de las películas control y Qx-AE se determinó utilizando una balanza termogravimétrica (TA Instruments, Discovery Series, EE. UU.). Las muestras se calentaron desde 30 °C hasta 600 °C a 10 °C/min en atmósfera de nitrógeno.

2.6.3. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de las películas control y Qx-AE 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 ($0-25 \pm 0,01$ mm, Venier, China). Para cada película, se determinó el espesor medio considerando los valores de tres réplicas. Las propiedades mecánicas determinadas fueron el módulo de Young, la resistencia a la tracción y el alargamiento 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 el alargamiento 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. Análisis estadístico

Los valores medios de los parámetros obtenidos a partir de los bioensayos, de los espesores y de las propiedades de las películas se sometieron a un análisis estadístico de datos ANOVA. La comparación de los valores medios se realizó mediante la diferencia mínima significativa (DMS) a un nivel de significación $p=0,05$. Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS 25.0.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Composición Química de los Aceites Esenciales

La composición química de cada AE se determinó mediante CG-EM y se presenta en la Tabla 1. Los compuestos principales detectados en el AE de geranio fueron el β -citronelol y geraniol, seguidos por linalool, mentona y formiato de citronelilo (> 10 %). En el caso del AE de menta, el compuesto principal fue mentol (> 50 %), seguido de isomentona y p-menten-3-ona (> 10 %).

Tabla 1. Composición química porcentual del AE de geranio y de menta utilizados en las películas Qx-AE.

Tiempo de Retención (min)	Componentes	Composición (%)	
		AE de geranio	AE de menta
9,93	1,8- cineol	-	5,88
13,06	Linalool	12,67	-
13,55	Isometona	-	16,90
13,85	Mentona	11,14	-
14,10	Mentol	-	52,51
14,35	p-menten-3-ona	-	10,43
16,14	β -citronelol	26,16	-
16,48	Geraniol	23,19	-
17,70	Formiato de citronelilo	10,37	-
18,04	Formiato de geranilo	7,94	-
-	Otros	8,55	14,28

Las propiedades aromáticas de los AEs son clave para el desarrollo de nuevos insecticidas ecológicos y seguros (Marsin et al., 2020). Trabajos previos informaron sobre las propiedades letales y subletales de los AE de geranio y de menta sobre *P. interpunctella*. De esta manera, se comprobó que estos aceites generan toxicidad por contacto y fumigante, producen repelencia y afectan la fertilidad de adultos de este lepidóptero (Jesser et al., 2017). Además, se probó que las nanopartículas poliméricas de PEG 6000 cargadas con los AE antes mencionados, potencian su actividad insecticida sobre adultos de *P. interpunctella* (Jesser et al., 2020 a). Por otra parte, se demostró que las nanoemulsiones de AE de geranio y de menta estabilizadas por ultrasonido potencian la actividad insecticida de los piretroides en larvas de *P. interpunctella*, con bajo impacto en organismos modelo no blancos de ambientes acuáticos y terrestres (Jesser et al., 2020 b, c).

Es importante aclarar que no sólo los compuestos mayoritarios de los AE son los responsables de la actividad insecticida, sino que los componentes minoritarios pueden contribuir a la actividad biológica por vía aditiva o efecto sinérgico (Cava-Roda, 2021).

