

Fermentación ácido-láctica de los puparios de la Mosca Mexicana de la Fruta *Anastrepha ludens* (Loew) para la obtención de quitina y coproductos

TESIS PARA TITULACIÓN INTEGRAL

Ingeniera en Bioquímica

Egresado:

Lizzeth Alejandra Keb Fernandez

Comité tutorial:

- Dirección: Dra. Neith Aracely López Pacheco
- Codirección externa: M.C. Héctor Alberto Martín López
- Codirección interna: Dr. Mario Adrián De Atocha Dzul Cervantes
- Asesor externo: Dra. Soledad Cecilia Pech Cohuo

Calkiní, Campeche, México 2025



Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Subdirección de Planeación y Desarrollo

Instituto Tecnológico Superior de Calkiní
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante

Calkiní, Campeche 45727
P/03/25/733
INGENIERÍA BIOQUÍMICA

CONSTANCIA DE NO INCONVENIENCIA

MODALIDAD: TESIS

C. LIZZETH ALEJANDRA KEB FERNANDEZ 7354
PASANTE DE LA CARRERA DE
INGENIERÍA BIOQUÍMICA.
PRESENTE

Con relación a lo establecido en el Reglamento de Estudios de Licenciatura, capítulo VII, fracción I, vigente en este Instituto, y una vez emitido el fallo favorable por el director DRA. NEITH ARACELY LÓPEZ PACHECO, CO-DIRECTOR MC. HÉCTOR ALBERTO MARTÍN LÓPEZ, y el co-director DR. MARIO ADRIÁN DE ATOCHA DZUL CERVANTES, respectivamente, este Instituto consta de no tener inconveniencia para la realización del acto protocolario de titulación integral de su trabajo profesional titulado: **"FERMENTACIÓN ÁCIDO-LÁCTICA DE LOS PUPARIOS DE LA MOSCA MEXICANA DE LA FRUTA ANAS-TREPHA LUDENS (LOEW) PARA LA OBTENCIÓN DE QUITINA Y COPRODUCTOS"**.

ATENTAMENTE

Excelencia en Educación Tecnológica®
Sabiduría, Fortaleza de Nuestra Cultura®



INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR
DE CALKINÍ

DEPARTAMENTO DE ADMINISTRACIÓN
ESCOLAR Y APOYO A
ESTUDIANTES

CLAVE: 04MSU0013P
CALKINÍ, CAMPECHE, MÉXICO.

Dr. Jorge Alfonso Hau Puc.
Departamento de Administración y
Apoyo al Estudiante.

C.c.p. Archivo



2025
Año de
La Mujer
Indígena

Av. Ah Canul S/N por Carretera Federal, Calkiní, Campeche,
C.P. 24900 Tel. 996-8134870,
e-mail: se_dcalkini@tecnm.mx | itescam.edu.mx



RESUMEN

La quitina es un biopolímero biodegradable muy abundante en la naturaleza, que se obtiene principalmente de los exoesqueletos de los crustáceos por el método químico, basado en reacciones ácidos y bases (NaOH y HCl), sus múltiples aplicaciones radican en un sin fin de industrias como la acuícola para la creación de floculante en el tratamiento de aguas residuales; hasta en la agricultura en el control de enfermedades y plagas vegetales. Pero en la mayoría de los casos este representa un gran costo ambiental, un menor rendimiento de extracción y un peso molecular bajo del material que se obtiene. Se han evaluado fuentes no convencionales como los insectos debido a su contenido de quitina en su exoesqueleto, la mosca mexicana de la fruta supone una alternativa viable para la obtención de quitina. Además, los métodos químicos convencionales generan residuos contaminantes que conlleva a la búsqueda de mejores alternativas de extracción como la fermentación, un método viable, económico y ecológico para extraer quitina de alta calidad, además de la recuperación de proteínas y otros derivados. En este proyecto, se aplicó un enfoque biotecnológico para extraer quitina de alternativas nuevas tales como los puparios de la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) por fermentación ácido-láctica con la cepa de *Lactiplantibacillus plantarum* y *Enterococcus Faecium*. El proceso incluyó desde el acondicionamiento del material, la caracterización proximal de los materiales, se evaluaron procesos de desmineralización, desproteínización, y se determinaron los rendimientos. Las quitinas obtenidas se caracterizaron en cuanto a su conformación proximal y se midió el color mediante la escala CieLab. El rendimiento del proceso se centró entre el 58.36% y el 62.01%, Estos resultados fueron significativamente mayores en comparación con lo obtenido en el método químico convencional de 32.75% y el 39.97%, lo que evidencia que la extracción de quitina por fermentación es más sostenible y eficiente que el método químico. La humedad del material oscilo entre 4.63-6.03%, con 0.58-1.5% de cenizas y un grado de desmineralización entre el 91.99-96.83%.

DEDICATORIA

A mi madre Teresa, que ha sido el fundamento de mi vida y mi más grande impulso. Su amor y apoyo incondicional han sido como los enlaces que mantienen unidas las moléculas, creando la estabilidad necesaria para enfrentar cada desafío.

A mis hermanos Jorge y Joavanna, ustedes han sido un pilar en mi vida. Recuerdo las noches de estudio y los momentos de alegría compartidos, que me han nutrido y motivado en cada etapa. Su apoyo ha sido el catalizador que ha impulsado mi crecimiento y desarrollo. Este logro es tan suyo como mío, y quiero que sepan cuánto aprecio todo lo que han hecho por mí.

A mi padre Luis, que, en cada paso de este viaje académico, sentí su presencia guiándome desde el cielo como una constante en una reacción química. Aunque ya no estás a mi lado, vives en cada célula de mi ser.

A mis amigos Erika, Carlos, Yajaira, Anahí y Gelmy, los verdaderos microorganismos de mi vida, que han proliferado en risas y aprendizajes a lo largo de este viaje. Ustedes son el medio de cultivo que ha permitido florecer mis ideas, gracias por ser mis compañeros de laboratorio y por recordarme que, aunque pequeños, los detalles son lo que hacen la diferencia.

Gracias por estar siempre a mi lado, brindándome fuerza y confianza en cada desafío.

Con todo mi cariño y gratitud,

Lizzeth.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer de todo corazón al MC. Héctor Martín López y a la Dr. Neith Pacheco López, mi co-asesor y directora, por su incansable apoyo, por sus sabias orientaciones y, sobre todo, por su PACIENCIA. Gracias por confiar en mí y por guiarme con tanto esmero en cada paso de este proceso. Su conocimiento y dedicación han sido claves para el desarrollo de este trabajo.

A mi asesor el Dr. Mario Adrián De Atocha Dzúl Cervantes Le agradezco por sus valiosas aportaciones y por su disposición para ayudarme en todo momento, siempre brindándome su tiempo y sabiduría.

*Mi sincero agradecimiento también al **CIATEJ** (Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.) subsede sureste, pero en especial al laboratorio de inocuidad y trazabilidad alimentaria (LITAS) por brindarme un espacio de trabajo adecuado, con todos los recursos necesarios para desarrollar mi investigación de manera eficiente. Las instalaciones y equipos del CIATEJ fueron fundamentales para el desarrollo de este proyecto, permitiéndome el acceso a la tecnología y el conocimiento de vanguardia necesarios para avanzar en mis objetivos.*

*A **Gelmy Chan** y **Noemi Briseño** por su amistad, por el ambiente de colaboración que creamos juntos y por las horas de trabajo compartidas que hicieron este camino mucho más llevadero y enriquecedor.*

A mi familia, por su amor incondicional, por su apoyo constante, y por siempre estar a mi lado, animándome a seguir adelante, incluso en los momentos más difíciles. Gracias por su comprensión y por brindarme todo lo que necesito para ser mejor cada día.

