



**CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURAL DE LA QUITINA Y QUITOSANO DE LOS INSECTOS *Tenebrio molitor* Y *Galleria mellonella***

**PHYSICOCHEMICAL, MORPHOLOGICAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF THE CHITIN AND CHITOSAN OF *Tenebrio molitor* AND *Galleria mellonella* INSECTS**

A.I. Sáenz-Mendoza<sup>1</sup>, P.B. Zamudio-Flores<sup>1\*</sup>, G.A. Palomino-Artalejo<sup>1,2</sup>, J.M. Tirado-Gallegos<sup>1</sup>, V.G. García-Cano<sup>2</sup>, J.J. Ornelas-Paz<sup>1</sup>, C. Rios-Velasco<sup>1</sup>, C.H. Acosta-Muñoz<sup>1</sup>, A. Vargas-Torres<sup>3</sup>, R. Salgado-Delgado<sup>4</sup>, A. Aparicio-Saguilán<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.-Unidad Cuauhtémoc. Avenida Río Conchos s/n, Parque Industrial, Apartado postal 781, C.P. 31570, Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

<sup>2</sup>Instituto Tecnológico de Ciudad Cuauhtémoc. Av. Tecnológico s/n C.P. 31500, Cd. Cuauhtémoc, Chihuahua, México.

<sup>3</sup>Centro de Investigación en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad km 1, Rancho Universitario, C.P. 43600, Tulancingo, Hidalgo, México.

<sup>4</sup>Instituto Tecnológico de Zacatepec, Calzada Tecnológico 27, Zacatepec, Morelos, México.

<sup>5</sup>Instituto de Biotecnología, Universidad del Papaloapan, Tuxtepec, Oaxaca, México.

Received April 10, 2018; Accepted July 23, 2018

**Resumen**

En el presente estudio se obtuvo harina de los insectos *Tenebrio molitor* y *Galleria mellonella* en estado adulto, posteriormente se aisló la quitina y se desacetiló a quitosano. Los rendimientos de quitina fueron de 11.6% y 6.2% para *T. molitor* y *G. mellonella*, respectivamente. El grado de desacetilación del quitosano fue de 80.5% y 88.5% para *G. mellonella* y *T. molitor*, respectivamente. Los contenidos de nitrógeno ( $\approx 6.5\%$ ), humedad ( $\approx 5.8\%$ ) y cenizas ( $\approx 0.4\%$ ) en las quitinas de ambos insectos indicaron una calidad aceptable. No se observaron diferencias entre los pesos moleculares de las quitinas ( $\approx 889$  kDa) y los quitosanos ( $\approx 254$  kDa) de ambos insectos. La microscopía electrónica de barrido reveló estructuras de fibras en la quitina y quitosano de *T. molitor*, mientras que en *G. mellonella* fue de tipo esponjoso. La espectroscopía de infrarrojo y difracción de rayos X mostraron que las quitinas de ambos insectos son del polimorfismo tipo  $\alpha$ . El índice de cristalinidad fue mayor en los biopolímeros de *G. mellonella* que en los de *T. molitor*. Debido a su mayor rendimiento, *Tenebrio molitor* podría considerarse como una fuente alternativa novedosa y prometedora para la obtención de quitina y quitosano.

**Palabras clave:** orden lepidoptera, orden coleoptera,  $\alpha$ -quitina, HPLC-SEC, materiales biopoliméricos.

**Abstract**

In the present study, chitin and chitosan were isolated from flour obtained from adult specimens of *Tenebrio molitor* and *Galleria mellonella*. The yield of chitin was 11.6% and 6.2% for *T. molitor* and *G. mellonella*, respectively. The degree of deacetylation of chitosan was 80.5% and 88.5% for *G. mellonella* and *T. molitor*, respectively. The content of nitrogen ( $\approx 6.5\%$ ), humidity ( $\approx 5.8\%$ ) and ashes ( $\approx 0.4\%$ ) in the chitin of both insects indicated an acceptable quality. No differences were observed between the molecular weights of the chitin ( $\approx 889$  kDa) and the chitosan ( $\approx 254$  kDa) of both insects. Scanning electron microscopy revealed fiber structures in the chitin and chitosan from *T. molitor*; in contrast, the chitin and chitosan of *G. mellonella* were spongy. Infrared spectroscopy and X-ray diffraction showed  $\alpha$ -type polymorphism in the chitin of both insects. The biopolymers of *G. mellonella* exhibited a higher crystallinity index than those of *T. molitor*. Due to the higher yield obtained from *T. molitor*, this insect could be considered as a promising alternative source for obtaining chitin and chitosan.

**Keywords:** lepidoptera, coleoptera,  $\alpha$ -chitin, HPLC-SEC, biopolymer materials.

\* Corresponding author. E-mail: pzamudio@ciad.mx  
doi: <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n1/Saenz>  
issn-e: 2395-8472

## 1 Introducción

La quitina es el segundo biopolímero más abundante en la naturaleza (después de la celulosa) y se encuentra principalmente en un gran número de organismos como los crustáceos, hongos, arácnidos e insectos (Elieh-Ali-Komi y Hamblin, 2016; J.A. Salazar-Leyva y col., 2014; King y col., 2017). El quitosano (derivado de la quitina) es un copolímero lineal que consiste de unidades de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidas por enlaces glucosídicos  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) con diferentes proporciones, dependiendo del grado de acetilación (GA) (Dash y col., 2011; Pérez-Escobedo y col., 2016; Xie y col., 2016). La importancia comercial de la quitina y quitosano radica en que se utilizan en diversas áreas como la biotecnología, farmacéutica, biomédica, alimenticia y agricultura (Chávez-Magdaleno y col., 2018; Islem y Marguerite, 2015; Tharanathan y Kittur, 2003; Xu y col., 2005). La principal fuente de suministro comercial de quitina y quitosano provienen de desechos de la industria marítima, como son los camarones, langostinos y cangrejos; por tal motivo la mayoría de los estudios se han enfocado en estas fuentes (Hamed y col., 2016; Synowiecki y Al-Khateeb, 2003). Recientemente algunos grupos de investigación han reportado el enorme potencial que pueden tener los insectos como materia prima (Amador-Mendoza y col., 2016; Erdogan y Kaya, 2016; Kaya y col., 2016a; Marei y col., 2016; Monter-Miranda y col., 2016). Sin embargo, a pesar de ser los organismos más diversos en el mundo, por el momento existe poca información sobre la caracterización de especies insectiles (Kaya y col., 2014a; Liu y col., 2012). Además, se ha observado que las propiedades de la quitina y quitosano varían dependiendo de la fuente de obtención. Por citar algunos estudios, Marei y col. (2016) encontraron diferencias en la cristalinidad y tipo de estructuras morfológicas en el quitosano aislado de tres diferentes insectos (*S. gregaria*, *A. mellifera* y *C. rugosa*). Por otro lado, Kaya y col. (2014b) observaron diferencias en los rendimientos de quitina y quitosano para diferentes especies acuáticas insectiles del orden hemiptera, odonata y coleoptera.

Existen especies insectiles que pueden criarse artificialmente, y que por tal motivo podrían ser una alternativa viable para la obtención de quitina y quitosano (Nemtsev y col., 2004). En este sentido, los insectos *Tenebrio molitor* y *Galleria mellonella* pueden ser viables debido a su facilidad

de reproducción y propagación. El insecto *T. molitor* pertenece al orden coleóptera y es considerado una plaga insectil porque merma el rendimiento de granos almacenados (Cosimi y col., 2009). Por otra parte, *G. mellonella* o comúnmente conocido como “polilla de la cera”, también es considerado plaga, debido a que afecta a colmenas de abejas melíferas (Anderson, 1990). Tanto *G. mellonella* como *T. molitor* están distribuidos mundialmente y se crían artificialmente para varios usos, como por ejemplo, la reproducción de entomopatógenos (Boff y col., 2000; Christen y col., 2007) y además, también son empleados como alimento vivo de animales. En la crianza y reproducción de estos insectos se utilizan técnicas prácticamente sencillas y de bajo costo (Mohamed y Coppel, 1983; Van Zyl y Malan, 2015); sin embargo, para sugerir la posibilidad de obtener quitina y el quitosano y diversificar sus potenciales aplicaciones es indispensable realizar su caracterización, debido a que algunas variables fisicoquímicas como el grado de desacetilación, peso molecular y cristalinidad afectan sus propiedades funcionales. Adicionalmente, resulta importante la determinación de la calidad (contenido de cenizas, humedad y proteínas residuales) de la quitina y quitosano para aplicaciones relacionadas con el consumo humano (alimenticias) y en aplicaciones biomédicas (Aranaz y col., 2009). Por lo que el objetivo de este estudio consistió en caracterizar la quitina y quitosano obtenidos de *G. mellonella* y *T. molitor* mediante estudios fisicoquímicos, morfológicos y estructurales.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Materiales

Para la obtención de los insectos se establecieron criaderos artificiales en contenedores de plástico y de vidrio. Los reactivos utilizados para la extracción de quitina y quitosano y el análisis químico proximal fueron de grado analítico. Estos reactivos fueron HCl 0.1 N, 0.1 M y 2 M, NaOH a las concentraciones 2 M, 0.1 M y al 60%, NaBH<sub>4</sub> a 0.04 g/50 mL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98%, mezcla reactiva de selenio (Cat. No. 1.08030), H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> al 4%, indicador Wesslow, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> al 99%. Para fines de comparación se utilizó quitina comercial de cangrejo (acetilación >95%; No. producto: C9213; CAS: 1398-61-4), quitosano de peso molecular bajo (desacetilación  $\geq$  75%; peso molecular viscosimétrico de 50,000-190,000 Da; viscosidad de 20-300 cP; No.

producto: 448869; CAS: 9012-76-4), quitosano de peso molecular medio (desacetilación de 75-85%; peso molecular viscosimétrico de 190,000-310,000 Da; viscosidad de 200-800 cP; No. producto: 448877; CAS: 9012-76-4) y quitosano de peso molecular alto (desacetilación >75%; peso molecular viscosimétrico de 310,000-375,000 Da; viscosidad de 800-2000 cP; No. producto: 419419; CAS: 9012-76-4). Todos los reactivos utilizados (incluyendo la quitina y los quitosanos comerciales) fueron de grado analítico, manufacturados por Sigma-Aldrich (Toluca, Estado de México, México).