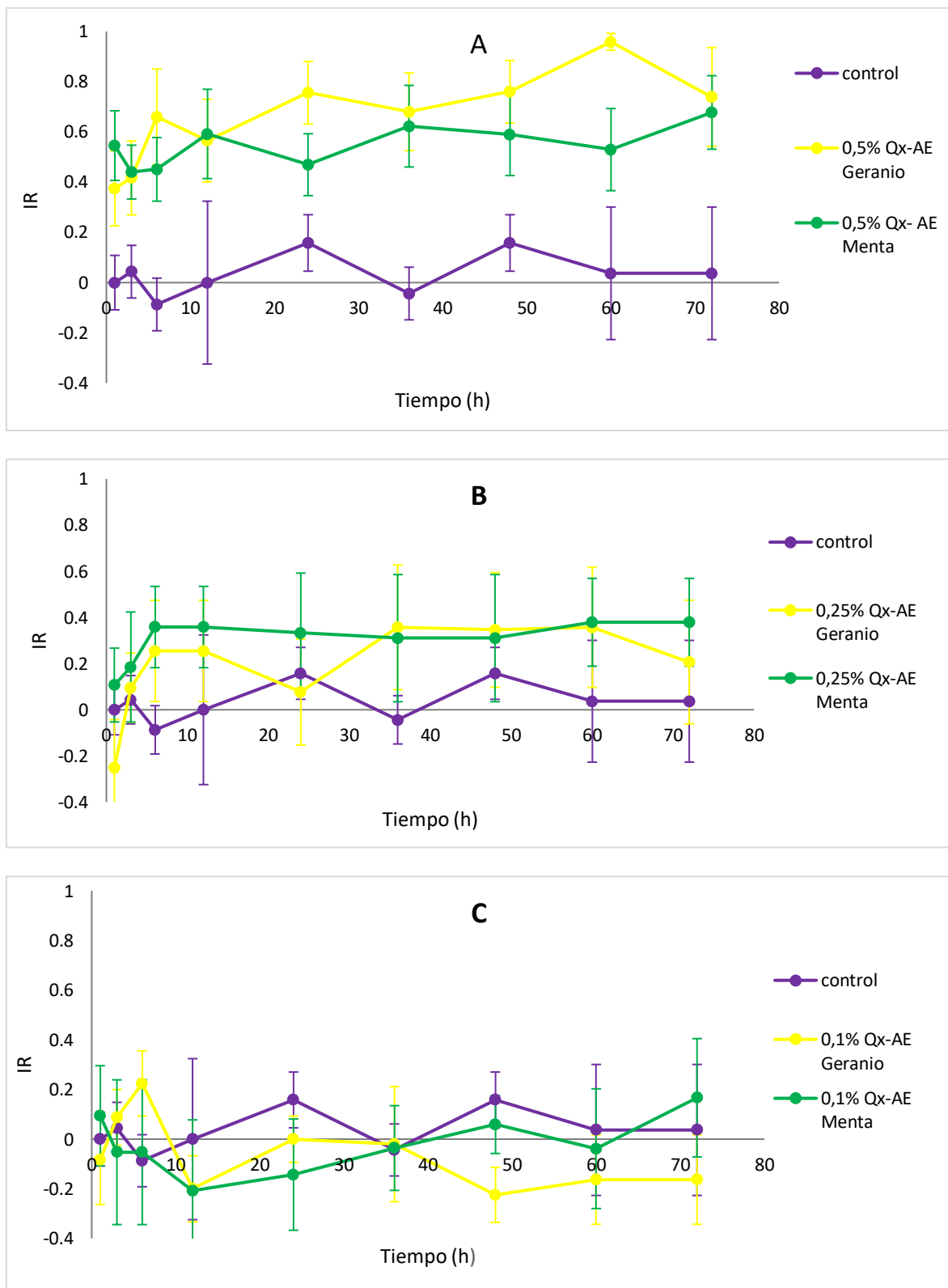
3.2. Bioensayos

Los resultados de la prueba de repelencia de las películas Qx-AE en función del tiempo, se muestran en la Figura 4.A. Se puede observar que las películas Qx-AE cargadas al 0,5 % p/p mostraron actividad repelente durante 72 h. Además, se evidenciaron diferencias significativas a las 24 y 60 h ($p < 0,05$) ya que las películas conteniendo AE de geranio generaron mayor bioactividad que las preparadas con el AE de menta.

Por otra parte, no se detectaron diferencias significativas entre las películas Qx-AE con una concentración de 0,25 % p/p y el control ($p > 0,05$), salvo a las 6 h. En este tiempo, solo la película cargada con AE de geranio mostró actividad repelente ($p < 0,05$) (Fig. 4.B).

En general, las películas Qx-AE cargadas al 0,1 % p/p no produjeron bioactividad en comparación al control. La película Qx-AE de geranio fue repelente a las 6 h ($p < 0,05$); sin embargo, a las 48 h mostró efectos atrayentes ($p < 0,05$) (Fig. 4.C).

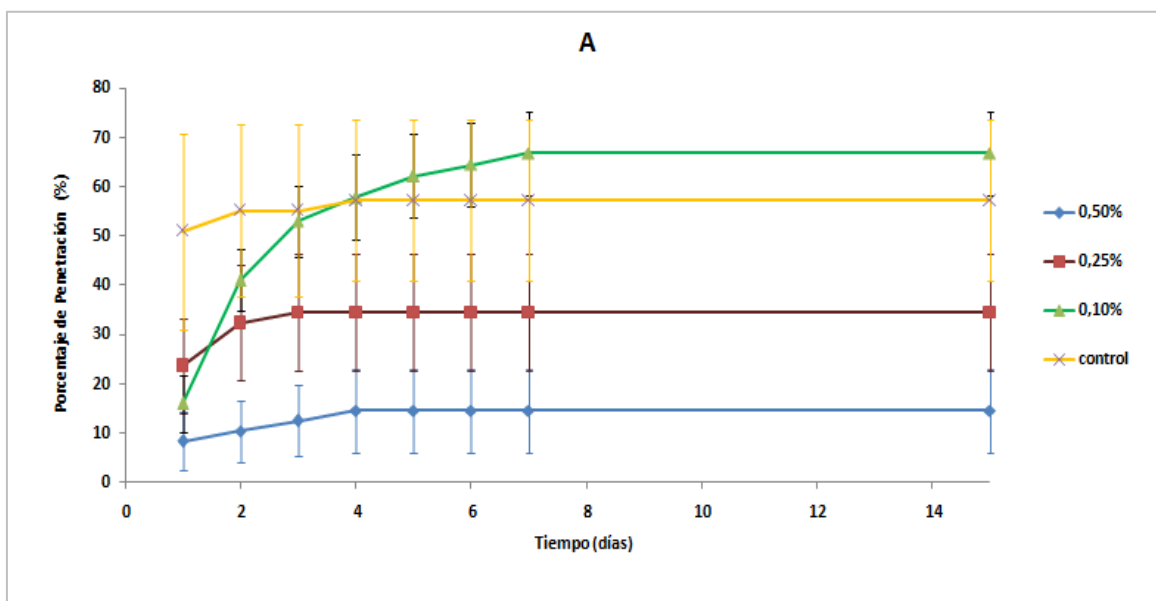
Figura 4. Efecto repelente (IR= Índice de repelencia) en larvas III de *P. interpunctella* de las películas control y Qx-AE cargadas con AE de geranio y de menta al 0,5% (A), 0,25% (B) y 0,10% p/p (C).