A todas y cada una de estas personas, les doy las gracias desde el corazón. Este logro no sería posible sin su presencia y su apoyo.

Lizzeth

Índice

RESUMEN	- 1 -
DEDICATORIA	- 2 -
AGRADECIMIENTOS	- 3 -
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES O MARCO TEÓRICO.....	3
1.1 La quitina	3
1.2 Fuentes de quitina comercial	5
1.3 Fuentes alternas de quitina.....	6
1.4 La mosca mexicana de la fruta.....	8
1.5 Métodos de obtención de quitina	10
1.5.1 Extracción química convencional:	10
1.5.2 Extracción asistida por ultrasonido:	10
1.5.3 Extracción asistida por microondas:	11
1.5.4 Extracción por fluido super critico:	11
1.5.5 Extracción enzimática:	12
1.6 Método biotecnológico	12
1.6.1 Fermentación ácido-láctica:	12
1.7 Bacterias ácido-lácticas.....	13
1.8 Ácido γ -aminobutírico (GABA)	14
1.9 Lactiplantibacillus plantarum.....	15
1.10 Enterococcus faecium	16
JUSTIFICACIÓN	17
HIPÓTESIS.....	18

OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	19
2 MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	20
2.1 Caracterización proximal de las muestras.....	20
2.1.1 Determinación del contenido de humedad.....	20
2.1.2 Determinación del contenido de cenizas.....	21
2.1.3 Determinación del contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl	21
2.2 Fermentación ácido-láctica	21
2.3 Cinética de Crecimiento de las Bacterias Ácido-lácticas y autóctonas durante la fermentación de los puparios	23
2.4 Extracción química convencional	23
2.5 Determinación del color.....	24
2.6 Determinación del contenido de ácido láctico mediante acidez total titulable (ATT) .	24
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1 Contenido de humedad y minerales de los puparios.....	25
3.2 Determinación del contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl, grasa y fibra.	25
3.3 Comportamiento del pH durante la fermentación ácido-láctica	26
3.4 Producción de ácido durante la fermentación ácido-láctica medido por ATT	27
3.5 Contenido de humedad, cenizas y grado de desmineralización de la quitina obtenida por fermentación ácido-láctica	28
3.6 Determinación de color de los materiales con y sin pigmento y de las quitinas obtenidas por fermentación ácido-láctico	29
3.7 Cinética de Crecimiento de las Bacterias del Ácido Lácticas durante la fermentación	31
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	37

Índice de figuras:

Figura 1. Estructuras Cristalinas de la Quitina (Koc-Bilican & Çakmak, 2024).....	3
Figura 2: Estructura química de la quitina (Páez et al., 2012).....	4
Figura 3 Mosca mexicana de la fruta adulta (José Loera, 2017).	8
Figura 4: Mosca mexicana de la fruta adulta (José Loera, 2017).....	9
Figura 5 Estructura química del ácido gamma-aminobutírico (Páez et al., 2012).....	14
Figura 7: c) Puparios solidos con pigmento proporcionados por la planta MOSCAFRUT d) Puparios con pigmento molidos.....	20
Figura 6: a) Puparios solidos sin pigmento proporcionados por la planta MOSCAFRUT b) Puparios sin pigmento molidos.	20
Figura 8 Comportamiento del pH en los distintos tratamientos fermentativos	26
Figura 9 Producción de ácido láctico en los distintos tratamientos durante la fermentación ácido- láctica.	27
Figura 10 Cinética de crecimiento de las bacterias <i>L. plantarum</i> en tratamientos T1 y T3; y <i>E.</i> <i>faecium</i> en T2 Y T4, en medio agar MRS.	31
Figura 11 Cinética de crecimiento de las bacterias en medio agar nutritivo (AN).....	32

Índice de tablas:

Tabla 1. Composición proximal del exoesqueleto de crustáceos (Ignacio Polo, 2016).....	5
Tabla 2: Especies evaluadas por su contenido de quitina (Castañeda Barrera, 2016).....	6
Tabla 3. Parámetros de fermentación.....	22
Tabla 4. Humedad y cenizas de los puparios	25
Tabla 5. Valores de humedad, ceniza, grado de desmineralización y rendimiento de las quitinas obtenidas.	28
Tabla 6. Determinación de color de las quitinas y puparios con y sin pigmento.....	30

INTRODUCCIÓN

La quitina es un biopolímero presente en la estructura de diversos organismos, principalmente en los exoesqueletos de artrópodos (Zubiria Suarez et al., 2014). Este compuesto es conocido por sus propiedades como resistencia, biocompatibilidad y biodegradabilidad, lo que lo convierte en un material de gran interés para las industrias de alimentos, biomédica y acuicultura, entre otras (Páez et al., 2012). La fuente principal de quitina comercial son los crustáceos, sin embargo, las tendencias en investigación han conllevado a explorar fuentes alternativas como los insectos para la obtención de este material (Gharibzadeh et al., 2023). La producción de quitina desde fuentes alternas a las comerciales supone la generación de materiales con características diferentes y por ende un rango de aplicaciones más amplio (Chávez Monserrat, 2013). El proceso de obtención más utilizado es el llamado método químico convencional, que mediante la reacción con agentes ácidos promueve la solubilización de los minerales y con agentes alcalinos, la eliminación de las proteínas, sin embargo estos métodos causan una disminución en la longitud de las cadenas y además, no permiten la recuperación de coproductos y los residuos generados son dañinos para el ambiente, esto ha propiciado la investigación de métodos de extracción amigables con el ambiente como es la fermentación ácido-láctica, un método biotecnológico que hace uso de bacterias ácido-lácticas (BAL) como: *Lactiplantibacillus plantarum* (Dubey et al., 2021), *Lactobacillus casei* (Castro et al., 2018), *Streptococcus* spp. (Marcia et al., 2011), etc; que generan ácidos orgánicos y proteasas, permitiendo la recuperación de compuestos de interés como minerales, aminoácidos libres, proteínas y ácidos orgánicos (Martín et al., 2013). Además de facilitar la liberación de quitina al eliminar proteínas y minerales, la fermentación ácido-láctica también reduce el uso de productos químicos nocivos, contribuyendo a prácticas más redituables (Angélica & Martín, 2019). En conjunto, las fuentes alternas y los métodos amigables permiten la recuperación de una quitina con características aceptables por la industria y la recuperación de los coproductos de interés comercial. En el estado de Chiapas, la planta Moscafrut se dedica a la producción de la mosca mexicana de la fruta (MMF) *Anastrepha ludens* (Loew) para el control de plaga mediante la técnica del insecto estéril (TIE) (Ruiz-Arce et al., 2015), lo que genera una gran cantidad de puparios sin aplicación alguna, convirtiéndose en un desecho y potencial foco de contaminación si no es dispuesto de manera correcta. Durante la producción de estos insectos, las pupas son teñidas con un pigmento fluorescente como una estrategia de identificación para reconocer a la

población estéril de la población silvestre (AIEA, 2022a). Diferentes estudios reportan la obtención de quitina de los diferentes estados de desarrollo de la mosca soldado negro (*Hermetia illucens*) y presentando resultados prometedores; así, tomando a este díptero como modelo, podemos suponer que los puparios de la mosca mexicana de la fruta son una fuente aprovechable en la obtención de quitina y otros productos por la acción de los metabolitos generados por. El objetivo de este trabajo fue extraer quitina de los puparios de la mosca mexicana de la fruta a través de fermentación ácido-láctica con *L. plantarum* y *E. faecium* y evaluar el efecto de la fermentación en la recuperación de quitina y coproductos como ácidos orgánicos, aminoácidos libres y ácido γ -aminobutírico (GABA).