## 2.2 Obtención de la harina

Se utilizaron insectos enteros (*T. molitor* y *G. mellonella*) en estado adulto y se lavaron con agua destilada para eliminar impurezas. Posteriormente los insectos se secaron en una incubadora (FinePCR, Combi-SV12DX Yangchun, Seoul, Korea) a 50 °C por 72 h. Una vez secas las muestras, se pulverizaron en un molino IKA (modelo M 20, IKA Works, Inc., NC, USA) y se tamizaron en una malla de 150 µm (No. 100, ASTM) para uniformizar el tamaño de partícula. Finalmente las harinas de cada insecto se almacenaron en bolsas herméticas de 16.5 × 14.9 cm (Ziploc, Johnson y Sons, Inc., Racine, WI, USA) protegiéndolas de la humedad y la luz hasta su posterior uso.

## 2.3 Extracción de la quitina

La quitina se extrajo a partir de las harinas de los insectos *T. molitor* y *G. mellonella*. La extracción de la quitina se realizó de acuerdo al método reportado por Kaya y col. (2015b) con algunas modificaciones. Para lo cual primero se realizó una desmineralización y posteriormente una desproteización: a) Desmineralización. En un matraz Erlenmeyer (250 mL) se mezclaron 2.17 g de polvo con 100 mL de HCl 2 M. La mezcla se calentó a 50 °C durante 24 h, cubriendo el matraz perfectamente con papel aluminio, para evitar la pérdida de solución por evaporización. Una vez terminado el proceso, se filtró con agua destilada varias veces hasta que se alcanzó un pH neutro. b) Desproteización. Una vez desmineralizada, la muestra se desproteizó mediante tratamiento alcalino con 100 mL de solución de NaOH 2 M a 50 °C durante 24 h en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Este tratamiento con NaOH separó las proteínas retenidas. De nuevo la muestra se lavó con agua destilada un par de

veces para lograr el pH neutro. Posteriormente la quitina se trató con cloroformo:metanol:agua destilada (relación 1:2:4) durante 10 min para la eliminación de pigmentos y lípidos residuales. Por último, la quitina se sometió a secado (40 °C/24 h) en una incubadora (FinePCR Combi-SV12DX). Para la determinación de la residualidad de proteína (%P) en quitina, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%P = (\%N_{total} - \%N_{quitina}) \times 6.25 \quad (1)$$

donde %Ntotal es el contenido de nitrógeno total obtenido experimentalmente, %Nquitina es el contenido teórico de nitrógeno en quitina (6.89), y 6.25 es el factor del contenido teórico promedio de nitrógeno en proteínas.

## 2.4 Obtención del quitosano

Para la obtención del quitosano se utilizó la metodología descrita por Kaya y col. (2014b) con algunas modificaciones. La quitina extraída se trató con 50 mL de solución acuosa de NaOH al 60% que contenía NaBH<sub>4</sub> (0.04 g). Esta mezcla se colocó en un matraz Erlenmeyer cerrado y se calentó a 120 °C en placa de calentamiento (Corning 6795-220, PC-220 de 4" × 5" Corning Mexicana S.A.-Life Sciences, Mty, México) con agitación constante durante 2 h, subsecuentemente, el producto se filtró utilizando filtros comunes para cafetera (Mr. Coffee modelo UF100 Sunbeam products, Winsconsin, USA) por su disponibilidad y funcionalidad, aplicando varios lavados con agua destilada para remover los residuos adheridos al filtro y el sobrenadante se ajustó a pH neutro y se sometió a secado (40 °C/24 h) en una incubadora (FinePCR Combi-SV12DX).

## 2.5 Determinación de nitrógeno, humedad y cenizas

El análisis químico proximal consistió en la determinación de cenizas (942.05), humedad (934.01), y nitrógeno (991.20) en la harina, quitina y quitosano de los insectos, mediante los métodos oficiales de la AOAC (2002).

## 2.6 Grado de desacetilación (GD) mediante titulación potenciométrica

Las muestras se analizaron siguiendo la metodología descrita por Kucukgulmez y col. (2011) con ligeras

modificaciones. Se disolvieron 0.1 g de cada una de las muestras de quitosano en 10 mL de una solución de HCl al 0.3 M y posteriormente se aforó a 50 mL con agua destilada. La mezcla se colocó en un vaso de precipitado, y se evaluó con ayuda de un potenciómetro (modelo pH 211, Hanna Instruments, Ciudad de México) con una exactitud de 0.01. La valoración se realizó registrando el cambio de pH a cada 0.25 mL de base (NaOH al 0.1 M) agregada. La determinación presentó una curva con dos puntos de inflexión que corresponden al volumen consumido de solución NaOH. La determinación del grado de desacetilación (GD) evaluada como un porcentaje, se realizó por triplicado y se utilizó la siguiente fórmula reportada por Weska y col. (2007):

$$GD \% = \frac{16.1(y-x)}{w} \times f \quad (2)$$

donde  $y$  son los mL de NaOH gastados en el punto de inflexión mayor,  $x$  corresponde a los mL de NaOH gastados en el punto de inflexión menor,  $w$  es la masa de la muestra en gramos,  $f$  es la molaridad de la solución de NaOH y la constante 16.1 es un factor relacionado con el peso equivalente del quitosano (Weska y col. 2007).

## 2.7 Determinación del peso molecular por cromatografía de alta resolución por exclusión de tamaño (HPSEC)

Se utilizó la técnica de HPSEC para la determinación de los pesos moleculares de las quitinas y quitosanos de los insectos de acuerdo con la metodología recientemente reportada por Monter-Miranda y col. (2016). Para esto, 5 mg de quitina se disolvieron con 2 mL de DMAc/LiCl (5% p/v) bajo agitación magnética a 60 °C en un baño de aceite por al menos 48 h. Posteriormente, la solución se filtró a temperatura ambiente a través de un filtro de fibra de vidrio de 0.3  $\mu$ m (Whatman) y se transfirió en viales para HPLC por análisis SEC (HPLC-SEC). El análisis SEC se realizó utilizando el reactivo DMAc/LiCl como la fase móvil y un conjunto de dos en serie PLgel (7.5  $\times$  300 mm; 5  $\mu$ m, 1  $\times$  10<sup>4</sup> Å) y PLgel (7.5  $\times$  300 mm; 5  $\mu$ m, 500 Å). Este conjunto de columnas analíticas se protegió con un guardacolumna (50  $\times$  7.5 mm). El análisis SEC se realizó a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min, a 50 °C, equipado con un detector de dispersión de luz PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, US). Para la determinación del peso molecular de los quitosanos, estos se solubilizaron en ácido acético (0.25 M) a una concentración final de

4 g/L. Esta solución se inyectó en un equipo de HPLC-SEC, equipado con una columna 500 ultrahydrogel® (7.8  $\times$  300 mm) y un detector de dispersión de luz PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, US). La separación se realizó con ácido acético al 0.25 M como la fase móvil, a una velocidad de flujo de 0.3 mL/min mediante una bomba isocrática HP Series 1100. Con los disolventes empleados en la determinación de los pesos moleculares de la quitina y quitosano, se alcanzó una solubilización del 94 y 98% para la quitina y quitosano, respectivamente.

## 2.8 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se evaluó la morfología superficial de las muestras de harina, quitina y quitosano de los insectos y de la quitina y quitosanos comerciales mediante un microscopio electrónico de barrido HITACHI (SU3500, Tokio, Japón). El equipo se utilizó a 15 kV como voltaje de aceleración, 80 Pa de presión y se utilizó la señal de electrones secundarios (UVD-UltraVariable-PressureDetector). Las muestras se visualizaron a 100X, 500X y 1000X. Los análisis elementales por EDS (espectroscopía por dispersión de energía) se realizaron utilizando un equipo acoplado al microscopio marca OXFORD, modelo AZtec X-MAX<sup>N</sup>, del cual se obtuvo el análisis semicuantitativo de las muestras.

## 2.9 Difracción de Rayos X

Para esta determinación se utilizó un difractómetro de rayos X (Analytical X'pert PRO X'Celerator, Texas, USA). Los picos de difracción se midieron a una radiación de CuK ( $\lambda = 1.5418$  Å) operando a un voltaje de 40 kV. Los datos se registraron a una velocidad de barrido de 1°/min con el ángulo de exploración  $2\theta$  de 5° a 40°. El índice de cristalinidad (IC) se obtuvo aplicando la siguiente fórmula (Lavall y col., 2007):

$$\text{Índice de cristalinidad (\%)} = \left[ \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \right] \times 100 \quad (3)$$

donde  $I_{110}$  es la máxima intensidad en el pico correspondiente a  $2\theta \cong 20^\circ$ ;  $I_{am}$  es la intensidad de la difracción amorfa correspondiente a  $2\theta \cong 16^\circ$ .

## 2.10 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Las muestras de quitina y quitosano (insectiles y comerciales) se caracterizaron utilizando un espectrofotómetro marca Perkin Elmer (Spectrum Two GX FTIR System, Massachusetts, USA) con ayuda de un accesorio de ATR (reflectancia total atenuada, por sus siglas en inglés) marca Smiths, modelo Quest, con ventana de diamante de un rebote. Las muestras se colocaron en el porta-muestras para ATR, y los espectros se obtuvieron con un barrido de número de onda ( $1/\lambda$ ) de 450 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  registrando un promedio de 32 barridos por muestra con una resolución de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Se ejerció una presión de 100 unidades y se realizó el análisis utilizando el software spectrum.

## 2.11 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño estadístico completamente aleatorizado. Para cada determinación o análisis se empleó un tamaño mínimo de tres repeticiones ( $n \geq 3$ ) en todas las muestras. Para el análisis de resultados, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA,  $P \leq 0.05$ ) utilizando el programa estadístico MiniTab, versión 17 (Minitab Inc., State College, Pennsylvania, USA). Se determinaron las diferencias entre las muestras por medio de la prueba de Tukey (Walpole y col., 1999).

## 3 Resultados y discusión

### 3.1 Contenido de nitrógeno, humedad y cenizas

Se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en el contenido de nitrógeno determinado en las harinas de ambos insectos (Tabla 1). Los insectos *T. molitor* y *G. mellonella* presentaron un contenido de nitrógeno de  $\approx 9.5$  y  $8.0\%$ , respectivamente, lo que indicó un contenido de  $\approx 59$  y  $51\%$  de proteína total ( $N \times 6.25$ ). En la determinación de la proteína total no se consideró la contribución del contenido de nitrógeno de la quitina. Finke y Oonincx (2014) sugieren que aunque este método es conveniente, esto supone una distribución uniforme de aminoácidos y puede conducir a una ligera sobreestimación del contenido real de proteína debido a la presencia de otros compuestos que contienen nitrógeno (como la quitina). Pese a esto, en reportes recientes en los que todos los aminoácidos se determinaron y cuantificaron, la recuperación de proteínas (suma de los aminoácidos divididos por contenido de proteína total) fue adecuada, lo cual sugirió que la proteína total es una estimación razonable de proteína verdadera en este tipo de orden insectil (Finke 2002, 2007 y 2013).