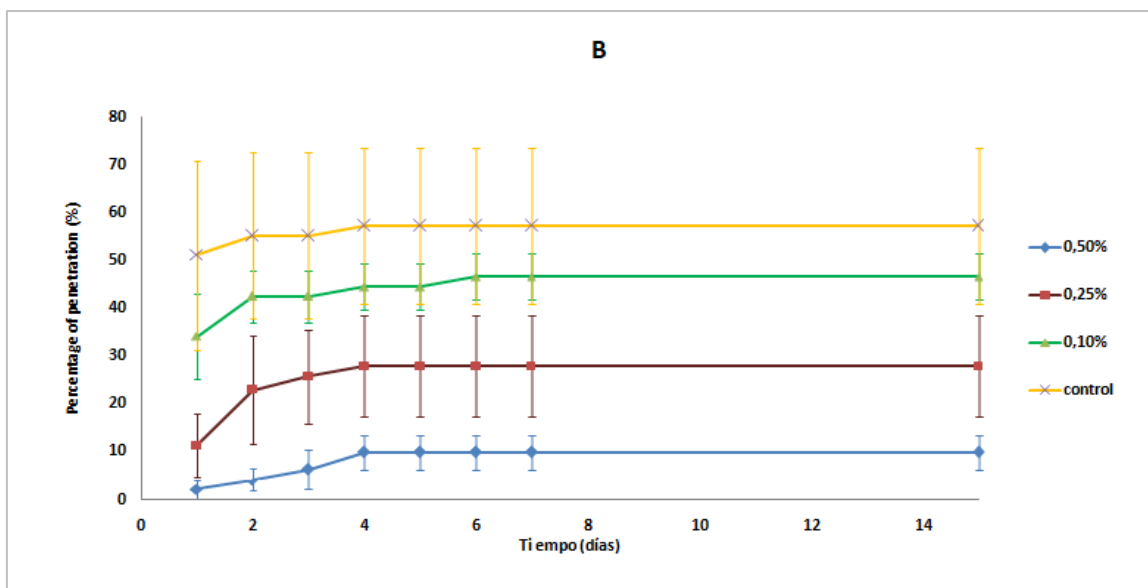


La Figura 5.A. muestra el porcentaje de penetrabilidad de las larvas de *P. interpunctella* a través de las películas control y de Qx-AE de geranio. Después de 1 día de exposición, las películas cargadas al 0,5 % y 0,1 % p/p redujeron significativamente la penetración en comparación con la película control ($p<0,05$). Después de 2 días de exposición, la tasa de penetración fue dependiente de la concentración del aceite, es decir, el porcentaje de penetración disminuyó al aumentar la concentración del AE. Se observaron los mismos resultados después de 1 y 2 semanas. Al final del bioensayo, las películas Qx-AE de geranio cargadas al 0,5 % p/p fueron las más efectivas para evitar la penetración de larvas de *P. interpunctella*, con un porcentaje medio de penetración de ≈ 10 %. Este valor fue significativamente menor que para la película control (≈ 50 %) ($p<0,05$).

La Figura 5.B. muestra las tasas de penetración de las larvas de *P. interpunctella* a través de las películas control y de Qx-AE menta. Durante toda la exposición, la película de Qx-AE de menta con una concentración de 0,5 % p/p redujo significativamente la penetración en comparación con las películas control y aquellas cargadas al 0,25 % y 0,1 % p/p ($p<0,05$). Al final del bioensayo, el porcentaje medio de penetración de Qx-AE menta cargada al 0,5 % p/p fue ≈ 10 %.

Figura 5. Tasas de Penetración de larvas de *Plodia interpunctella* en películas Control y Qx-AE que contienen AE de geranio (A) y de menta (B).





En el presente estudio se comprobó que las películas Qx conteniendo AE de geranio y de menta al 0,5 % p/p tuvieron actividad repelente (durante 72 h) y redujeron significativamente la tasa de penetración (durante 15 días) de larvas III de *P. interpunctella*. Trabajos previos evaluaron la actividad biológica de diferentes películas de polímeros sintéticos o de biopolímeros cargadas con AE frente a este insecto plaga. Lee et al. (2017) reportaron el uso de AE de ajo, jengibre, pimienta negra y cebolla para el desarrollo de películas multicapa activas. Estas películas cargadas con 5% p/p de estos aceites generaron efecto repelente durante 72 h en larvas de *P. interpunctella*. Además, estos autores también evaluaron la eficacia de estas películas para prevenir la infestación por parte de este insecto. De esta manera, determinaron que la tasa de penetración se reducía al aumentar la concentración de los AE. Resultados similares se reportaron al utilizar películas de polietileno de baja densidad cargadas al 2% p/p con AE de canela (Kim et al., 2013). Usando el mismo AE, Jo et al. (2015) desarrollaron películas multicapa a base de emulsiones de alcohol polivinílico como matriz polimérica y polipropileno con mezcla de tinta blanca. Estas formulaciones mostraron una excelente efectividad en la prueba de penetración con *P. interpunctella*. Además, estas películas multicapa cargadas a la máxima concentración de AE de canela (1,7 % p/p) fueron las más efectivas para repeler a las larvas de *P. interpunctella* (Song et al., 2018). Por otra parte, se desarrollaron nanotubos de halloisita cargados con AE de clavo de olor que fueron incorporados en la superficie a una película de polietileno de

baja densidad. Estas películas mostraron un efecto repelente durante 46 días frente a *P. interpunctella* (Kim et al., 2019). Estos trabajos están en concordancia con los resultados obtenidos en el presente estudio, ya que se observó un aumento en el efecto repelente y una disminución en la tasa de penetración de las larvas de *P. interpunctella* al aumentar la concentración de los AEs desde 0,10 % a 0,5% p/p. Es importante resaltar que en el presente trabajo las concentraciones de AE utilizadas para desarrollar las películas activas fueron notablemente más bajas que las reportadas en los trabajos antes citados para este lepidóptero plaga.