1. ANTECEDENTES O MARCO TEÓRICO

1.1 La quitina

La quitina es un polisacárido de estructura lineal de alto peso molecular, se constituye por unidades de N-acetil-D-glucosamina unidas por enlaces β -D-(1,4). Es una biomolécula de gran importancia comercial debido a su versatilidad y alta demanda por las distintas aplicaciones que tiene dentro de diferentes áreas de la industria (Yuan et al., 2024). La quitina es el principal componente del exoesqueleto de artrópodos como los insectos, crustáceos y la pared celular de algunos hongos y algas; su principal función es brindar rigidez a estas estructuras y evitar la deshidratación debido a su baja permeabilidad (Greca et al., 2024). En su estudio, Koc-Bilican & Çakmak (2024) reportan tres alomorfos de quitina, conocidas como α -, β - y γ -quitina. La α -quitina brinda la característica rigidez y es la más abundante en artrópodos y hongos, sus cadenas poliméricas en sentido antiparalelo, como se observa en la figura 1, generan un sólido denso e insoluble en agua; sin embargo, la β - y γ -quitina son las estructuras principales en los tejidos flexibles. La β -quitina cuenta con cadenas en disposición paralela, lo que genera un sólido menos denso y fibroso. Se ha detectado en una amplia variedad de organismos, como moluscos y anélidos. Y la γ -quitina, se caracteriza por presentar un ordenamiento asimétrico y una estructura química denominada forma γ , parece ocurrir muy rara vez, por ejemplo, en las crisálidas del gusano de seda (*Bombyx mori*) (Álvarez & Baena, 2022)(Koc-Bilican & Çakmak, 2024).

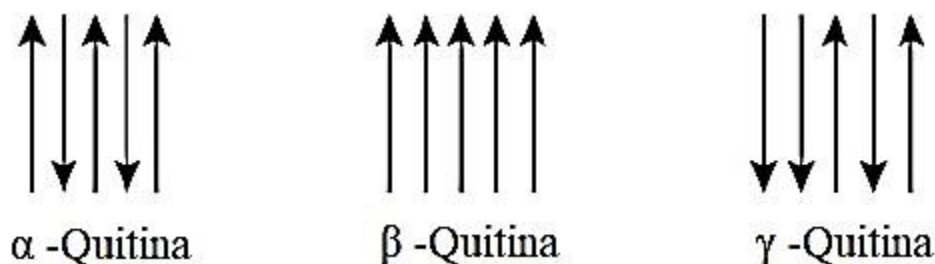


Figura 1. Estructuras Cristalinas de la Quitina (Koc-Bilican & Çakmak, 2024)

Sus propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad y de bioabsorbilidad, asociadas con capacidades antibacterianas, cicatrizantes, baja inmunogenicidad y no toxicidad, la posicionan como un producto de alta demanda en el área biomédica. Sus aplicaciones más comunes involucran

la regeneración de tejidos, curación de heridas superficiales de la piel, nervios, cartílagos, huesos, en el tratamiento de aguas y protección de plantas (Jorge Delezuk et al., 2019). Después de la celulosa, la quitina es el polisacárido más abundante en la naturaleza; en su estado más puro, se caracteriza por un color blanco parcialmente cristalino, altamente insoluble en agua y de baja reactividad. Su estructura es lineal y se conforma por aminoazúcares unidos a partir de enlaces glucosídicos (Figura 2) de unidades de N-acetil-2-amino-2-desoxi-D-glucosa. La diferencia con la celulosa radica en que el carbono 2 contiene un grupo hidroxilo en la celulosa y un grupo acetamida en la quitina. Además, contiene un alto peso molecular, presenta baja radioactividad y su estructura porosa le permite adsorber con mayor facilidad el agua (Yuan et al., 2024). Se estima que en un año se generan más de 100 billones de toneladas de quitina de manera natural en la biosfera y a pesar de eso sigue siendo una de las biomásas menos explotadas (Tharanathan, 2003).

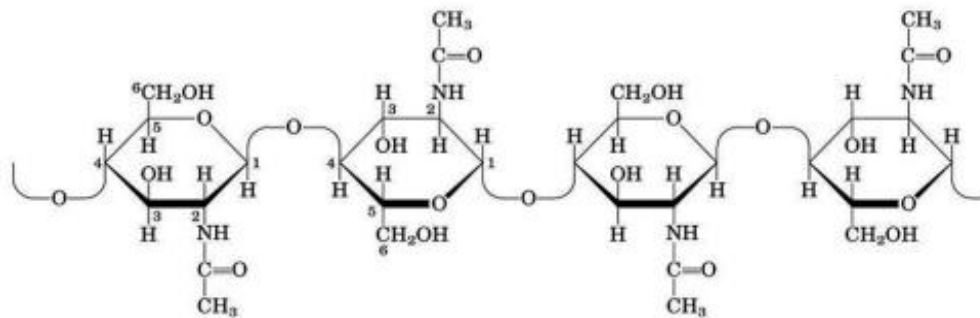


Figura 2: Estructura química de la quitina (Páez et al., 2012).

1.2 Fuentes de quitina comercial

La principal opción para la obtención de quitina comercial son los exoesqueletos de crustáceos como la langosta, el cangrejo, y el camarón, entre otros (Tabla 1); que son los desechos mayoritarios en la industria pesquera, se estima que la producción anual de quitina a partir de crustáceos marinos es de aproximadamente 2.2 toneladas (Marinela Nazareth Colina Rincón et al., 2017). El contenido de quitina depende de cada especie de crustáceo, con porcentajes variables entre 2 y 12% del peso total. Pero lo que realmente se utiliza son los exoesqueletos que presentan entre el 14 y el 35% de α -quitina, entre un 30 y un 40% de proteínas y carbonato de calcio que conforman el tejido conectivo, y en proporciones mínimas se encuentran pigmentos y sales metálicas. El contenido de minerales es dependiente del ciclo reproductivo y edad del crustáceo, a mayor edad, habrá una mayor calcificación y un menor contenido de quitina (Ignacio Polo, 2016). Sin embargo, aunque la industria pesquera genera grandes cantidades de residuos, la sostenibilidad de estas fuentes puede verse amenazada por la sobreexplotación de recursos marinos y el impacto ambiental de su procesamiento (Colina et al., 2014).

Tabla 1. Composición proximal del exoesqueleto de crustáceos (Ignacio Polo, 2016).