Tabla 1. Contenido de nitrógeno, humedad y ceniza en muestras de quitina y quitosano de *T. molitor*, *G. mellonella* y muestras comerciales.

Muestras		Análisis		
		Nitrógeno (%)	Humedad (%)	Cenizas (%)
<i>Tenebrio molitor</i>	Harina	$9.47 \pm 0.13^a$	$6.50 \pm 0.03^c$	$3.60 \pm 0.09^b$
	Quitina	$6.69 \pm 0.02^{def}$	$6.57 \pm 0.11^c$	$0.20 \pm 0.00^{de}$
	Quitosano	$6.90 \pm 0.07^{cde}$	$9.01 \pm 0.02^a$	$0.10 \pm 0.00^{de}$
<i>Galleria mellonella</i>	Harina	$8.09 \pm 0.02^b$	$5.57 \pm 0.12^d$	$3.99 \pm 0.00^a$
	Quitina	$6.29 \pm 0.01^{gh}$	$4.93 \pm 0.02^e$	$0.52 \pm 0.02^c$
	Quitosano	$6.47 \pm 0.09^{fg}$	$8.59 \pm 0.10^{ab}$	$0.07 \pm 0.02^e$
Comerciales <sup>2</sup>	Quitina	$6.07 \pm 0.03^h$	$4.85 \pm 0.17^e$	$3.65 \pm 0.08^b$
	Quitosano PMB	$7.18 \pm 0.10^c$	$6.41 \pm 0.15^c$	$0.30 \pm 0.00^{cd}$
	Quitosano PMM	$6.63 \pm 0.02^{efg}$	$8.08 \pm 0.00^b$	$0.19 \pm 0.04^{de}$
	Quitosano PMA	$7.04 \pm 0.03^{cd}$	$3.00 \pm 0.01^f$	$0.05 \pm 0.00^e$

<sup>1</sup>Media aritmética de al menos tres repeticiones  $\pm$  error estándar. Valores con la misma letra dentro de las columnas no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P > 0.05$ ).

<sup>2</sup>Las nomenclaturas para los quitosanos comerciales son: PMB = Peso molecular bajo, PMM = Peso molecular medio, PMA = Peso molecular alto.



En general, estos valores son similares para ambos insectos, y pueden considerarse altos en relación a otras especies insectiles recientemente reportados en la literatura científica. Por mencionar algunos, Ramos-Elorduy y col. (2002) evaluaron el contenido de proteína en insectos comestibles (recolectados en el estado Hidalgo, México) pertenecientes al orden ortóptera (57.00-70.72%), coleóptera (20.98-70.90%), lepidóptera (31.15-57.24%) e himenóptera (9.15-75.10%), encontrando variación entre los diferentes órdenes insectiles, inclusive entre las especies del mismo orden. Indudablemente, se ha reportado que los insectos del orden ortóptera son los que mayor contenido proteico presentan en su estructura (Ramos-Elorduy y col., 2012). Sin embargo, los resultados del contenido de proteínas en *T. molitor* y *G. mellonella* son similares a este tipo de orden de insectos, lo que indicaría que ambos insectos pueden ser una fuente alimenticia de gran valor. Es importante mencionar que no todo el contenido de nitrógeno en el cuerpo de los insectos se encuentra presente en las proteínas, una parte está asociado a la quitina (Finke, 2007). Por otra parte, las diferencias en el contenido de proteínas para ambos insectos pueden atribuirse a las variaciones estructurales taxonómicas propias de cada insecto. Al respecto, Finke (2007) determinó un mayor contenido de aminoácidos en las proteínas cuticulares de los insectos que presentan mayor dureza (rigidez) en su cutícula, por lo que esto podría explicar la diferencia en el contenido de proteína entre *G. mellonella* y *T. molitor*, ya que éste último presenta una mayor dureza.

El porcentaje de nitrógeno disminuyó durante el proceso de obtención de las quitinas insectiles. Se observó un mayor contenido de nitrógeno en la quitina de *T. molitor* (6.69%) que en *G. mellonella* (6.29%), y este último fue similar al contenido de nitrógeno determinado en la quitina comercial de cangrejo (6.07%). Se han reportado disminuciones similares durante la etapa de harina a quitina en los insectos *H. parallela* (11.29 a 6.3%) y en la cigarra denominada Cicada slough (*Cryptotympana pustulata Fabricius*) (7.72 a 6.26%) (Liu y col., 2012; Sajomsang y Gonil, 2010). Las diferencias pueden atribuirse a la fuente de obtención y a las condiciones empleadas durante el tratamiento. Los valores del presente estudio son ligeramente menores que el valor teórico (6.89%) calculado para una quitina completamente acetilada, lo que indicó un eficiente tratamiento de desproteinización, ya que un porcentaje arriba de este valor, sugiere proteína residual en la quitina (Majtán y col., 2007). Por otra parte, un contenido de nitrógeno inferior al 6.89%

indica residualidad de materia inorgánica (Kaya y col., 2014c; Sajomsang y Gonil, 2010).

A partir de la quitina, el proceso de desacetilación causó un incremento en el porcentaje de nitrógeno, aunque no fue significativo ( $P > 0.05$ ). El contenido de nitrógeno fue más alto en *T. molitor* (6.90%) que en *G. mellonella* (6.47%), y el contenido de ambos insectos está en el intervalo de los quitosanos comerciales (6.63-7.18%). Se han reportado valores y aumentos similares de nitrógeno en el insecto *L. decemlineata* adulto (quitina = 6.6% y quitosano = 7.2%) y larva (quitina = 5.2% y quitosano = 6.9%) y *D. maroccanus* en su etapa ninfal (quitina = 5.66% y quitosano = 6.45%) y adulta (quitina = 4.63% y quitosano = 7.20%) (Erdogan y Kaya, 2016; Kaya y col., 2014a). En la literatura se menciona que el contenido de nitrógeno presenta ligeras variaciones dependiendo del grado de desacetilación (GD), observándose un incremento debido a la presencia de una mayor cantidad de grupos aminos disponibles por motivo de la eliminación del grupo acetilo en la N-acetil glucosamina de la cadena polimérica (de Alvarenga, 2011; Soon y col., 2018). Esto podría explicar la diferencia entre *G. mellonella* y *T. molitor*, ya que se observó una relación con el GD. Los valores obtenidos en los quitosanos del presente estudio son ligeramente más bajos que el valor teórico (8.7%) de un quitosano totalmente desacetilado (Swain y col., 2009), por lo anterior, esto confirma la presencia de algunos grupos que aún están acetilados.

Como se puede observar en la Tabla 1, el porcentaje de humedad fue mayor en la harina, quitina y quitosano de *T. molitor* (6.50, 6.57, y 9.01%, respectivamente) que en los correspondientes a *G. mellonella* (5.57, 4.93 y 8.59%), además, ambos insectos presentaron similitud en los contenidos de humedad evaluados en la quitina (4.85%) y quitosanos comerciales (3.00-8.08%). En relación a este contenido de humedad, se han reportado valores semejantes en los insectos *B. portentosus* (harina, 5.45%; quitina, 4.00%) y *H. parallela* (harina, 3.63%; quitina, 7.12%) (Ibitoye y col., 2018; Liu y col., 2012). Mientras tanto, en quitosano obtenido de otras fuentes comerciales o insectiles se han reportado valores que fluctúan de 17.6, 14.1, 8.8 y 15.2%, en la abeja de miel, langosta del desierto, escarabajo y camarón, respectivamente (Marei y col., 2016). En investigaciones previas han reportado un contenido menor al 10% en el quitosano comercial (Li y col., 1992). Las diferencias entre los datos del presente estudio y lo reportado en la literatura puede atribuirse a la variación entre las especies estudiadas y los métodos

utilizados para su determinación (Ibitoye y col., 2018). El quitosano obtenido de *T. molitor* y *G. mellonella* presentó un mayor contenido de humedad a diferencia de la quitina. Esto podría atribuirse a la eliminación de los grupos acetilo (mediante la desacetilación), y por lo tanto, el quitosano presenta la capacidad de absorber mayor contenido de humedad debido a su naturaleza higroscópica (de la Paz y col., 2012; Khan y col., 2002). Gocho y col. (2000) mencionan que el quitosano tiene tres factibles sitios de absorción de agua como son el grupo hidroxilo, grupo amino y el final de la cadena polimérica (compuesta por un grupo hidroxilo ó aldehído). Inclusive, es importante observar que el quitosano de *T. molitor* presentó mayor porcentaje de humedad (aunque no fue significativo) y GD que *G. mellonella*, por lo que esto podría deberse a la diferencia estructural entre ambas especies. Se han reportado tendencias similares por Oduor y col. (2008) en donde obtuvieron quitosanos de cangrejo, langosta y larva insectil con diferentes GD mediante varias condiciones de tratamiento (diferentes temperaturas y tiempos de desacetilación), y observaron un ligero aumento en el contenido de humedad (7-13%); mientras incrementó el grado de desacetilación, atribuyendo a que el quitosano presenta mayor cantidad de enlaces de hidrógeno disponibles. Por otra parte, Aranaz y col. (2009) mencionan que un contenido de humedad inferior al 10% es adecuado para aplicaciones biomédicas, por lo que podemos deducir que el quitosano obtenido de ambos insectos (*G. mellonella* y *T. molitor*) es de calidad aceptable.