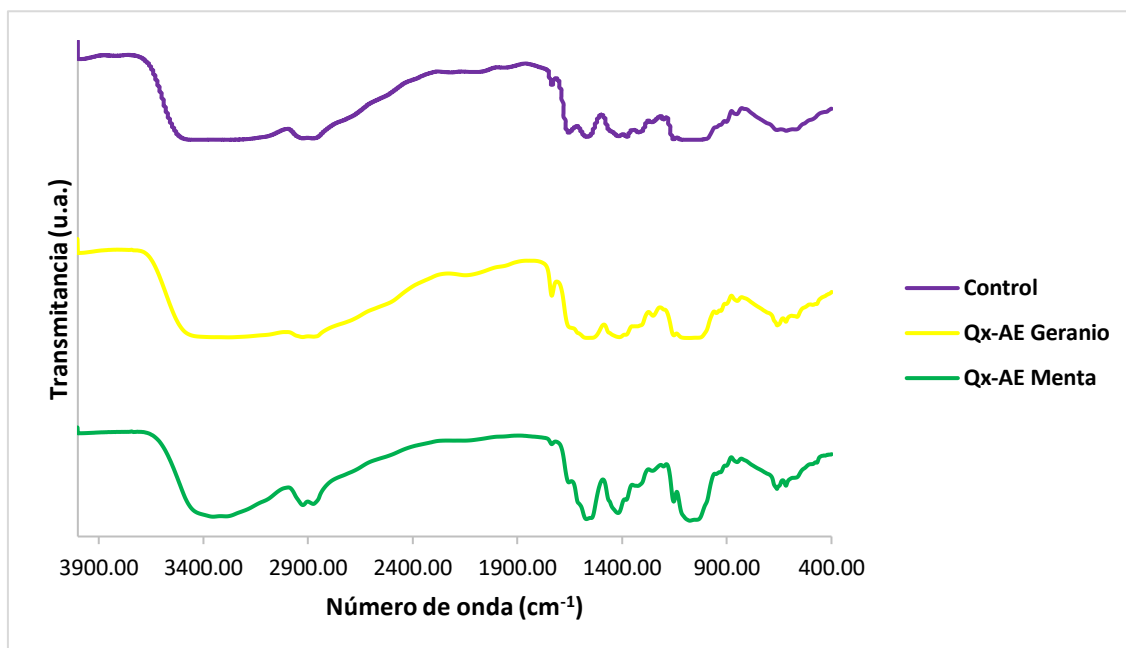
3.3. Caracterización de las películas activas

De acuerdo a los resultados de los ensayos de repelencia y penetración, se seleccionaron las películas de Qx-AE al 0,5% p/p para analizar sus propiedades fisicoquímicas y mecánicas.

3.3.1. Análisis estructural

Los posibles cambios estructurales debido a la incorporación de los AEs en las películas a base de Qx se analizaron mediante espectroscopía FTIR. En la Figura 6 se presentan los espectros de las películas control y Qx-AE. El espectro de la película de Qx muestra las bandas características de este polisacárido, tal como fue reportado por otros autores (Feng et al., 2012; Ospina et al., 2018; Tan et al., 2019). Las bandas principales se detectan en $3500-3200\text{ cm}^{-1}$ (vibraciones de estiramiento de N-H y O-H), 2927 y 2875 cm^{-1} (vibraciones de estiramiento de C-H), 1650 cm^{-1} (vibración de estiramiento de CO del enlace amida debido a una desacetilación parcial, 1570 cm^{-1}), (vibración de flexión N-H), 1380 cm^{-1} (vibración de flexión C-H), 1150 cm^{-1} (estiramiento antisimétrico COC) y $1120-1000\text{ cm}^{-1}$ (vibración de estiramiento C-O). La banda de 1740 cm^{-1} podría estar relacionada con el Tween 80 (Fu et al., 2015), que se utiliza como tensioactivo hidrofílico en todas las películas.

Figura 6. Espectros FTIR de las películas control y Qx-AE.



En general, no se observaron diferencias significativas entre las películas control y Qx-AE. Luego de la incorporación de los AE al Qx no se observaron nuevas bandas ni corrimientos significativos respecto de aquellas correspondientes a la película control. La presencia de AE se manifiesta a través del incremento de la intensidad de algunos picos como el que se encuentra en 1560 cm⁻¹, correspondiente a los componentes aromáticos de los AE.

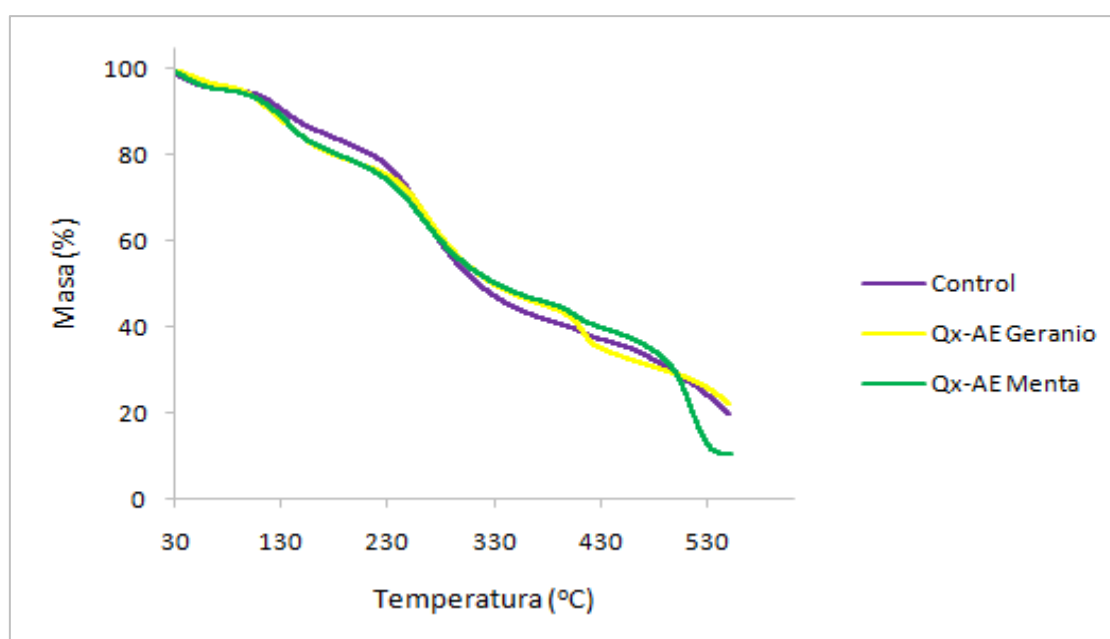
3.3.2. Estabilidad térmica

Con el fin de analizar la influencia de los AE en la estabilidad térmica de las películas Qx-AE, se realizó un análisis termogravimétrico. La Figura 7 muestra las curvas de pérdida de masa en función de la temperatura para las películas control y Qx-AE. La película control presenta varias pérdidas de masa donde la primera de ellas (de 30 °C a 69 °C) está relacionada con el agua adsorbida y el ácido acético residual (González et al., 2000; Yeh et al., 2006). La segunda etapa de descomposición (de 87 °C a 185 °C) podría atribuirse al glicerol (Kaya et al., 2018). Otros autores también la atribuyen a la pérdida de agua unida estructuralmente o a la degradación de fracciones de quitosano con menor peso molecular (Shen y Kamdem, 2015). El siguiente evento ocurre