	Fuente de quitina	Proteína (%)	Quitina (%)	Ceniza (%)	Lípidos (%)
	<i>Collinectes sapidus</i>	25.1	13.5	58.3	2.1
Cangrejo	<i>Chionoecetes opilio</i>	29.2	26.6	40.6	1.3
	<i>Paralithodes camtschaticus</i>	22	31	46	1.0
	<i>Pandalus borealis</i>	41.9	17.0	34.2	5.2
Camarón	<i>Crangon crangon</i>	40.6	17.8	27.5	9.9
	<i>Penaeus monodon</i>	47.4	40.4	23.0	1.3
Langosta	<i>Procambonus clarkii</i>	29.8	13.2	46.6	5.6
Krill	<i>Euphausia superba</i>	41.0	24.0	23.0	11.6
Gamba	<i>Penaeus spp.</i>	61.6	33.0	29.4	1.4

1.3 Fuentes alternas de quitina

Actualmente, la quitina procede de fuentes que presentan problemas, como la escasez de suministros, la disponibilidad estacional y la contaminación ambiental. En este sentido, buscar fuentes alternas como los insectos que cuentan con una gran variedad y existente población de especies en todo el planeta, facilita una opción para solventar estos problemas (Castañeda Barrera, 2016). Los insectos en su mayoría cuentan con un contenido de quitina presente en su pared corporal o cutícula, revestimiento intestinal, glándula salival, tráquea; cáscaras de huevo y puntos de unión muscular que les proporciona rigidez, la capacidad de articular las estructuras extracelulares tanto duras (exoesqueleto) como blandas (matriz peritrófica) y los protege del medio ambiente permitiéndoles movilidad, comunicación, reparación y crecimiento (Muthukrishnan et al., 2011). Diferentes estudios han demostrado la viabilidad de la extracción de quitina a partir de diferentes insectos como el gusano de la harina *Tenebrio molitor* y la polilla de la cera *Galleria mellonella* (Iveth Sáenz Mendoza et al., 2019); el gusano de seda *Bombyx mori* (Álvarez & Baena, 2022); el escarabajo torito *Xyloryctes telephus*, las pupas del gusano defoliador *Zadiprion howdeni*, y la abeja *Apis mellifera*, entre otros (Tabla 2) (Castañeda Barrera, 2016).

Tabla 2: Especies evaluadas por su contenido de quitina (Castañeda Barrera, 2016).

FILO	NOMBRE COMÚN	ESPECIE
ARTRÓPODOS	Cigarra	<i>Magicycada septendecim</i>
ARTRÓPODOS	Mosca	<i>Drosophila melanogaster</i>
BRYOZOA	Animal musgo	<i>Phumatella repens</i>
ARTRÓPODOS	Chinche	<i>Palomena prasina</i>
BASIDIOMYCOTA	Hongo yesquero	<i>Fomes fomentarius</i>
ARTRÓPODOS	Escarabajos	<i>Omophlus</i>
MOLUSCOS	Sepia	<i>Sepia sp, Sepia spp</i>
ARTRÓPODOS	Escarabajo	<i>Pimelia</i>
MOLUSCO	Calamar	<i>Loligo chensis</i>
ARTRÓPODOS	Avispa	<i>Vespa crabro</i>
TARDÍGRADA	Osos de agua	<i>Macrobiotus cf. hufelandi</i>
ARTRÓPODOS	Saltamontes	<i>Dociostaurus maroccanus, Ailopus simulatrix, Ailopus strepens, Oedipoda</i>

		<i>miniata, Oedipoda caerulescens, Pyrgomorpha cognata</i>
ARTRÓPODOS	Mariposa	<i>Argynnis pandora</i>
ARTRÓPODOS	Cigala	<i>Nephrops norvegicus</i>
ARTRÓPODOS	Cucaracha	<i>Periplaneta americana</i>
ARTRÓPODOS	Abeja	<i>Apis mellifera</i>

Aunque hasta ahora se les ha prestado poca atención, los insectos representan una fuente viable y confiable de quitina; pues en comparación con los crustáceos, su reproducción no es estacional y pueden reproducirse fácilmente por su alta fertilidad y tasa reproductiva (Luo et al., 2019). Esto permite el surgimiento de centros de cría de insectos en todo el mundo que, con el desarrollo de sus procesos, generan toneladas de desechos que a su vez son una potencial fuente de este biopolímero, como lo es el caso de la planta a Moscafrut con los puparios de la mosca mexicana de la fruta (Van Huis, 2013).

De igual forma, diversas investigaciones mencionan las ventajas de la quitina derivada de insectos sobre las fuentes convencionales y revelan que la extracción es más beneficiosa en términos de técnicas de extracción, consumo de químicos, tiempo y producción en comparación con las fuentes tradicionales (Caligiani et al., 2018). Pero esto viene supuesto a la cantidad de quitina en cada especie, que varía dependiendo de su estadio de crecimiento. Las especies adultas de *Tenebrio molitor* y *Hermetia illucens* generan hasta un 5% de quitina, mientras que las etapas pre-pupa/pupa de las moscas soldado negro, gusanos Tebo, cucarachas de Turkestán y moscas domésticas contienen en promedio 21, 11.1, 6.7 y 11.9% de quitina (Iber et al., 2022).

1.4 La mosca mexicana de la fruta

La mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) (Figura 3); es considerada una plaga que predomina dentro del cultivo de cítricos y frutas en México, que impacta directamente al sector económico y social. Este insecto forma parte de la familia *Tephritidae*, en la que se encuentran muchas moscas de importancia económica debido a su característico comportamiento de oviposición dentro de los frutos (Ruiz-Arce et al., 2015).



Figura 3 Mosca mexicana de la fruta adulta (José Loera, 2017).

Es nativa del noreste de México y está distribuida en toda América central hasta Costa Rica. Su ciclo biológico inicia con las hembras adultas colocando los huevecillos por debajo de la cascara de los frutos, al cuarto día las larvas eclosionan y se alimentan de la pulpa de los frutos, formando pequeños espacios que dan apertura a la entrada de bacterias y hongos que terminan por deteriorar el fruto, logrando su desprendimiento. Por último, al tener contacto con el suelo se da inicio al período de pupa, donde sale una mosca adulta débil, que necesita buscar alimento en frutos maduros y convertirse en una mosca adulta saludable al finalizar el séptimo día (Figura 4) (José Loera, 2017). Las condiciones y la rapidez con lo que se genera su ciclo biológico hace a este insecto un riesgo notorio para los frutales y con ello a la economía de los agricultores mexicanos (Jose Liedo Fernández et al., 2009).

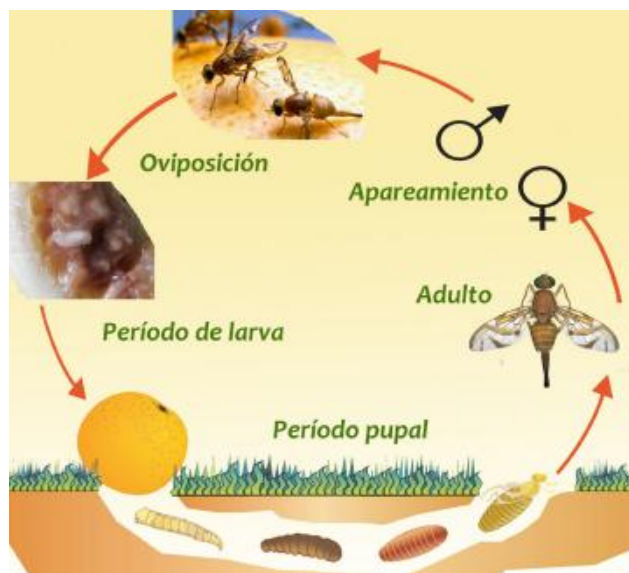


Figura 4: Mosca mexicana de la fruta adulta (José Loera, 2017).