En la muestra de harina del insecto *G. mellonella* se observó un mayor contenido de cenizas ( $\approx 4.0\%$ ) que en *T. molitor* (3.6%) (Tabla 1). No obstante, después del proceso de desmineralización el contenido inicial de cenizas en la harina de *T. molitor* y *G. mellonella* se redujo hasta un 94% y 87%, respectivamente. Es importante mencionar, que la quitina comercial de cangrejo mostró un mayor contenido de ceniza residual (3.65%) en comparación con las quitinas insectiles (0.20-0.52%), incluso se observó similitud con la harina del insecto *T. molitor*. El contenido de cenizas está relacionado con los minerales presentes en el cuerpo de los insectos y diversos estudios han reportado elementos presentes como el nitrógeno, potasio, magnesio, sodio, hierro y calcio, los cuales varían dependiendo del tamaño, orden insectil, sexo, estación y condiciones posteriores del sacrificio (Studier y Sevvick, 1992). Estos valores son similares a los reportados en el insecto *B. portentosus* (6.77%) y plumas de

calamar (1.90%) (Ibitoye y col., 2018; Lavall y col., 2007), y sustancialmente menores a los crustáceos, como son cáscaras de camarón (52.64%) y cangrejo (59.11%) (Hamdi y col., 2017). Estas diferencias pueden ser debidas a las variaciones en su estructura taxonómica. En otros estudios, Oduor y col. (2008) determinaron un menor contenido de cenizas en la larva del insecto *C. erythrocephala* ( $< 1\%$ ) que en los crustáceos como el cangrejo, langosta y gamba (26.3-45.2%), por lo que no requirió tratamiento de desmineralización. Los autores atribuyen que esta variación se debió a una posible diferencia de los insectos, ya que los crustáceos contienen un alto contenido de carbonato de calcio en su estructura exoesquelética. Liu y col. (2012) han sugerido que, debido al bajo contenido de materiales inorgánicos en los insectos, se pueden utilizar moderadas condiciones de tratamiento ácido en comparación con los crustáceos, por lo que ajustando el tratamiento acorde a la materia prima de *T. molitor* y *G. mellonella* implicaría un tratamiento de desmineralización a menor costo. En general, el contenido de cenizas residuales en la quitina de *T. molitor* y *G. mellonella* son menores que los reportados por Liu y col. (2012) en el insecto *H. parallela* (2.2%) y camarón comercial (1.59%), y similares los obtenidos por Hajji y col. (2014) en camarón (0.4%), cangrejo (0.5%) y calamar (0.8%). Estas diferencias podrían atribuirse posiblemente al contenido de minerales en la fuente, tamaño de partícula y condiciones del tratamiento (concentración del ácido, temperatura, tiempo y relación soluto/disolvente) (Poeloengasih y col., 2010; Younes y Rinaudo, 2015). En relación a los quitosanos, se observaron menores contenidos (0.07-0.10%) que en las quitinas y no se observaron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre ambos insectos. Estos valores están en el intervalo (0.05-0.30%) de los quitosanos comerciales del presente estudio. Estas disminuciones concuerdan con los obtenidos por Hajji y col. (2014), donde a partir de la quitina de crustáceos (0.5-0.8%) observaron una disminución en el contenido de cenizas después del proceso de desacetilación, e inclusive en el quitosano la ceniza no fue detectable. Poeloengasih y col. (2010) infieren que los grupos acetilos forman un complejo de inclusión con los minerales, por lo que posiblemente después del proceso de desacetilación en la quitina de *T. molitor* y *G. mellonella* se eliminaron algunos grupos acetilos que todavía podían estar unidos a minerales. En datos cuantitativos, observamos que los minerales en las quitinas insectiles se removieron 94.4% y 87% en *T. molitor* y *G. mellonella*, respectivamente;

mientras que en sus correspondientes quitosanos, estos porcentajes de remoción de minerales incrementaron a 97% para *T. molitor* y 98% para *G. mellonella*. En relación al porcentaje de remoción de proteínas (%P), los cálculos determinados con la ecuación (1) indicaron un porcentaje de remoción del 100% en las quitinas.

En relación al contenido de lípidos, se observó que este fue mayor en la harina de *G. mellonella* ( $\approx 19\%$ ) que en *T. molitor* ( $\approx 17\%$ ) sin que se observara diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en el contenido de lípidos de las quitinas y sus respectivos quitosanos, siendo similares a las muestras comerciales (datos no mostrados). Hajji y col. (2014) reportaron menores contenidos de lípidos en materia prima de fuentes comerciales (crustáceos como camarón, 0.9%; cangrejo, 0.7%; calamar, 0.7%), y recientemente Zhang y col. (2018) cuantificaron un contenido inicial de lípidos (0.7%) en conchas de cangrejo, aunque este contenido no se detectó después del proceso de obtención de quitina. De manera similar, Hamdi y col. (2017) no identificaron el contenido de lípidos en quitinas obtenidas a partir de conchas de cangrejo azul y cáscaras de camarón; sin embargo, estos investigadores reportaron un valor bajo de lípidos ( $\approx 1.08\%$ ) en la materia prima. Los valores relativamente altos del contenido de lípidos en las harinas insectiles del presente estudio, están relacionadas con el mayor contenido lipídico en los insectos que en las fuentes comerciales de crustáceos. En términos generales, las quitinas y los quitosanos obtenidos en el presente estudio pueden ser considerados de alta calidad ya que presentaron bajos contenidos de cenizas y lípidos (inferiores a 1%) y son similares a las muestras comerciales, lo cual indicaría que los tratamientos utilizados para la obtención de estos biopolímeros fueron adecuados (Nessa y col., 2010). Finalmente, esto se considera importante, debido a que un bajo contenido de cenizas y lípidos contribuye a una mayor solubilidad y viscosidad del quitosano (Kumari y col., 2017).

### 3.2 Propiedades fisicoquímicas

En la Tabla 2 se observan los resultados de las propiedades fisicoquímicas evaluadas en las muestras de quitina y quitosano de los insectos *G. mellonella* y *T. molitor*. De las variables fisicoquímicas evaluadas en la caracterización de quitina y quitosano, el peso molecular y el grado de desacetilación (GD) destacan por su importancia funcional, siendo el GD de la muestra, la referencia para diferenciar entre quitina y quitosano (se considera quitosano cuando el GD es superior al 50%) (Cárdenas y col., 2004). No se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre los pesos moleculares promedio en peso ( $M_w$ ) de la quitina ( $M_w \approx 884\text{--}894$  kDa) y quitosano ( $M_w \approx 253\text{--}254$  kDa), ni entre los pesos moleculares promedio en número ( $M_n$ ) para la quitina ( $M_n \approx 736\text{--}777$  kDa) y quitosano ( $M_n \approx 189\text{--}202$  kDa) de ambos insectos, y tampoco se observó diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) en sus respectivos índices de polidispersidad ( $M_w/M_n$ ), con valores que oscilaron de 1.15 a 1.20 en las quitinas, y de 1.26 a 1.34 en los quitosanos insectiles (Tabla 2). En la literatura científica son escasos los reportes en relación a valores del índice de polidispersidad en quitinas y quitosanos de insectos, y a nuestro mejor entendimiento, este es el primer reporte en relación a la determinación del índice de polidispersidad en estas especies de insectos, por lo que no es posible su comparación con muestras insectiles; sin embargo, recientemente Vázquez y col. (2017) determinaron valores de índice de polidispersidad de  $1.64 \pm 0.39$ ,  $1.42 \pm 0.16$  y  $1.90 \pm 0.09$  para muestras de quitosano obtenido de la especie del calamar *Illex argentinus* utilizando las enzimas alcalasa, esperasa y un método químico (12.5 h de reacción con NaOH al 50%), respectivamente, por lo que nuestros valores del índice de polidispersidad son cercanos a los reportados por estos investigadores.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de la quitina y quitosano obtenidos de *Galleria mellonella* y *Tenebrio molitor*<sup>1</sup>.

Muestra insectil	Quitina			Grado de desacetilación (%)	Quitosano	
	Rendimiento (%)	Peso molecular (kDa)	$M_w/M_n^2$		Peso molecular (kDa)	$M_w/M_n^2$
<i>Galleria mellonella</i>	$6.16 \pm 1.64^b$	$883.57 \pm 1.64^a$	$1.20 \pm 0.10^a$	$80.50 \pm 1.64^b$	$252.54 \pm 1.51^a$	$1.34 \pm 0.50^a$
<i>Tenebrio molitor</i>	$11.58 \pm 0.10^a$	$893.98 \pm 0.10^a$	$1.15 \pm 0.11^a$	$88.55 \pm 0.00^a$	$253.71 \pm 2.52^a$	$1.26 \pm 0.45^a$

<sup>1</sup>Media aritmética de al menos tres repeticiones  $\pm$  error estándar. Promedios con letras minúsculas iguales en la misma columna no son significativamente diferentes ( $P \geq 0.05$ ).

<sup>2</sup>La relación  $M_w/M_n$  se considera como el índice de polidispersidad, donde  $M_w$  = Masa molar promedio en peso, y  $M_n$  = Masa molar promedio en número.



Se registró una reducción del  $M_w$  ( $\approx 71\%$ ) cuando se realizó la desacetilación de la quitina para la obtención del quitosano. Esto puede deberse a que durante el proceso de desacetilación se emplean reactivos químicos agresivos (hidróxido de sodio y ácido clorhídrico) los cuales pueden ocasionar (además de la desacetilación) cierto grado de despolimerización con la consecuente reducción en el peso molecular del quitosano obtenido (Nemtsev y col., 2004; Sajomsang y Gonil, 2010). Los  $M_w$  de la quitina obtenida para cada insecto fueron superiores al reportado por Kaya y col. (2015c) en siete especies del orden orthoptera ( $\approx 5-7$  kDa), y menores a lo observado por Rødde y col. (2008) en cascaras de camarón ( $\approx 940-1060$  kDa). El  $M_w$  del quitosano de ambos insectos fue similar a lo reportado previamente en *Apis mellifera* (200-250 kDa) y son diferentes a lo reportado en *D. maroccanus* ( $\approx 6-7$  kDa), cangrejo (483-526 kDa) y camarón (2.2 kDa) (Erdogan y Kaya, 2016). El GD fue mayor en *T. molitor* (88.55%) que en *G. mellonella* (80.50%). En otros estudios también se han observado diferencias entre varias especies, aunque las condiciones del tratamiento hayan sido las mismas. Por mencionar algunos, Marei y col. (2016) determinaron (mediante titulación potenciométrica) un mayor GD (98%) en langosta del desierto (*S. gregaria*) que en la abeja de miel *A. mellifera* (96%), camarón *P. monodon* (74%) y el escarabajo *C. rugosa* (95%). De igual manera, Kumari y col. (2017) determinaron (mediante FTIR) un mayor GD en las cáscaras camarón (78%) que en las de cangrejo (70%) y escamas de pescado (75%). Las diferencias entre los resultados del  $M_w$  y el GD del presente estudio en comparación a los anteriormente citados pueden atribuirse a la fuente de obtención, métodos de medición y a las condiciones del tratamiento de desacetilación (reactivo, concentración, tiempo, temperatura, repetición de los pasos alcalinos, presión atmosférica, tamaño de partícula y relación quitina-disolvente) (Younes y Rinaudo, 2015). La diferencia encontrada entre *G. mellonella* y *T. molitor* en el GD puede ser debida a las características fisicoquímicas iniciales de cada insecto, ya que en la literatura se menciona que la quitina se encuentra parcialmente desacetilada de manera natural (puede variar entre 5-25%, dependiendo de la fuente) para que haya una función fisiológica adecuada en la cutícula (Muthukrishnan y col., 2016). El rendimiento de quitina en *G. mellonella* fue menor ( $\approx 6\%$ ) en comparación con el rendimiento de *T. molitor* ( $\approx 12\%$ ), indicando que este insecto presenta

aproximadamente el doble del contenido de quitina que *G. mellonella*. En consecuencia, *T. molitor* representa un insecto idóneo para la obtención de este biopolímero. Actualmente diversos investigadores han reportado contenidos de quitina en otros insectos con valores similares a los reportados en este estudio. Por citar algunos, Kaya y col. (2016d) reportaron contenidos de quitina (en base seca) en el insecto *Vespa crabro* (wasp) de 2.2, 6.2 y 10.3% en las etapas de larva, pupa y adulto, respectivamente; mientras que Zelencova y col. (2015) reportaron un contenido de quitina (también en base seca) de 8% en el insecto *Scolopendra singulata*. En otro estudio reciente, se reportó un contenido de quitina de  $\approx 10\%$  en el insecto conocido como chapulín gordinflón (*Brachystola magna* Girard) (Monter-Miranda y col., 2016). Todos estos estudios enfatizan la importancia que presentan los insectos como una factible fuente alternativa para la obtención de quitina, y en este aspecto *G. mellonella* y *T. molitor* representan dos insectos adecuados para el aislamiento de este biopolímero.