alrededor de los 260 °C y puede asignarse a la descomposición del quitosano (Lin y Pascall, 2014). La pérdida de masa posterior posiblemente esté asociada a la descomposición del Tween 80 (Sánchez-González et al., 2010). Finalmente, en la última pérdida de masa el quitosano continúa degradándose (Damasceno et al., 2020). Es importante mencionar que varios factores intrínsecos como el peso molecular, el grado de desacetilación, la pureza y el nivel de humedad afectan la estabilidad térmica del Qx. Además, se deben tener en cuenta los factores extrínsecos como el procesamiento térmico y las condiciones ambientales de almacenamiento (Szymańska y Winnicka, 2015).

En cuanto a las películas de Qx-AE, también se observaron diferentes pérdidas de masa. En general, la incorporación de AE no modificó significativamente la estabilidad térmica de la película de Qx. Luego de la segunda pérdida de masa, se observa una pequeña diferencia entre las películas control y Qx-AE que podría estar asociada a la presencia de AE (Noshirvani et al., 2017). Para las películas Qx-AE se observa una pérdida de masa entre 400 °C - 450 °C que puede relacionarse con la degradación de componentes térmicamente estables del AE presente en la película (Alizadeh et al., 2018).

Figura 7. Curvas termogravimétricas de las películas control y Qx-AE.



3.3.3. Propiedades Mecánicas

Los efectos de la incorporación de los AE en las propiedades mecánicas de las películas a base de Qx se analizaron teniendo en cuenta el módulo de Young, la resistencia máxima a la tracción y la elongación a la rotura. Los valores de estas propiedades junto a los de los espesores se muestran en la Tabla 2. Las películas que contienen AE de menta tienen un espesor medio de 19,50 μm , no encontrándose diferencias significativas con la película control ($p>0,05$). Sin embargo, las películas de geranio tuvieron un espesor significativamente mayor ($p<0,05$), con un valor medio de 28,66 μm . En trabajos previos se reportaron espesores en un rango de 10 a 30 μm para películas Qx-AE conteniendo AE de hierba de limón (Vásquez-Briones y Guerrero-Beltrán, 2017) y de 30 a 42 μm , para películas elaboradas con mezcla de alcohol polivinílico y quitosano (Llanquile Alarcón, 2018). Fernández-Hernández et al. (2020) obtuvieron películas de quitosano y de mezclas de quitosano con almidón de maíz y miel, observando un rango de espesor entre 10 μm (Qx solo) y 22 μm (Qx + almidón de maíz + miel).

Con respecto a las propiedades mecánicas, el módulo de Young es una medida de la rigidez o la resistencia a la deformación elástica de un material cuando se le aplica una carga. A partir de la Tabla 2, se observa que no existen diferencias significativas entre los valores correspondientes para el control y la película Qx-AE menta ($p>0,05$). Sin embargo, la película que contiene AE de geranio tiene un módulo de Young menor que el control ($p<0,05$). Este resultado podría indicar que la adición de este AE promueve un mayor efecto plastificante en el material, lo que generaría una disminución del módulo de Young (Jo et al., 2015).

La resistencia a la tracción se define como la tensión máxima soportada por un material cuando es sometido a estiramiento (Rojas-Graü et al., 2007). La incorporación del AE de menta no tiene un efecto significativo sobre la resistencia a la tracción de la película control ($p<0,05$). A pesar de que la película cargada con AE de geranio presenta un valor menor de esta propiedad mecánica respecto al control, puede considerarse que la misma posee una buena resistencia a la tracción (Ospina et al., 2018). Cabe mencionar que, para esta última película, se hallaron diferencias significativas respecto al control ($p>0,05$).

La elongación a la rotura es una medida de la capacidad de estiramiento del material antes de la rotura cuando es ensayado a tracción. Los valores medidos de esta propiedad mecánica para las películas a base de Qx son similares a los informados por Altiok et al. (2010) para películas de Qx cargadas con AE de tomillo. Pese a que no se hallaron diferencias significativas con el control ($p>0,05$), la incorporación de los AEs, en particular el de geranio, incrementó el valor medio de esta propiedad. Este comportamiento podría explicarse debido a la formación de microemulsiones. Varios trabajos confirman que las gotas de AE encapsulado permiten aumentar la elongación a la rotura (Bonilla et al., 2012; Ma et al., 2016; Ismail et al., 2021).

Tabla 2. Propiedades mecánicas (media $\pm$ Desviación Estándar) de las películas control y Qx-AE.

Películas	Espesor (μm)		Módulo de Young (MPa)		Resistencia a la Tracción (Mpa)		Elongación de Rotura (%)	
Control	21,50 $\pm$ 3,06	a	1506, 11 $\pm$ 174,76	a	24,77 $\pm$ 6,15	a	2,28 $\pm$ 0,82	a
Qx- AE geranio (0,5 % p/p)	28,66 $\pm$ 1,15	b	877,93 $\pm$ 66,05	b	15,93 $\pm$ 9,21	b	3,67 $\pm$ 0,90	a
Qx-AE menta (0,5 % p/p)	19,50 $\pm$ 0,58	a	1665,19 $\pm$ 216, 24	a	24,77 $\pm$ 9,21	a	2,41 $\pm$ 0,83	a