El gobierno mexicano ha establecido un programa fitosanitario de manejo integrado de plagas basado en la técnica del insecto estéril (TIE) a gran escala con métodos efectivos que causen mínimos efectos colaterales (AIEA, 2022b). Entre ellos se encuentra la planta **Moscafrut**, un centro de reproducción artificial de moscas ubicada el estado de Chiapas México; por semana son capaces de producir más de 900 millones de unidades estériles, que son liberadas en zonas productoras de frutales para protegerlos de esta plaga. El programa operativo consta en la producción de pupas de moscas estériles del género *Anastrepha ludens* cepa bisexual y cepa Tapachula 7, esta cepa se caracteriza distintivamente por la coloración del pupario, que permite separar a los machos (puparios cafés) de las hembras (puparios mutantes negros) (Zepeda-Cisneros et al., 2014). La esterilización se basa en la irradiación de moscas macho mediante rayos X o rayos gamma, ya estériles son liberados y compiten por aparearse con los insectos silvestres, produciendo cópulas estériles. Cuando los apareamientos estériles exceden a los fértiles, la población silvestre fértil disminuye de generación en generación hasta desaparecer (Quintero-Fong et al., 2018). Este método ha permitido solo en el año 2022 producir más 1,050 millones de puparios de la cepa bisexual y un total de 2,775 millones de la cepa Tapachula 7. Este volumen masivo de materia prima ofrece una potencial fuente de quitina extraída de los puparios de este insecto y contribuyendo a la gestión de plagas, transformando un problema agrícola en una oportunidad económica (AIEA, 2022b).

1.5 Métodos de obtención de quitina

Los métodos de obtención de quitina pueden variar sus parámetros según la fuente y la metodología a utilizar. Por ello se trabaja en el perfeccionamiento de los métodos de obtención, para lograr las propiedades más convenientes para distintos usos:

1.5.1 Extracción química convencional:

Es el proceso más utilizado para la obtención de quitina, consta de tres etapas esenciales: desmineralización, desproteinización y despigmentación (Jorge Delezuk et al., 2019). Generalmente la despigmentación se realiza sólo cuando es indispensable tener un producto completamente puro; A partir de la eliminación de pigmentos (parafina, astaxantina, melanina, entre otros) ocurre vía extracción utilizando solventes orgánicos o por blanqueo con agentes oxidantes con soluciones de hipoclorito de sodio, acetona, cloroformo, peróxido de hidrógeno, acetato de etilo, etanol o una mezcla de ellos. Además, se emplean soluciones ácidas como ácido clorhídrico (HCl), ácido nítrico (HNO₃), ácido sulfúrico (H₂SO₄), ácido acético (CH₃COOH), ácido fórmico (HCOOH) para llevar a cabo la desmineralización. Es utilizado con mayor frecuencia el HCl en concentraciones que varían de 2.5 - 8% a un tiempo no máximo de 48 h. Para la eliminación de las proteínas, se emplean soluciones alcalinas como NaOH o KOH. (Chávez Monserrat, 2013).

1.6 Métodos asistidos

1.6.1 Extracción asistida por ultrasonido:

Es una técnica que utiliza sonidos de alta frecuencia, con el objetivo de ir desprendiendo el compuesto de interés; es económico y de fácil ejecución. Está basado en la propagación de ondas mecánicas conformada por un conjunto de ciclos de altas (compresiones) y bajas presiones (rarefacciones), tiene como principal fuerza impulsora a la cavitación acústica (Nelly Medina, 2017). En un estudio realizado por Vallejo-Domínguez et al., se analizó la influencia del ultrasonido para la producción de quitina y quitosano de los esqueletos de camarón; con respecto a la reducción del contenido de proteínas, el tamaño de partículas y para medir el grado de desacetilación durante 15, 20 y 25 min. Los resultados indicaron que, al aumentar el tiempo de sonicación, la desproteinización se vuelve más eficiente, evidenciado por un menor contenido de nitrógeno residual en las muestras. Además, los productos obtenidos con tiempos de sonicación

más largos presentaron mayor cristalinidad, lo que demuestra la efectividad del ultrasonido en el proceso. También se observó que el tamaño de las partículas de quitina y quitosano disminuyó debido al uso de ultrasonido.

Otro estudio realizado por Barreto Cardoso et al. (2001) reveló que la pre-sonicación provocó cambios notables en la morfología de la quitina, pero su cristalinidad general no se vio afectada. La sonicación de la quitina pareció mejorar su homogeneidad y aumentar la superficie de las partículas, mejorando la accesibilidad de los reactivos. La quitina pre-sonicada se desacetiló de manera más eficiente (hasta un 95%) que la quitina comercial (hasta un 88%), probablemente debido a la acción mecánica del ultrasonido, ya que la agitación previa de la quitina sólida mientras estaba suspendida en agua caliente o fría durante 1 hora también mejoró la eficiencia de la desacetilación.

1.6.2 Extracción asistida por microondas:

Es una estrategia que ahorra tiempo, es energéticamente eficiente y sostenible. La irradiación de microondas causa el movimiento molecular por migración de iones y rotación de los dipolos que ayudan a una rápida transferencia de energía entre el solvente y el material vegetal. Para la extracción de quitina funciona con el uso de disolventes eutécticos profundos (DES) junto con una estrategia de calentamiento por microonda. A través de la liberación de H^+ del donante, la producción de ácido de los DES y la formación de enlaces de hidrógeno entre los componentes de este; los minerales y las proteínas se eliminan con éxito utilizando los DES de cloruro de colina/ácido láctico (CL). Lo que proporciona que con las condiciones de extracción optimas, se obtiene puede obtener un alto rendimiento y pureza de quitina de 19.11 % y 97.44 %, respectivamente (Li et al., 2023).

1.6.3 Extracción por fluido super crítico:

Es una técnica que habilidosamente usa fluidos que están en su punto crítico termodinámico. Para difundirse a través de los sólidos como un gas y disolver materiales como un líquido, generando solventes de baja viscosidad, altas tasas de difusión y sin tensión superficial. Se utiliza principalmente, dióxido de carbono y agua. Se pueden realizar extracciones de diferentes compuestos con distintas presiones del fluido supercrítico. En un estudio realizado por Brovko et al., (2023), se utilizaron fluidos subcríticos y supercríticos (SbCFE y SCFE) con alcohol etílico, logrando extraer quitina y los complejos que contienen quitina (CCC) del cuerpo fructífero del

hongo de yesca *F. fomentarius*. En el caso del método SbCFE, el rendimiento de CCC es de 83.6 – 88.1%; en el caso de SCFE, 57.0 – 58.1%. Además, se observó que un cambio en la presión de 10 a 25 MPa durante la extracción no afecta significativamente el rendimiento de CCC, pero si la temperatura se aumenta, el rendimiento disminuye (Brovko et al., 2023).