### 3.3 Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para determinar la factible aplicación de la quitina y quitosano es importante evaluar sus características morfológicas. Considerando las quitinas y quitosanos de ambas especies, se observaron aspectos morfológicos de superficie fibrosa en forma laminar y con espacios inter-laminares (Fig. 1), y los resultados del análisis elemental por espectroscopia de dispersión de energía acoplada al MEB indicaron la presencia de calcio y fósforo en cantidades menores al 0.5%, siendo estos los minerales residuales, lo cual coincide con la cuantificación de cenizas presentada en la Tabla 1. Las morfologías de las quitinas y quitosanos son similares a las reportadas en el insecto *Brachystola magna* (Girard) (Monter-Miranda y col., 2016). Sin embargo, son diferentes a las reportadas en los insectos *Peripleta americana*, *Melolontha melolontha* y crisálidas del gusado de seda *Bombix mori*, ya que estos presentaron una estructura porosa (Kaya y Baran, 2015; Kaya y col., 2014c; Paulino y col., 2006). En investigaciones recientes sobre el aislamiento de quitina de insectos se han observado diferencias morfológicas dependiendo de la especie, e incluso, dependiendo del estado de desarrollo del insecto (Kaya y col., 2016d; Ma y col., 2015; Zelencova y col., 2015).

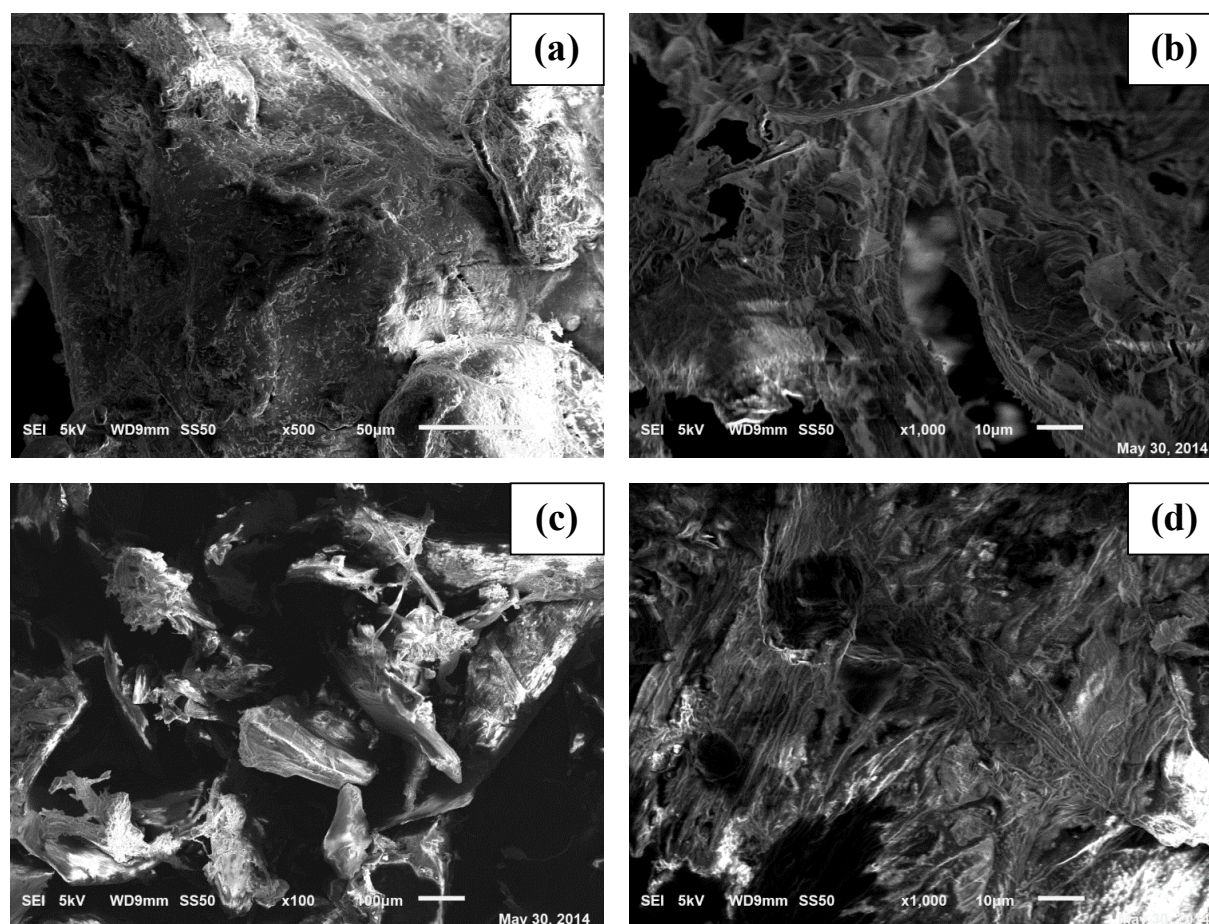


Fig. 1. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de las muestras de quitina de *T. molitor* (a), quitina de *G. mellonella* (b), quitosano de *T. molitor* (c) y quitosano de *G. mellonella* (d).

De acuerdo con Marei y col. (2016) existen cinco morfologías superficiales de quitina y quitosano, las cuales pueden considerarse de la siguiente manera: 1) morfología superficial rugosa y dura, sin poros y con presencia de nanofibras, 2) estructura de nano fibras solamente, 3) estructura de poros y nano fibras, 4) dos tipos de poros (de acuerdo al tamaño) con nanofibras y 5) solo poros. En relación a esta clasificación, la quitina de *T. molitor* y *G. mellonella* presentan las características de estructuras del tipo 3. El aspecto morfológico de estos biopolímeros es esencial para poder sugerir sus potenciales aplicaciones (Abdelmalek y col., 2017; Ahsan y col., 2017; Jayakumar y col., 2011). Por ejemplo Aranaz y col. (2009) sugirieron que las quitinas que presentan una estructura en forma de fibrillas se podrían utilizar en la industria de textiles; mientras que las estructuras de quitina con presencia

de poros son factibles para emplearse en la formación de membranas o películas para el transporte de fármacos y sustancias activas (Bhattarai y col., 2010; Li y col., 2011; Santos y col., 2008). Por tal razón, consideramos que las quitinas y los quitosanos de ambos insectos podrían utilizarse en la industrial textil y en la formación de membranas o películas activas.

### 3.4 Difracción de rayos X

Los resultados de difracción de rayos X para las quitinas extraídas de *G. mellonella* y *T. molitor* se presentan en la Fig. 2a. Como se aprecia, aunque las posiciones de los picos hayan variado ligeramente, se observan similitud entre los patrones de difracción de las quitinas de ambos insectos. Para el insecto *G. mellonella* los picos de mayor intensidad se observaron en  $2\theta = 9.48^\circ$  y  $19.24^\circ$  y los picos de

menor intensidad en  $2\theta = 12.84^\circ$ ,  $22.92^\circ$ ,  $26.36^\circ$  y  $39.08^\circ$ , y para el insecto *T. molitor*, los picos de mayor intensidad se observaron en  $2\theta = 9.32^\circ$  y  $19.4^\circ$  y los picos de menor intensidad en  $2\theta = 12.84^\circ$ ,  $23.24^\circ$ ,  $26.36^\circ$  y  $39.32^\circ$ . Estos resultados fueron similares a los reportados por Kaya y col. (2014b), en el cual no solo se observaron dos picos muy pronunciados (de mayor intensidad) y cinco picos de menor intensidad, sino también la ubicación variaba entre las diferentes especies de invertebrados acuáticos (cinco insectos y un crustáceo). Estos picos se observaron en un intervalo de  $2\theta = 9.24$ - $9.76^\circ$ ,  $12.38$ - $12.94^\circ$ ,  $19.48$ - $19.76^\circ$ ,  $20.82$ - $21.36^\circ$ ,  $23$ - $23.66^\circ$ ,  $26.48$ - $26.96^\circ$  y  $38.84$ - $39.52^\circ$ . Los dos picos de mayor intensidad que aparecen alrededor de  $2\theta \approx 9^\circ$  y  $\approx 19^\circ$  corresponden a los planos de difracción (020) y (110) de la red cristalina que caracteriza clásicamente a la conformación ortorrómbica de la  $\alpha$ -quitina.

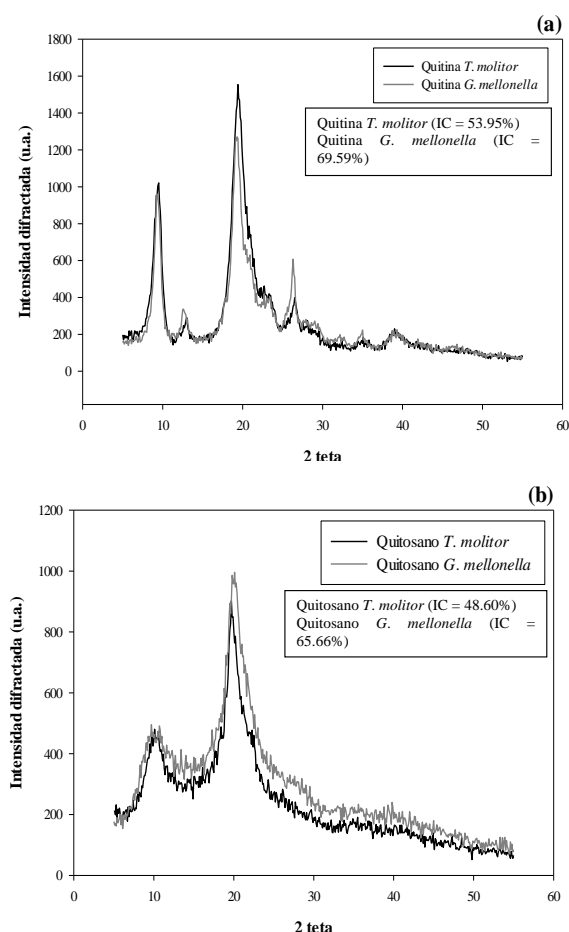


Fig. 2. Difractogramas de rayos X de las muestras de quitina (a) y quitosano (b) de *T. molitor* y *G. mellonella*. IC = Índice de cristalinidad (%).