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

4. CONCLUSIONES

Este estudio describe el desarrollo de películas de quitosano formuladas con AE de geranio y de menta y su efecto repelente en insectos. Las películas elaboradas con ambos AEs al 0,5% p/p reducen la tasa de penetración de las larvas de *P. interpunctella*, siendo el porcentaje medio de penetración $\approx 10\%$. Además, estas películas mostraron actividad repelente durante 72 h. Se demostró que, en general, la incorporación de los AEs no afecta las propiedades mecánicas de las películas de Qx. Sumado a ello, estas películas son químicamente estables, no tóxicas y biodegradables, teniendo en cuenta las características de los componentes utilizados para su preparación. Es importante resaltar que este estudio aporta nueva información sobre la potencialidad de las películas conteniendo AEs como repelentes. Este trabajo sienta las bases para la implementación de nuevos estudios tendientes al desarrollo de envases a partir de estas películas a escala comercial.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Alizadeh V., Barzegar H., Nasehi B., Samavati V. 2018. Development of a chitosan-montmorillonite nanocomposite film containing *Satureja hortensis* essential oil. Iranian Food Science & Technology Research Journal. 13, 131–143.
- Altioğ D., Altioğ E., Tihminlioglu F. 2010. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 21, 2227-2236.
- Alonso-Gato M., Astray G., Mejuto J.C., Simal-Gandara J. 2021. Essential Oils as Antimicrobials in Crop Protection. Antibiotics. 10,1-12.
- Arias J., Silva G., Figueroa I., Fischer S., Robles-Bermúdez A., Rodríguez-Maciel J.C., Lagunes-Tejeda A. 2017. Actividad insecticida, repelente y antialimentaria del polvo y aceite esencial de frutos de *Schinus molle* L. para el control de *Sitophilus zeamais* (Motschulsky). Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences (ex Agro-Ciencia). 33, 93-104.
- Atanase L.I. 2021. Micellar Drug Delivery Systems Based on Natural Biopolymers. Polymers. 13, 1- 33.
- Athanassiou C.G., Kavallieratos N.C., Menti H., Karanastasi E. 2010. Mortality of four stored product pests in stored wheat when exposed to doses of three entomopathogenic nematodes. Journal of Economic Entomology. 103, 977-984.
- 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.
- Badii M., Landeros J., Cerna E. 2007. Manejo Sustentable de Plagas o Manejo Integral de Plagas, Un apoyo al Desarrollo Sustentable. Cultura Científica y Tecnológica. 4, 13-30.
- Bhavaniramy S., Vishnupriya S., Al-Aboody M. S., Vijayakumar R., Baskaran D. 2019. Role of essential oils in food safety: Antimicrobial and antioxidant applications. Grain & Oil Science and Technology. 2, 49- 55.
- 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. <https://www.no-burn.org/wp-content/uploads/2022/03/Plasticos-en-America-Latina-2022.pdf>
- Bonilla J., Atarés L., Vargas M., Chiralt A. 2012. Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. Food hydrocolloids. 26, 9-16.
- Cava-Roda R., Taboada-Rodríguez A., López-Gómez A., Martínez-Hernández G. B., Marín-Iniesta F. 2021. Synergistic Antimicrobial Activities of Combinations of Vanillin and Essential Oils of Cinnamon Bark, Cinnamon Leaves, and Cloves. Foods. 10, 1406.

Campolo O., Giunt, G., Russo A. 2018. Essential Oils in Stored Products Insect Pest Control. Hindawi. Journal of Food Quality. 2018, 1-18.

Cornejo Reyes G.V., Marinero Orantes E.A., Funes Guadrón C.R., Toruño P.J. 2020. Biopolímeros para uso Agroindustrial: Alternativa Sostenible para la Elaboración de películas de Almidón Termoplástico Biodegradable. Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático. 6, 1359- 1387.

Costa Becheleni F.R., Del Toro Sánchez C.L., Wong-Corral F.J., Robles Burgueño M.R., Cárdenas López J.L., Borboa-Flores J. 2020. Aceites esenciales para el control de *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae) y efecto sobre la calidad del grano de maíz *Zea mays* (Poales: Poaceae). Revista Chilena de Entomología. 46, 639-652.

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, 16-2.

Das S., Singh V.K., Dwivedy A.K., Chaudhari A.K., Dubey N.K. 2021. Insecticidal and fungicidal efficacy of essential oils and nanoencapsulation approaches for the development of next generation ecofriendly green preservatives for management of stored food commodities: an overview. International Journal of Pest Management. Review. 1- 32.

Docampo P.C., Spera M. y Voitzuk A.P. 2014. Serie de casos de intoxicación fatal por ingesta intencional de fosforo de aluminio. estrategias de prevención secundaria. Acta Toxicológica Argentina. 22, 23-26.

Fahad S., Saud S., Akhter A., Bajwa A.A., Hassan S., Battaglia M., Adnan M., Wahid F., Datta R., Babur E., Danish S., Zarei T., Irshad I. 2021. Bio -based integrated pest management in rice: An agro- ecosystems friendly approach for Agricultural sustainability. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences. 20, 94-102.

FAO(Food and Agriculture Organization). 2017. El Futuro de la Alimentación y la Agricultura. Tendencias y Desafíos. Tendencia 2: Crecimiento económico Mundial, Inversiones, Comercio y Precio de los Alimentos. Página consultada junio 2022. <https://www.fao.org/3/i6881s/i6881s.pdf>

Feng F., Liu Y., Zhao B., Hu K. 2012. Characterization of half N-acetylated chitosan powders and films. Procedia Engineering. 27, 718-732.

Fernández-Hernández E., Sandoval Castilla O., Cuevas Bernardino J.C., Pacheco López N.A. 2020. Cap.1: Caracterización de películas bioactivas elaboradas a partir de Miel y Quitosano. Pérez Soto F., Figueroa Hernández E., Escamilla García P.E., García Núñez R.M., Godíñez Montoya L. Factores de la Producción Agrícola. 9-21.