1.6.4 Extracción enzimática:

Diferentes autores buscaban métodos para estudiar y aislar la quitina desde siglos anteriores, pero no fue hasta 1993 cuando Gagné logro obtener por primera vez quitina de los desperdicios de camarón con enzimas comerciales que correspondían a la época. Este proceso se realizó con la ayuda de enzimas proteolíticas como, proteasas bacterianas, quimotripsina tipo II (CE 3.4.21.1) y papaína de alta actividad proteolítica (cruda) (CE 3.4.22.2) para el proceso de desproteinización, usando reguladores para su actuación como tris-base (Lozano Claudia, 2022). La eficiencia enzimática es dependiente de la temperatura y el pH inicial, por ello la desproteinización debe realizarse bajo agitación constante, propiciando las condiciones idóneas para la correcta catálisis. La desmineralización se hace como un proceso químico con diferentes tipos de ácidos en agitación constante y después, lavar y filtrar. Las enzimas son un material biológico no tóxico de acción específica. Por lo tanto, controlar la temperatura y pH, principalmente, facilita las reacciones enzimáticas. Sin embargo, estos métodos tienen desventajas significativas como elevados costos de proceso y una eliminación incompleta de las proteínas (Zubiria Suarez et al., 2014).

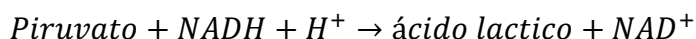
1.7 Método biotecnológico

1.7.1 Fermentación ácido-láctica:

La fermentación ácido-láctica es un proceso celular anaeróbico donde se utiliza una fuente de carbono, normalmente azúcares, para obtener energía y donde el producto de desecho es el ácido láctico. Lo realiza un amplio rango de bacterias llamadas bacterias ácido-lácticas (BAL), hongos y algunos protozoos (Angélica & Martín, 2019). En la extracción de quitina este proceso biológico-químico, permite remover las proteínas mediante acción enzimática y la remoción de minerales, particularmente carbonato de calcio por solubilización en ácidos orgánicos. Como microorganismo iniciador se utilizan lactobacilos, bacterias capaces de producir ácido láctico a partir de una fuente de carbono disponible en el medio, que puede ser glucosa, sacarosa, lactosa, suero de leche, entre otros. El descenso del pH se da por la producción de ácidos durante la fermentación a las primeras horas y promueve la desmineralización, evitando o limitando el crecimiento de microorganismos

patógenos oportunistas capaces de descomponer el cultivo. Al mismo tiempo durante la fermentación se van generando enzimas proteolíticas que combinadas con el pH y la temperatura contribuyen a la desproteinización. De esta manera se reducen residuos contaminantes, así como costos de producción, permitiendo la obtención de productos con características químicas de mayor calidad y la recuperación de compuestos de alto valor agregado que son: proteínas, y calcio que pueden ser aprovechados en distintas áreas de la industria (Chávez Monserrat, 2013).

La fermentación da inicio en condiciones anaerobias debido a la necesidad de generar moléculas de NAD^+ que se consumen de manera energética en el proceso de glucólisis. Comienza con la descomposición oxidativa de los azúcares por las BAL, la glucosa se convierte en ácido pirúvico, un compuesto de tres carbonos, obteniendo dos moléculas de ATP. Sin embargo, como el piruvato no puede entrar en el ciclo de Krebs como lo haría en condiciones aeróbicas, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD^+ que actúan como aceptores de electrones y se reducen a NADH. Para que puedan tener lugar las reacciones de las glucólisis productoras de energía es necesario reoxidar el NADH; esto se consigue mediante la cesión de dos electrones del NADH al ácido pirúvico, que se reduce a ácido láctico mediante la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (Angélica & Martín, 2019).



1.8 Bacterias ácido-lácticas

Las bacterias ácido-lácticas (BAL) son microorganismos capaces de realizar procesos fermentativos de la leche, carne y vegetales para obtener alimentos como yogurt, quesos, embutidos, vinos y cervezas. Las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, mesófilos, no esporulados, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y bencidina negativas, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos, con temperaturas de crecimiento entre 20 y 60°C y pH tan bajos como 3.2 o valores máximos de 9.6. La mayoría crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir en medios donde otras bacterias no resistirían (José Carmen Ramírez Ramírez, 2007). Algunos requerimientos para su crecimiento son: fuentes de carbono (presente en forma de azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos), nitrógeno (disponible en aminoácidos,

péptidos y compuestos inorgánicos) minerales (Mg, Mn y Fe en forma de sales) y vitaminas. Cabe destacar que en algunos casos las bacterias lácticas pueden crecer, mantenerse, conservar y proporcionarle al alimento características probióticas sin la generación de ácido láctico (Angélica & Martín, 2019). Además del ácido láctico como producto principal de estas bacterias también son de interés metabolitos que benefician a la salud como el ácido linoleico conjugado (CLA), bacteriocinas o péptidos bioactivos y el ácido gama aminobutírico (GABA).

1.9 Ácido γ -aminobutírico (GABA)

El GABA es un aminoácido no proteico de cuatro carbonos que presenta un grupo amino en el carbono γ en lugar del carbono α , lo que explica su exclusión de la clasificación de aminoácidos. Este compuesto es altamente soluble en agua y tiene una estructura flexible que le permite adoptar diversas conformaciones en solución, incluyendo una estructura cíclica similar a la prolina. A pesar de no pertenecer a la familia de los α -aminoácidos y, por lo tanto, no formar parte de proteínas, el GABA tiene funciones propias y significativas.

La producción de GABA por parte de las BAL se realiza mediante la descarboxilación irreversible del L-glutamato, la cual es catalizada por la enzima, ácido glutámico descarboxilasa que utiliza al piridoxal 5-fosfato o vitamina B6 como cofactor. Esta enzima ha sido encontrada en bacterias como las BAL, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*; en hongos como *Aspergillus* y *Neurospora*. La biosíntesis de GABA por parte de las BAL se da estrictamente para protegerlas contra el estrés inducido por un descenso del pH (Páez et al., 2012).

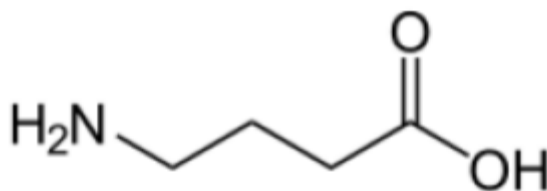


Figura 5 Estructura química del ácido gamma-aminobutírico (Páez et al., 2012).

Este producto resulta de especial interés para su aplicación en alimentos o ámbitos biotecnológicos. Esto, debido a que se lleva a cabo de manera natural, lo que lo hace aún más atractivo para los consumidores, además que se disminuyen los costos de producción. La producción de este compuesto depende en gran medida de cada cepa (cepa dependiente), por lo

que se han reportado una gran cantidad de bacterias de diferentes géneros con grandes diferencias de producción entre sí (Carmen Guadalupe Manzanarez Quin, 2016). En el mismo estudio se aislaron 440 géneros diferentes de BAL de quesos comerciales italianos. De estas, solo 61 mostraron la capacidad de producir GABA; las cepas que generaron las concentraciones más altas de GABA durante la fermentación de leche descremada fueron *L. brevis* PM 17, *L. plantarum* C48, *L. paracasei* PF6, sbsp. bulgaricus PRI y *L. lactis* PU1, con niveles que variaron entre 15 y 99.9 mg/kg (Carmen Guadalupe Manzanarez Quin, 2016).