Por tal razón, en base a los resultados obtenidos, podemos inferir que *T. molitor* y *G. mellonella* presentaron una estructura del tipo  $\alpha$ -quitina ya que exhibieron patrones de cristalinidad definidos e intensos, en tanto que las estructuras polimórficas de  $\beta$ -quitina se caracterizan por presentar picos anchos de cristalinidad a  $\approx 9.1^\circ$  y  $\approx 20.3^\circ$  en sus patrones de difracción (Jang y col., 2004; Sagheer y col., 2009). Los valores del índice de cristalinidad (IC) fueron mayores en los biopolímeros de *G. mellonella* (quitina = 69.59%; quitosano = 65.66%) en comparación con los de *T. molitor* (quitina = 53.95%; quitosano = 48.60%) (Fig. 2, datos indicados entre paréntesis). Estos valores son inferiores a los reportados en la quitina de especies pertenecientes al orden coleóptera, encontrándose un IC en las especies *A. bipustulatus*, *A. stercorosus*, *B. tibialis*, *C. aurata*, *H. parallella*, y *L. decemlineata* de 90.7%, 83.5%, 80.1%, 86.3%, 89.5% y 76%, respectivamente (Kaya y col., 2014a; Kaya y col., 2014b; Kaya y col., 2016c; Liu y col., 2012). Sin embargo, el IC de *G. mellonella* es similar a la especie *A. pandora* del orden lepidóptera, en el cual se determinó de 64% en las alas y 66% en las otras partes del cuerpo (que consiste en cabeza, tórax, y abdomen) (Kaya y col., 2015b). Las diferencias existentes en el IC entre las especies del presente estudio y otras investigaciones, pueden deberse a las diferentes fuentes de obtención, métodos de extracción y/o a la pureza de las quitinas (Kaya y Baran, 2015; Kaya y col., 2014c). En base a la fuente de obtención, en investigaciones previas han reportado una estrecha relación con el IC cuando los exoesqueletos insectiles presentan mayor dureza, de hecho, la quitina obtenida del orden coleóptera ha presentado mayor IC comparado con otros ordenes insectiles como Blattodea, Diptera, Hemiptera, Himenoptera y Odonada (Kaya y col., 2014b; Kaya y col., 2016c). En este estudio no encontramos esta relación, ya que aparentemente *G. mellonella* presentó un mayor IC que *T. molitor*. Esto podría explicarse en el sentido de que existen otros factores implicados en la dureza de la cutícula insectil, por ejemplo, Nation (2008) menciona que la dureza de la cutícula se asocia principalmente al grado esclerotización y los tipos de proteínas asociadas. Después del tratamiento de desacetilación se observó una disminución en el IC. También se observó la eliminación de los picos de menor intensidad observados en el patrón de difracción de la quitina de ambos insectos, resultando en el quitosano solo dos picos. Los picos se observaron a  $2\theta = 10.76^\circ$  y  $19.8^\circ$  en el quitosano de *T. molitor* y a  $10.08^\circ$  y  $20.14^\circ$  en



*G. mellonella* (Fig. 2b). La presencia de dos picos en el patrón de difracción en este estudio es similar a los procedentes de crustáceos, insectos y hongos (Erdogan y Kaya, 2016; Kaya y col., 2014a; Wang y col., 2008). El IC del quitosano de *G. mellonella* (65.66%) fue mayor que el de *T. molitor* (48.60%). Este último valor es similar a lo reportado en estudios previos en la abeja de la miel *A. mellifera* ( $\approx 49\%$ ) y ligeramente menor en los reportados en camarón *P. monodon* ( $\approx 61\%$ ), y en la langosta del desierto *S. gregaria* ( $\approx 69\%$ ) y el escarabajo *C. rugosa* ( $\approx 59\%$ ) (Marei y col., 2016). De igual manera, la tendencia del presente estudio se asemeja a los determinados por Abdou y col. (2008) en diferentes especies de crustáceos (cáscaras de camarón rosa, conchas de cangrejo, plumas de sepia, plumas de calamar, y conchas de cigala), estos autores observaron que el proceso de desacetilación de la quitina para obtener quitosano promovió una disminución del IC de 70.82-56.94% a 48.9-36.43%. Las diferencias entre los valores del presente estudio y lo reportado en la literatura pueden atribuirse a la fuente de obtención y a las condiciones del proceso de desacetilación. No obstante, en estudios previos han observado una correlación entre el aumento del GD y la disminución en el IC (Soon y col., 2018; Zhang y col., 2005), por lo que esto podría explicar la diferencia entre ambos insectos, ya que *T. molitor* presentó un mayor GD y por lo tanto, durante la obtención de quitosano fue mayor la hidrólisis de los enlaces glicosídicos y grupos acetamida (Sajomsang y Gonil, 2010). La evaluación del grado o índice de cristalinidad es importante para identificar su posible aplicación en diversas áreas (Aranaz y col., 2009).

### 3.5 Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

En la Fig. 3 se observan los espectros de FTIR de las muestras de quitina (Fig. 3a) y quitosano (Fig. 3b) de *T. molitor* y *G. mellonella* y su comparación con sus respectivos controles. Con respecto a las quitinas, se observó similitud entre las muestras de los insectos y la quitina control. Como es conocido, la quitina en la naturaleza existe en tres tipos de formas cristalinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ), y mediante la técnica de FTIR es posible identificar estas estructuras cristalinas. En la conformación  $\beta$  se han identificado dos bandas alrededor de los números de onda ( $1/\lambda$ ) en  $1660\text{ cm}^{-1}$  (amida I) y  $1560\text{ cm}^{-1}$  (amida II, flexión N-H y estiramiento C-N); mientras que en la conformación tipo  $\alpha$  se presentan tres bandas en ( $1/\lambda$ ) = 1660, 1620 y  $1560\text{ cm}^{-1}$ , esto es debido a la división de

la banda amida I (Lavall y col., 2007). Estas señales se registraron en ( $1/\lambda$ ) = 1651, 1622 y  $1551\text{ cm}^{-1}$  para la quitina de *G. mellonella*; y 1650, 1622 y  $1552\text{ cm}^{-1}$  para *T. molitor*, y finalmente en 1649, 1622 y  $1552\text{ cm}^{-1}$  para la quitina comercial. Por lo anterior y en relación con los estudios de difracción de rayos X, se puede inferir que la quitina de *T. molitor* y *G. mellonella* presentaron una conformación tipo  $\alpha$  ya que se observaron las bandas características anteriormente mencionados. La presencia de la banda en  $\approx 1660\text{ cm}^{-1}$  se atribuye a la presencia del enlace de hidrógeno intermolecular  $\text{CO} \cdots \text{HN}$ ; la banda localizada en  $\approx 1620\text{ cm}^{-1}$  se debe a la presencia del enlace de hidrógeno intermolecular en el grupo funcional  $\text{CO} \cdots \text{HOCH}_2$  y la banda en ( $1/\lambda$ ) =  $1560\text{ cm}^{-1}$  se debió a la flexión N-H y estiramiento C-N (Kumari y col., 2017).

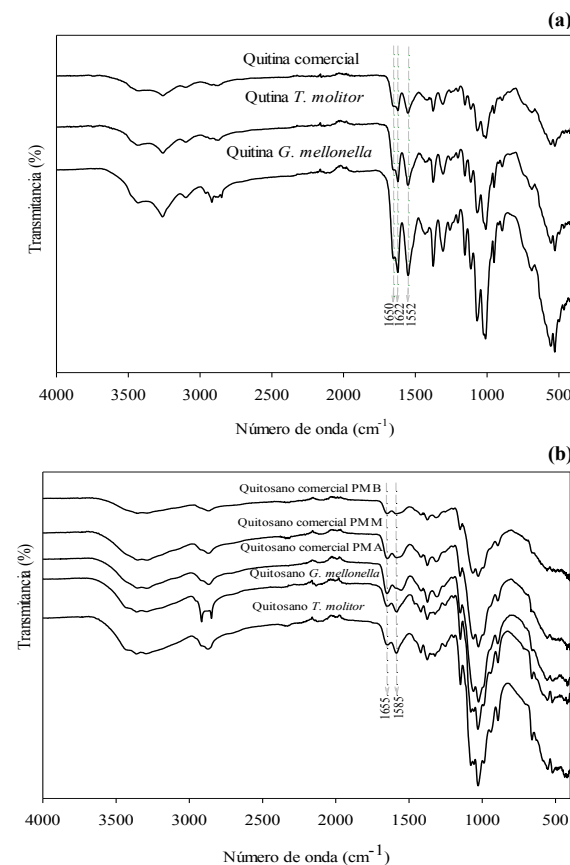


Fig. 3. Imágenes de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier de las muestras de quitina (a) y quitosano (b) de *T. molitor* y *G. mellonella* y comparación con sus respectivos controles. Las nomenclaturas para los quitosanos comerciales son: PMB = Peso molecular bajo, PMM = Peso molecular medio, PMA = Peso molecular alto.



No obstante, las señales encontradas en el presente estudio nos confirman que la quitina también presenta estructuras amorfas, ya que estudios realizados por Paulino y col. (2006) observaron que las quitinas en estado cristalino presentan un solo pico en  $(1/\lambda) \approx 1620 \text{ cm}^{-1}$  e infirieron que posiblemente la presencia de las bandas en  $\approx 1620$  y  $1660 \text{ cm}^{-1}$  se debía a estructuras del tipo amorfo. Por otra parte, los espectros de las quitinas de ambos insectos y comercial no mostraron la banda localizada en  $(1/\lambda) = 1540 \text{ cm}^{-1}$ , el cual está relacionado con la vibración y estiramiento de las proteínas, lo que indicó que estos biopolímeros son de calidad, ya que no presentaron cantidades significativas de proteínas (Majtán y col., 2007). En general, las bandas del espectro de FTIR de las quitinas en este estudio fueron similares a las bandas de  $\alpha$ -quitinas recientemente reportadas en especies del orden ortóptera (Kaya y col., 2015c; Kaya y col., 2015d).