Florão A., Fonseca R., López M., Gabriel M. 2004. FOSFINA: RISCOS. Visão Acadêmica. 5, 101-118.

- 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.
- Ghabbari M., Guarino S., Caleca V., Saiano F., Sinacori M., Baser N., Lo Verde G. 2018. Behavior-modifying and insecticidal effects of plant extracts on adults of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera Tephritidae). Journal of Pest Science. 91, 907–917.
- Genskowsky E., Puente L. A., Pérez-Álvarez J. A., Fernandez-Lopez J., Muñoz L. A., Viuda-Martos M. 2015. Assessment of antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with maqui berry (*Aristotelia chilensis*). LWT-Food Science and Technology. 64, 1057-1062.
- Gomes G.L.B., Dos Santos R.C., de Albuquerque F.A., Arriel N.H.C., de Lima L.M. 2015. Bioactivity of Trypsin inhibitors from sesame seeds to control *Plodia interpunctella* larvae (Hübner)(Lepidoptera: Pyralidae). Embrapa Algodao-Artigo em periódico indexado (ALICE). 10, 3517- 3524.
- González V., Guerrero C., Ortiz U. 2000. Chemical structure and compatibility of polyamide–chitin and chitosan blends. Journal of Applied Polymer Science. 78, 850-857.
- Halonen N., Pálvölgyi P.S., Bassani A., Fiorentini C., Nair R., Spigno G., Kordas K. 2020. Bio-Based Smart Materials for Food Packaging and Sensors. A Review. Front. Mater. 7,1-14.
- Higueras C., Silva-Aguayo G., Urbina A., Figueroa I., Rodriguez-Maciel J.C., Lagunes- Tejeda A., Rodríguez M., Aguilar- Marcelino L. 2021. Control de *Sitophylus zeamais* Motschulsky con polvos de follaje de dos especies del género Eucalyptus. Chilean Journal of agricultural & animal Science, exAgro-Ciencia. 37,101-111.
- Ismail B. B., Mohammed S. F., Garba U., Sanusi S. N. 2021. Edible films and coatings based on chitosan with essential oils for anti-microbial food packaging application. Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse. 98, 27-37.
- Isman M.B. 2020. Bioinsecticides based on plant essential oils: a short overview.DE GRUYTER. Naturforsch.75, 179-182.
- Jesser E., Yeguerman C., Stefanazzi, N., Gomez R., Murray A.P., Ferrero A.A., Werdin González J.O. 2020a. An ecofriendly approach for the control of a common insect pest in the food industry, combining polymeric nanoparticles and post-application temperatures. Journal of Agriculture and Food Chemistry. 68, 5951-5958.
- Jesser E., Yeguerman C., Gili V., Santillan G., Murray A.P., Domini C., Werdin González J.O. 2020b. Optimization and characterization of essential oil nanoemulsions using ultrasound for new ecofriendly insecticides. ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 8,7981-7992.
- Jesser E., Lorenzatti A., Yeguerman C., Murray A.P., Domini C., Werdin González J.O. 2020c. Ultrasound assisted formation of essential oil nanoemulsions: Emerging alternative for *Culex pipiens pipiens* Say (Diptera: Culicidae) and *Plodia interpunctella* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae) management. Ultrasonics Sonochemistry. 61, 104832.

- Jia X., Zhang X., Liu H., Wang R., Zhang, T. 2018. Identification of chemosensory genes from the antennal transcriptome of Indian meal moth *Plodia interpunctella*. PLOS ONE. 13, 1-25.
- 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. Journal of Stored Products Research. 61, 114-118.
- 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 J., Yoon C.S., Na J.H., Han J. 2019. Prolonged Insecticidal Activity of Clove Oil-Loaded Halloysite Nanotubes on *Plodia interpunctella* Infestation and Application in Industrial-Scale Food Packaging. Journal of Food Science. 84, 2520-2527.
- 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 Hydrocolloids. 120, 106992.
- Lammari N., Louaer O., Meniai A.H., Elaissari A. 2020. Encapsulation of Essential Oils Via Nanoprecipitation Process: Overview, Progress, Challenges and Prospects. Pharmaceutics. Review.12, 1-21.
- Lee J.S., Chang Y., Park M.A., Oh J., Ha J. 2017. 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.
- Licardello F. 2017. Packaging, blessing in disguise. Review on its diverse contribution to food sustainability. Trends in Food Science & Technology. 65,32-39.
- 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 hydrocolloids. 35, 78-84.
- Li Y., Zhang C., Pan S., Chen L., Liu M., Yang K., Tian J. 2019. Analysis of chemical components and biological activities of essential oils from black and white pepper (*Piper nigrum* L.) in five provinces of southern China. LWT, 108644. 117, 1-9.
- Llanquileo Alarcón, L. (2018).Fabricación de nano y micropartículas de β -quitina a partir de la pluma del calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y evaluación de su efecto en las propiedades mecánicas y barrera al vapor de agua de películas PVOH/Quitosano. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/173467>
- Ma Q., Zhang Y., Critzer F., Davidson P. M., Zivanovic S., Zhong, Q. 2016. Physical, mechanical, and antimicrobial properties of chitosan films with microemulsions of cinnamon bark oil and soybean oil. Food Hydrocolloids. 52, 533-542.
- Maes C., Bouquillon S.; Fauconnier M.L. 2019. Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. Molecules. 24, 1-15.