1.10 Lactiplantibacillus plantarum

L. plantarum es una bacteria perteneciente a la familia *Lactobacillaceae*, son bacilos gram-positivos que mediante el metabolismo anaerobio producen la fermentación de los glúcidos, transformándolos en ácido láctico (Dubey et al., 2021). Se trata de una cepa probiótica, heterofermentativa, que posee vías tanto de glucólisis como de fosfocetolasa. A diferencia de otras bacterias estrictamente anaeróbicas, son aerotolerantes. El pH óptimo para su crecimiento es de 4.5 - 5.8, en cuanto a los aminoácidos, péptidos, nucleótidos, vitaminas, minerales, ácidos grasos y carbohidratos suelen ser muy exigentes. Se dividen en homolácticos y heterolácticos dependiendo de la vía de fermentación que utilizan. En condiciones de exceso de glucosa y un limitado uso de oxígeno, los homolácticos realizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas para transforman una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, generando energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) y nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH). Además, es capaz de producir algunas sustancias bioactivas como exopolisacáridos, ácido γ -aminobutírico (GABA), ácido fólico y riboflavina, que ofrecen propiedades funcionales a los alimentos fermentados con esta cepa (Jurado-Gámez et al., 2013).

1.11 Enterococcus faecium

El *Enterococcus faecium* es una de las dos especies más relevantes de los enterococos, son bacterias ácido-lácticas de forma esférica (coco), Gram-positivas, anaerobias facultativas, no esporulados; que se disponen en parejas o en cadenas cortas, aunque no se descarta la posibilidad de encontrarlas en cadenas largas. Son capaces de sobrevivir en superficies y entornos hospitalarios por mucho tiempo (Calderón-Parra et al., 2022). Este organismo tolera un pH entre 4.5 y 6.5, aunque prefiere un entorno ligeramente ácido. Esta condición ayuda a inhibir a otros microorganismos competidores. Los azúcares como la glucosa o la sacarosa, se destacan como una de sus fuentes de energía preferidas y en cuanto a los aminoácidos, son recomendables glutamina y lisina (Hikmate Abriouel et al., 2008).

JUSTIFICACIÓN

La quitina es un polisacárido presente en el exoesqueleto de numerosos artrópodos, entre ellos, insectos como la mosca mexicana de la fruta *Anastrepha ludens* (Loew) criada en Chiapas para el control de plaga mediante la técnica del insecto estéril. Debido a la abundancia y disponibilidad de los puparios generados a partir del proceso de producción se obtiene un subproducto que, sin la adecuada disposición, puede generar un riesgo significativo de contaminación. En lugar de ser desechados o convertidos en alimento animal, la extracción de quitina mediante fermentación ácido-láctica se presenta como una alternativa para la generación de productos de alto valor comercial como la quitina y algunos coproductos. Esto se debe a que los microorganismos utilizados en este proceso son generalmente más accesibles que los reactivos químicos tradicionales. Además, la fermentación puede llevarse a cabo a temperaturas ambientales y con un menor consumo energético en comparación con los métodos químicos convencionales, lo que contribuye a reducir los costos. Esta técnica no solo favorece la eficiencia en el uso de recursos biológicos, sino que también promueve una menor huella ambiental, siendo una opción más sostenible frente a la explotación de especies marinas.

De esta manera lograr satisfacer la demanda creciente de los productos derivados de ella, requeridos en el ámbito médico, para la fabricación de apósitos para heridas y en sistemas de liberación controlada de fármacos debido a su biocompatibilidad. En la agricultura, como bioestimulantes y agentes de control de plagas. Ofreciendo un campo fértil para la investigación en biotecnología y ciencias ambientales.

HIPÓTESIS

La fermentación ácido-láctica de los puparios de la Mosca mexicana de la fruta permitirá la obtención de una quitina con alto grado de pureza y un licor rico en subproductos como ácidos orgánicos, aminoácidos, proteínas y ácido gamma-aminobutírico

OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS

Objetivo general:

Obtener quitina utilizando como fuente alterna a los puparios de la morca mexicana de la fruta, mediante fermentación ácido-láctica y evaluar el grado de desmineralización, desproteinización y la obtención de coproductos.

Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la fermentación ácido-láctica en la desmineralización y desproteinización del material.
- Evaluar el efecto de la producción de microorganismos en la desmineralización y desproteinización.
- Evaluar el efecto de la fermentación ácido-láctica en el rendimiento de quitina.
- Evaluar el efecto de la fermentación ácido-láctica en la producción de ácidos orgánicos.
- Evaluar el efecto de la fermentación ácido-láctica en la producción de aminoácidos libres.
- Evaluar el efecto de la fermentación ácido-láctica en la producción de GABA.
- Evaluar el efecto de la fermentación ácido-láctica en el perfil proteico del licor de la fermentación.

2 MATERIALES Y METODOLOGÍA

Los puparios de la mosca mexicana de la fruta, fueron proporcionadas por el Programa Nacional de Moscas de la Fruta (SENASICA). Específicamente por la planta productora Moscafrut en Chiapas. Las muestras se trituraron en una licuadora convencional (Oster® Model: 2154144/2114087, 60 Hz 127 V ~ 700W, México) hasta que la consistencia quedara lo más fina posible. La harina obtenida se colocó en bolsas termosensibles y selló a vacío (MULTIVAC C200, Nr. 141118 110V 60 Hz 13A 1 Kw 20, wolfertschenden, Germany). El material se almacenó a temperatura ambiente y protegido de la luz.



Figura 7: a) Puparios solidos sin pigmento proporcionados por la planta MOSCAFRUT
b) Puparios sin pigmento molidos.



Figura 6: c) Puparios solidos con pigmento proporcionados por la planta MOSCAFRUT
d) Puparios con pigmento molidos.

2.1 Caracterización proximal de las muestras

2.1.1 Determinación del contenido de humedad

La determinación de humedad se realizó de acuerdo con el método 934.01 (AOAC, 1997). Las muestras se colocaron en crisoles y secaron a 105 °C hasta peso constante. El contenido de humedad se calculó de acuerdo con la ecuación 1:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{P - P_1}{P_2} \times 100 \quad (1)$$

En donde P es el peso del crisol con la muestra húmeda (g), P₁ es el peso del crisol con la muestra seca (g) y P₂ es el peso de la muestra inicial (g).

2.1.2 Determinación del contenido de cenizas

La determinación de cenizas se realizó de acuerdo con el método 942.05 (AOAC, 1997), las muestras se secaron en horno a 105 °C durante 12 h, posteriormente se quemaron por completo hasta dejar de emitir humos y calcinaron en mufla durante 4 h a 600 °C. El contenido de cenizas se calculó de acuerdo con la ecuación 2:

$$\text{Cenizas (\%)} = \frac{(P-p) \times 100}{M} \quad (2)$$

En donde P es el peso del crisol con la muestra calcinada (g); p, el peso del crisol vacío (g) y M, la masa de la muestra (g).