Debido a la desacetilación de la quitina se causó la desaparición de las tres bandas con la consecuente generación de dos bandas nuevos (señales) en el quitosano (Fig. 3b). Estos se localizaron en  $(1/\lambda) = 1649$  y  $1586 \text{ cm}^{-1}$  para *G. mellonella* y en  $1622$  y  $1552 \text{ cm}^{-1}$  para *T. molitor*. Las bandas fueron similares al quitosano comercial de peso molecular bajo ( $1649$  y  $1585 \text{ cm}^{-1}$ ), medio ( $1647$  y  $1583 \text{ cm}^{-1}$ ) y alto ( $1648$  y  $1554 \text{ cm}^{-1}$ ). En la literatura científica se menciona que son bandas típicas del quitosano, en el cual, la señal localizada alrededor de  $\approx 1650 \text{ cm}^{-1}$  corresponde a  $\nu$  (C=O) en el grupo  $\text{NHCOCH}_3$  (señal de amida I), la banda  $\approx 1590 \text{ cm}^{-1}$  es debido a  $\nu$  ( $\text{NH}_2$ ) en el grupo  $\text{NHCOCH}_3$  (señal de amida II) (Kaya y col., 2015a). Estas bandas son similares a los quitosanos de los insectos *C. barbarus*, *D. oedaleus*, *M. gibbosus*, y al quitosano comercial recientemente reportados (Kaya y col., 2016b; Kaya y col., 2015a). En general, los espectros de las quitinas y quitosano de ambos insectos fueron similares a los comerciales, y estos presentaron valores cercanos entre sí, lo que se debió a la eficiencia de los métodos de obtención empleados en el aislamiento y purificación de estos biopolímeros.

## Conclusiones

El contenido de nitrógeno, humedad y cenizas de la quitina y quitosano de ambos insectos indicaron una calidad aceptable de estos biopolímeros. El análisis de microscopia electrónica de barrido mostró estructuras

en forma de fibras en la quitina y quitosano de *T. molitor*, mientras que en *G. mellonella* fueron de tipo esponjoso. Los resultados de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier y difracción de rayos X confirmaron que la quitina de ambos insectos presentó un polimorfismo tipo  $\alpha$ . El proceso de desacetilación disminuyó considerablemente el peso molecular y porcentaje de cristalinidad en los quitosanos insectiles. Las quitinas y quitosanos de ambos insectos presentaron similitudes en el peso molecular; sin embargo, *T. molitor* presentó un mayor grado de desacetilación y un menor porcentaje de cristalinidad que *G. mellonella*. Particularmente, *T. molitor* resultó conveniente en términos de fuente alternativa de quitina, ya que no solo fue sobresaliente su mayor rendimiento a partir de la harina, sino también la aportación de cada individuo (insecto) por su mayor tamaño y peso.

## Agradecimientos

AIISM agradece el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para cursar el Doctorado en Ciencias de los Alimentos dentro del Programa de Doctorado del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), A.C. Se agradece también al grupo de trabajo conformado para la obtención de las muestras. El presente estudio es producto del Grupo de Investigación (GI) en Carbohidratos, Empaques y Alimentos Funcionales (CEAF) del CIAD-Cuauhtémoc liderado por el Dr. Paul Baruk Zamudio-Flores.

## Nomenclatura

GA	Grado de acetilación
GD	Grado de desacetilación
PMB	Peso molecular bajo
PMM	Peso molecular medio
PMA	Peso molecular alto
IC	Índice de cristalinidad
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier

## Referencias

- Abdelmalek, B. E., Sila, A., Haddar, A., Bougatef, A. y Ayadi, M. A. (2017). b-Chitin and chitosan from squid gladius: Biological activities of

- chitosan and its application as clarifying agent for apple juice. *International Journal of Biological Macromolecules* 104, 953-962.
- Abdou, E. S., Nagy, K. S. y Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology* 99, 1359-1367.
- Ahsan, S. M., Thomas, M., Reddy, K. K., Sooraparaju, S. G., Asthana, A. y Bhatnagar, I. (2017). Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules* 110, 97-109.
- Amador-Mendoza, A., Huerta-Ochoa, S., Herman-Lara, E., Membrillo-Venegas, I., A. Aguirre Cruz, A., M.A. Vivar Vera, M. A. y Ramírez-Coutiño, L. (2016). Efecto de la purificación química, biológica y física en la recuperación de quitina de exoesqueletos de camarón (*Penaeus* sp) y chapulín (*Sphenarium purpurascens*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 711-725.
- Anderson, D. L. (1990). Pests and pathogens of the honeybee (*Apis mellifera* L.) in Fiji. *Journal of Apicultural Research* 29, 53-59.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. y Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology* 3, 203-230.
- Bhattarai, N., Gunn, J. y Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62, 83-99.
- Boff, M. I., Wiegers, G. L., Gerritsen, L. J. y Smits, P. H. (2000). Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. *Nematology* 2, 303-308.
- Cárdenas, G., Cabrera, G., Taboada, E. y Miranda, S. P. (2004). Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and <sup>13</sup>C cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science* 93, 1876-1885.
- Chávez-Magdaleno, M. E., Luque-Alcaraz, A. G., Gutiérrez-Martínez, P., Cortez-Rocha, M. O., Burgos-Hernández, A., Lizardi-Mendoza, J. y Plascencia-Jatomea, M. (2018). Effect of chitosan-pepper tree (*Schinus molle*) essential oil biocomposites on the growth kinetics, viability and membrane integrity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 17, 29-45.
- Christen, J., Campbell, J., Lewis, E., Shapiro-Ilan, D. y Ramaswamy, S. (2007). Responses of the entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* to its insect hosts, *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor*. *Parasitology* 134, 889-898.
- Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P. y Canale, A. (2009). Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *Journal of Stored Products Research* 45, 125-132.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. y Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science* 36, 981-1014.
- de Alvarenga, E. S. (2011). Characterization and properties of chitosan. En: *Biotechnology of Biopolymers*, Pp., InTech.
- de la Paz, N., Fernández, M., López, O. D., Nogueira, A., García, C. M., Pérez, D., Tobella, J., Montes, Y. y Díaz, D. (2012). Optimización del proceso de obtención de quitosano derivada de la quitina de langosta. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 13, 103-116.
- Elieh-Ali-Komi, D. y Hamblin, M. R. (2016). Chitin and chitosan: production and application of versatile biomedical nanomaterials. *International Journal of Advanced Research* 4, 411.
- Erdogan, S. y Kaya, M. (2016). High similarity in physicochemical properties of chitin and chitosan from nymphs and adults of a grasshopper. *International Journal of Biological Macromolecules* 89, 118-126.
- Finke, M. D. (2007). Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology* 26, 105-115.
- Finke, M.D. y Oonincx, D.G.A.B. (2014). Insects as food for insectivores. (Rojas, M.G. y

- Shapiro-Ilan, D. Eds.). En: *Mass Production of Beneficial Organisms*, Pp. 583-616. Academic Press, San Diego.
- Finke, M.D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology* 21, 269-285.
- Finke, M.D. (2013). Complete nutrient content of four species of feeder insects. *Zoo Biology* 32, 27-36.
- Gocho, H., Shimizu, H., Tanioka, A., Chou, T.-J. y Nakajima, T. (2000). Effect of polymer chain end on sorption isotherm of water by chitosan. *Carbohydrate Polymers* 41, 87-90.
- Hajji, S., Younes, I., Ghorbel-Bellaaj, O., Hajji, R., Rinaudo, M., Nasri, M. y Jellouli, K. (2014). Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules* 65, 298-306.
- Hamdi, M., Hammami, A., Hajji, S., Jridi, M., Nasri, M. y Nasri, R. (2017). Chitin extraction from blue crab (*Portunus segnis*) and shrimp (*Penaeus kerathurus*) shells using digestive alkaline proteases from *P. segnis* viscera. *International Journal of Biological Macromolecules* 101, 455-463.
- Hamed, I., Özogul, F. y Regenstein, J. M. (2016). Industrial applications of crustacean by-products (chitin, chitosan, and chitooligosaccharides): A review. *Trends in Food Science & Technology* 48, 40-50.
- Ibitoye, E., Lokman, I., Hezmee, M., Goh, Y., Zuki, A. y Jimoh, A. (2018). Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan isolated from house cricket. *Biomedical Materials* 13, 025009.
- Islem, Y. y Marguerite, R. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs* 13, 1133-1174.
- Jang, M. K., Kong, B. G., Jeong, Y. I., Lee, C. H. y Nah, J. W. (2004). Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 42, 3423-3432.
- Jayakumar, R., Prabakaran, M., Kumar, P. S., Nair, S. y Tamura, H. (2011). Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances* 29, 322-337.
- Kaya, M., Akyuz, B., Bulut, E., Sargin, I., Eroglu, F. y Tan, G. (2016a). Chitosan nanofiber production from *Drosophila* by electrospinning. *International Journal of Biological Macromolecules* 92, 49-55.
- Kaya, M., Asan-Ozusaglam, M. y Erdogan, S. (2016b). Comparison of antimicrobial activities of newly obtained low molecular weight scorpion chitosan and medium molecular weight commercial chitosan. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 121, 678-684.
- Kaya, M. y Baran, T. (2015). Description of a new surface morphology for chitin extracted from wings of cockroach (*Periplaneta americana*). *International Journal of Biological Macromolecules* 75, 7-12.
- Kaya, M., Baran, T., Asan-Ozusaglam, M., Cakmak, Y. S., Tozak, K. O., Mol, A., Montes, A. y Sezen, G. (2015a). Extraction and characterization of chitin and chitosan with antimicrobial and antioxidant activities from cosmopolitan Orthoptera species (Insecta). *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 20, 168-179.
- Kaya, M., Baran, T., Erdoğan, S., Menteş, A., Özüsağlam, M. A. y Çakmak, Y. S. (2014a). Physicochemical comparison of chitin and chitosan obtained from larvae and adult Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Materials Science and Engineering: C* 45, 72-81.
- Kaya, M., Baran, T., Montes, A., Asaroglu, M., Sezen, G. y Tozak, K. O. (2014b). Extraction and characterization of  $\alpha$ -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates. *Food Biophysics* 9, 145-157.
- Kaya, M., Baublys, V., Can, E., Šatkauskienė, I., Bitim, B., Tubelytė, V. y Baran, T. (2014c). Comparison of physicochemical properties of chitins isolated from an insect (*Melolontha melolontha*) and a crustacean species (*Oniscus asellus*). *Zoomorphology* 133, 285-293.