- Marsin A.M., Muhamad I.I., Anis S.N.S., Lazim N.A.M., Ching, L.W., Dohaji N.H. 2020. Essential Oils as insect repellent agents in food Packaging: A Review. *European Food Research and Technology*. 246, 1519- 1532.
- 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.
- Michaud J.C., Laura Farrant L., Jan O. 2010. Environmental Benefits of Recycling e 2010 Update. *Wrap Report. Material Change for a Better Environment*. 1-255.
- Mohandass S., Arthur H.F., Zhu K.Y., Throne J.E. 2007. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. *Journal of stored products research*. 43, 302-311.
- Molina Zerpa J.A., Colina Rincón M., Rincón D., Vargas Colina J.A. 2017. Efecto del Uso de Quitosano en el Mejoramiento del Cultivo de Arroz (*Oryza sativa* L. variedad sd20a). *Revista de Investigación Agraria Ambiental*. 8, 151-165.
- Morrison W. R., Scully E.D., Campbell J.F. 2021. Towards developing areawide semiochemical-mediated, behaviorally-based integrated pest management programs for stored product insects. *Pest Management Science*. 77, 2667–2682.
- 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.
- Ordaz G., D'Armas H., Yáñez D., Moreno S. 2011. Composición química de los aceites esenciales de las hojas de *Helicteres guazumifolia* (Sterculiaceae), *Piper tuberculatum* (Piperaceae), *Scoparia dulcis* (Arecaceae) y *Solanum subinerme* (Solanaceae), recolectadas en Sucre, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*. 59, 585-595.
- Ospina J.D., Grande C.D., Monsalve L.V., AdvAncula R.C., Valencia M.E., Fan J., Rodrigues D. 2018. Evaluation of the chitosan films of essential oils from *Origanum vulgare* L (orégano) and *Rosmarinus officinalis* L (rosemary). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 24, 1- 16.
- Pavela R., Benello G. 2016. Essential Oils as Ecofriendly Biopesticides? Challenges and Constraints. *Trends in Plant Science*. 21, 1000–1007.
- Pérez J.C., Ramírez S., Suris M. 2012. Biología de *Plodia interpunctella* (Hübner) sobre garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en condiciones de laboratorio. *Revista de Protección Vegetal*. 27, 90-94.
- Pérez López, E. 2012. Plaguicidas Botánicos: Una Alternativa a Tener en cuenta. *Fitosanidad*. 16, 51-59.

- Prakan B., Singh P.P., Kumar A., Grupta V. 2022. Botanicals for Sustainable Management of Stored Food Grains: Pesticidal Efficacy, Mode of Action and Ecological Risk Assessment Using Computational Approaches. *Anthropocene Science*. 1, 62–79.
- 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 Science and Technology*. 38, 859-865.
- Rajendran S. 2020. Insect Pest Management in Stored Products. *Outlooks on Pest Management*. 31, 24-35.
- Requena R., Vargas M., Atarés L., Chiralt A. 2017. Biopolymers Carrying Essential Oils, or their Compounds, for Food Antimicrobial Packaging. *Current Organic Chemistry*. 21, 1-16.
- Ribero-Santos R., Andrade M., De Melo N.R., Sanchez-Silva A. 2017. Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and Future Trends. *Trends in Food Science y Technology*. 61,132-142.
- Rojas-Graü M.A., Avena-Bustillos R.J., Olsen C., Friedman M., Henika P.R., Martín-Belloso O., McHugh T.H. 2007. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*. 81, 634-641.
- 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, 277-283.
- Sauer D.B., Meronuck R.A., Cristensen C.M. 1992. Microflora. In: Sauer D.B. (ed) Storage of cereal grains and their products. American Association of cereal Chemists Inc, st. Paul, MN. 313-340.
- Savary S., Willocquet L., Pethybridge S.J., Esker P., McRoberts N., Nelson A. 2019. The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nature Ecology & Evolution*. 1-13.
- Sharma S., Barkauskaite S., Jaiswal S. 2021. Essential Oils as Additives in Active Food Packaging. *Food Chemistry*. 343-128403.
- Shen Z., Kandem D.P. 2015. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of the Biological Macromolecules*. 74, 289-296.
- Silva R.C., Costa J.S., Figueiredo R.O., Setzer W.N., Silva J.K.R., Maia J.G.S., Figueiredo P.L.B. 2021. Monoterpenes and Sesquiterpenes of Essential Oils from Psidium Species and Their Biological Properties. *Molecules*. 26, 1- 44.
- Siripatrawan U., Vitchayakitti W. 2016. Improving functional properties of chitosan films as active food packaging by incorporating with propolis. *Food Hydrocolloids*. 61, 695-702.

- 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.
- 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.
- Szymańska E., Winnicka K. 2015. Stability of chitosan: a challenge for pharmaceutical and biomedical applications. *Marine Drugs*. 13, 1819-1846.
- Tamang N., Shrestha P., Khadka B., Mondal M.H., Saha B., Bhattarai A. 2022. A Review of Biopolymers Utility as Emulsion Stabilizers. *Polymers* 2022. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 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 Chemistry*. 360, 129956.
- Udayakumar G. P., Muthusamy S., Selvaganesh B., Sivarajasekar N., Rambabu K., Sivamani S., Hosseini-Bandegharai A. 2021. Ecofriendly biopolymers and composites: Preparation and their applications in water-treatment. *Biotechnology Advances*. 52, 107815.
- 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-Sulca C., Vargas M., Atarés L., Chiralt A. 2018. Thermoplastic cassava starch-chitosan bilayer films containing essential oils. *Food Hydrocolloids*. 75, 107-115.
- Vázquez L.L., Pérez N. 2017. El Control Biológico Integrado al Manejo Territorial de Plagas de Insectos de Cuba. *Agroecología*. 12, 39-46.
- Vázquez-Briones, M. del C., Guerrero-Beltrán, J.A. 2017. Efecto del aceite esencial de *Cynobopogon citratus* (Hierba del limón) sobre propiedades fisicoquímicas en películas de Quitosano. *Scientia Agropecuaria*. 8, 401-409.
- Wang H., Quian J., Ding F. 2018. Emerging chitosan-based films for food packaging applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 66, 395-413.
- 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. *Journal of Applied Polymer Science*. 101, 885-891.
- Yang Y., Zhao C., Chen J., Tian G., McClements D.J., Xiao H., Zheng J. 2017. Encapsulation of polymethoxy flavones in citrus oil emulsion-based delivery systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 65, 1732-1739.