- Kaya, M., Baublys, V., Sargin, I., Šatkauskienė, I., Paulauskas, A., Akyuz, B., Bulut, E., Tubelytė, V., Baran, T. y Seyyar, O. (2016c). How taxonomic relations affect the physicochemical properties of chitin. *Food Biophysics* 11, 10-19.
- Kaya, M., Bitim, B., Mujtaba, M. y Koyuncu, T. (2015b). Surface morphology of chitin highly related with the isolated body part of butterfly (*Argynnis pandora*). *International Journal of Biological Macromolecules* 81, 443-449.
- Kaya, M., Erdogan, S., Mol, A. y Baran, T. (2015c). Comparison of chitin structures isolated from seven Orthoptera species. *International Journal of Biological Macromolecules* 72, 797-805.
- Kaya, M., Lelešius, E., Nagrockaitė, R., Sargin, I., Arslan, G., Mol, A., Baran, T., Can, E. y Bitim, B. (2015d). Differentiations of chitin content and surface morphologies of chitins extracted from male and female grasshopper species. *Plos One* 10, e0115531.
- Kaya, M., Sofi, K., Sargin, I. y Mujtaba, M. (2016d). Changes in physicochemical properties of chitin at developmental stages (larvae, pupa and adult) of *Vespa crabro* (wasp). *Carbohydrate polymers* 145, 64-70.
- Khan, T. A., Peh, K. K. y Ch'ng, H. S. (2002). Reporting degree of deacetylation values of chitosan: the influence of analytical methods. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5, 205-212.
- King, C., Shamshina, J. L., Gurau, G., Berton, P., Khan, N. F. A. F. y Rogers, R. D. (2017). A platform for more sustainable chitin films from an ionic liquid process. *Green Chemistry* 19, 117-126.
- Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H. y Kadak, A. E. (2011). Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry* 126, 1144-1148.
- Kumari, S., Annamareddy, S. H. K., Abanti, S. y Rath, P. K. (2017). Physicochemical properties and characterization of chitosan synthesized from fish scales, crab and shrimp shells. *International Journal of Biological Macromolecules* 104, 1697-1705.
- Lavall, R. L., Assis, O. B. y Campana-Filho, S. P. (2007).  $\beta$ -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. *Bioresource Technology* 98, 2465-2472.
- Li, Q., Dunn, E., Grandmaison, E. y Goosen, M. F. (1992). Applications and properties of chitosan. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers* 7, 370-397.
- Li, X., Nan, K., Chen, H. y Xu, Y. (2011). Preparation and characterization of chitosan nanopores membranes for the transport of drugs. *International Journal of Pharmaceutics* 420, 371-377.
- Liu, S., Sun, J., Yu, L., Zhang, C., Bi, J., Zhu, F., Qu, M., Jiang, C. y Yang, Q. (2012). Extraction and characterization of chitin from the beetle *Holotrichia parallela* motschulsky. *Molecules* 17, 4604-4611.
- Ma, J., Xin, C. y Tan, C. (2015). Preparation, physicochemical and pharmaceutical characterization of chitosan from *Catharsius molossus* residue. *International Journal of Biological Macromolecules* 80, 547-556.
- Majtán, J., Bíliková, K., Markovič, O., Gróf, J., Kogan, G. y Šimúth, J. (2007). Isolation and characterization of chitin from bumblebee (*Bombus terrestris*). *International Journal of Biological Macromolecules* 40, 237-241.
- Marei, N. H., El-Samie, E. A., Salah, T., Saad, G. R. y Elwahy, A. H. (2016). Isolation and characterization of chitosan from different local insects in Egypt. *International Journal of Biological Macromolecules* 82, 871-877.
- Mohamed, M. y Coppel, H. (1983). Mass rearing of the greater wax moth, *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae), for small-scale laboratory studies. *Great Lakes Entomology* 16, 139-141.
- Monter-Miranda, J., Tirado-Gallegos, J., Zamudio-Flores, P., Rios-Velasco, C., Ornelas-Paz, J. d. J., Salgado-Delgado, R., Espinosa-Solis, V. y Hernández-Centeno, F. (2016). Extracción y caracterización de propiedades físicoquímicas, morfológicas y estructurales de quitina y quitosano de *Brachystola magna* (Girard). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 749-761.



- Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., Arakane, Y. y Yang, Q. (2016). Chitin metabolic pathways in insects and their regulation. En: *Extracellular Composite Matrices in Arthropods*, Pp. 31-65. Springer.
- Nation, J. L. (2008). *Insect Physiology and Biochemistry*. CRC Press.
- Nemtsev, S., Zueva, O. Y., Khismatullin, M., Albulov, A. y Varlamov, V. (2004). Isolation of chitin and chitosan from honeybees. *Applied Biochemistry and Microbiology* 40, 39-43.
- Nessa, F., Masum, S. M., Asaduzzaman, M., Roy, S., Hossain, M. y Jahan, M. (2010). A process for the preparation of chitin and chitosan from prawn shell waste. *Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research* 45, 323-330.
- Oduor, P., Struszczyk, M. H. y Peter, M. G. (2008). Characterisation of chitosan from blowfly larvae and some crustacean species from Kenyan marine waters prepared under different conditions. *Discovery and Innovation* 20, 129-136.
- Paulino, A. T., Simionato, J. I., Garcia, J. C. y Nozaki, J. (2006). Characterization of chitosan and chitin produced from silkworm crysalides. *Carbohydrate Polymers* 64, 98-103.
- Pérez-Escobedo, A., Díaz-Flores, P. E., Rangel-Méndez, J. R., Cerino-Cordova, F. J., Ovando-Medina, V. M. y Alcalá-Jáuregui, J. A. (2016). Fluoride adsorption capacity of composites based on chitosan-zeolite-algae. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 15, 139-147.
- Poeloengasih, C. D., Hernawan, H. y Angwar, M. (2010). Isolation and characterization of chitin and chitosan prepared under various processing times. *Indonesian Journal of Chemistry* 8, 189-192.
- Ramos-Elorduy, B. J., Pino, M. J. M. y Martínez, C. V. H. (2012). Could grasshoppers be a nutritive meal? *Food and Nutrition Sciences* 3, 164.
- Ramos-Elorduy, J., Pino, J. y Morales de León, J. (2002). Análisis químico proximal, vitaminas y nutrimentos inorgánicos de insectos consumidos en el estado de Hidalgo, México. *Folia Entomologica Mexicana* 41, 15-29.
- Rødde, R. H., Einbu, A. y Vårum, K. M. (2008). A seasonal study of the chemical composition and chitin quality of shrimp shells obtained from northern shrimp (*Pandalus borealis*). *Carbohydrate Polymers* 71, 388-393.
- Sagheer, F. A. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S. y Elsabee, M. Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers* 77, 410-419.
- Sajomsang, W. y Gonil, P. (2010). Preparation and characterization of  $\alpha$ -chitin from cicada sloughs. *Materials Science and Engineering: C* 30, 357-363.
- Salazar-Leyva, J. A., Lizardi-Mendoza, J., Ramírez-Suarez, J. C., García-Sánchez, G., Ezquerra-Brauer, J. M., Valenzuela-Soto, E. M., Carvallo-Ruiz, M. G., Lugo-Sánchez, M. E. y Pacheco-Aguilar, R. (2014). Utilización de materiales a base de quitina y quitosano en la inmovilización de proteasas: efectos en su estabilización y aplicaciones. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 13, 129-150.
- Santos, D., Neto, C., Fonseca, J. y Pereira, M. (2008). Chitosan macroporous asymmetric membranes—Preparation, characterization and transport of drugs. *Journal of Membrane Science* 325, 362-370.
- Soon, C. Y., Tee, Y. B., Tan, C. H., Rosnita, A. T. y Khalina, A. (2018). Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. *International Journal of Biological Macromolecules* 108, 135-142.
- Studier, E. H. y Seavick, S. H. (1992). Live mass, water content, nitrogen and mineral levels in some insects from south-central lower Michigan.
- Swain, S., Dey, R., Islam, M., Patel, R., Jha, U., Patnaik, T. y Airoldi, C. (2009). Removal of fluoride from aqueous solution using aluminum-impregnated chitosan biopolymer. *Separation Science and Technology* 44, 2096-2116.
- Synowiecki, J. y Al-Khateeb, N. A. (2003). Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives.

- Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 145-171.
- Tharanathan, R. N. y Kittur, F. S. (2003). Chitin—the undisputed biomolecule of great potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43, 61-87.
- Van Zyl, C. y Malan, A. (2015). Cost-effective culturing of *Galleria mellonella* and *Tenebrio molitor* and entomopathogenic nematode production in various hosts. *African Entomology* 23, 361-375.
- Vázquez, J.A., Noriega, D., Ramos, P., Valcarcel, J., Novoa-Carballal, R., Pastrana, L., Reis, R.L. y Pérez-Martín, R.I. (2017). Optimization of high purity chitin and chitosan production from *Illex argentinus* pens by a combination of enzymatic and chemical processes. *Carbohydrate Polymers* 174, 262-272.
- Walpole, R., Myers, R. y Myers, S. (1999). *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*. Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A., México, 1999.
- Wang, W., Du, Y., Qiu, Y., Wang, X., Hu, Y., Yang, J., Cai, J. y Kennedy, J. F. (2008). A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers* 74, 127-132.
- Weska, R., Moura, J.M.D., Batista, L.D.M., Rizzi, J. y Pinto, L.A.D.A. (2007). Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 80, 749-753.
- Xie, M., Hu, B., Yan, Y., Zhou, L., Ou, S. y Zeng, X. (2016). Rheological properties of gallic acid-grafted-chitosans with different substitution degrees. *LWT-Food Science and Technology* 74, 472-479.
- Xu, Y., Kim, K.M., Hanna, M.A. y Nag, D. (2005). Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products* 21, 185-192.
- Younes, I. y Rinaudo, M. (2015). Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs* 13, 1133-1174.
- Zelencova, L., Erdoğan, S., Baran, T. y Kaya, M. (2015). Chitin extraction and chitosan production from Chilopoda (*Scolopendra cingulata*) with identification of physicochemical properties. *Polymer Science Series A* 57, 437-444.
- Zhang, Y., Xue, C., Xue, Y., Gao, R. y Zhang, X. (2005). Determination of the degree of deacetylation of chitin and chitosan by X-ray powder diffraction. *Carbohydrate research* 340, 1914-1917.