2.1.3 Determinación del contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl

Se empleó un digestor Kjeldahl DKL 12 series acoplado a una unidad de destilación UDK 129 (VELP Scientifica Srl. Via Stazione, 16 - 20865 Usmate (MB) – Italy) se seleccionaron los programas del Velp Scientifica - Operating Manual UDK 129 de acuerdo con cada material. Se siguió el método 7 – para determinar el contenido de proteína en alimentos; Método 984.13 (AOAC 1997). El contenido de nitrógeno se obtuvo de acuerdo con la ecuación 3 y el contenido de proteína residual en la quitina utilizando la ecuación 4.

$$\text{Nitrógeno (\%)} = \frac{V \times N \times 0.014 \times 100}{M} \quad (3)$$

En donde V es volumen de HCl consumido en la titulación (mL); N, la normalidad del HCl; 0.014 los miliequivalentes de nitrógeno y M la cantidad de muestra utilizada (g).

$$\text{Proteína (\%)} = (\text{Nitrógeno (\%)} - 6.9) \times 6.25 \quad (4)$$

En donde 6.9 corresponde al contenido teórico de nitrógeno en la quitina y 6.25 corresponde al contenido de nitrógeno teórico (%) en proteína (Tolesa et al., 2019).

2.2 Fermentación ácido-láctica

Se evaluó un diseño factorial 2^2 , dando como resultado un total de 4 tratamientos; el primer factor fue el tipo de quitina: con pigmento y sin pigmento, debido a que los puparios de la mosca mexicana de la fruta son pigmentados durante su producción para distinguir las moscas estériles (Aurora Pink® - DayGlo), el segundo factor fue el microorganismo: se evaluaron *L. plantarum* y *E. faecium*.

Con base en la cantidad del material agregado se agregó un 11% de sacarosa, un 14% de microorganismo ajustado a 0.5 McFarland y un 500% de agua para mantener en contacto todos los componentes durante la fermentación (tabla 3).

Tabla 3. Parámetros de fermentación

Código	Material	Pupario (g)	Sacarosa (%)	Microorganismo	Sol. 0.5 McFarland (%)	Agua (%)
T1	PSP	40	11	<i>L. Plantarum</i>	14	500
T2	PSP	40	11	<i>E. Faecium</i>	14	500
T3	PCP	40	11	<i>L. Plantarum</i>	14	500
T4	PCP	40	11	<i>E. Faecium</i>	14	500

PSP= Pupario sin pigmento. PCP= Pupario con pigmento

La fermentación se llevó a cabo por un periodo de 7 días (168 h) a temperatura ambiente. Cada 24 horas la mezcla fue agitada por lapsos de 10 min y se tomaron muestras de 40 mL del licor cada 24 horas. El licor recolectado del fermento permitió evaluar la remoción de minerales. Al final del proceso la quitina obtenida se lavó con abundante agua y se secó por 24 horas a 60°C.

2.3 Cinética de Crecimiento de las Bacterias Ácido-lácticas y autóctonas durante la fermentación de los puparios

Para un mejor análisis del comportamiento de las cepas evaluadas de *L. plantarum* y *E. faecium* durante la fermentación. Se inocularon ambas bacterias ajustadas con el patrón de referencia McFarland 0.5 a 36°C durante 48 h en medio líquido de Agar Man, Rogosa y Sharpe (MRS) y se refrigeraron a 4°C para su posterior uso.

Se realizaron diluciones decimales de 1 mL de muestra en 9 mL de solución isotónica (NaCl 0.9% p/v), se transfirieron a caja de Petri con medio sólido MRS, que permite un mejor crecimiento de las bacterias ácido-lácticas, y en Agar nutritivo para identificar la presencia de bacterias patógenas (Vega Jacqueline et al., 2024). Para la siembra en superficie, las cajas se incubaron a 36°C por 24 h, solo se tuvieron en cuenta los conteos entre 10 y 200 colonias, el número de colonias se multiplicó por el inverso de la dilución y 10 para obtener el número de unidades formadoras de colonias (UFC/mL) de las bacterias ácido lácticas presentes. Esto se repitió diariamente (7 tiempos) para los 4 tratamientos. Para la cinética de fermentación, únicamente se realizaron mediciones de la acidez total mediante titulación con hidróxido de sodio (1N) para determinar la cantidad de ácido láctico que se produjo.

2.4 Extracción química convencional

Con el fin de evaluar el efecto de la fermentación ácido-láctica se evaluó la obtención de quitina por el método químico convencional reportado por (Martín-López et al., 2024) Los puparios se sometieron a desmineralización con solución HCl 2N a una relación sólido:líquido 1:20 (p/v) bajo agitación constante durante 3h a temperatura ambiente. La biomasa desmineralizada se filtró con una malla de nylon y su pH se ajustó a neutro con solución de NaOH 30% (p/v). La muestra se secó en horno (OV-12, JeioTech Co., Ltd., South Korea) a 60°C hasta peso constante. Las muestras desmineralizadas fueron suspendidas en solución NaOH 2N a una relación sólido:líquido 1:20 bajo agitación constante y temperatura ambiente durante 24h. El pH de la muestra se ajustó a neutro con solución de HCl 50% (v/v – pureza 37%), se filtró a través de una malla de nylon y lavó con agua destilada para eliminar completamente las sales residuales. Finalmente, la muestra se secó en horno a 60°C hasta peso constante. El rendimiento de la extracción se calculó de acuerdo con la ecuación 5:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{Quitina (g)}}{\text{Material crudo (g)}} \times 100 \quad (5)$$

2.5 Determinación del color

Se colocó cada una de las muestras en charolas de pesaje de 8×8 cm y se midieron los parámetros de luminosidad (L^*), rojo a verde (a^*) y amarillo a azul (b^*) utilizando un colorímetro estandarizado para el espacio CIELab. Los valores se emplearon para calcular la diferencia total de color (ΔE) de acuerdo con la ecuación 6.

$$\Delta E = (\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{\frac{1}{2}} \quad (6)$$

2.6 Determinación del contenido de ácido láctico mediante acidez total titulable (ATT)

A 3 mL del licor de fermentación se adicionaron 27 mL de agua destilada. La mezcla se tituló con una solución estandarizada de NaOH 0.1 M; hasta alcanzar un pH de 8.4 y se calculó el contenido de ácido láctico de acuerdo con la ecuación 7 (Zainoha Zakaria, 1997).

$$\text{Ácido láctico (g)} = \text{Vol. NaOH 0.1 M} \times 0.009 \quad (7)$$

En donde 1 mL de NaOH 0.1 M equivale a 0.009 g de ácido láctico (90 g/mol) y posteriormente se calculó el contenido de ácido láctico para el volumen total del licor de fermentación obtenido para cada tratamiento (205.6 mL).

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Contenido de humedad y minerales de los puparios

Tabla 4. Humedad y cenizas de los puparios

Material	Humedad (%)	Cenizas (%)
PCP	25.94 ± 0.19	17.07 ± 0.47
PSP	23.50 ± 0.10	18.26 ± 0.16

PCP = Pupario de la mosca mexicana de la fruta con pigmento.

PSP = Puparios de la mosca mexicana de la fruta sin pigmento.

Se observó que el contenido de humedad en PCP fue de 25.94%. Mientras que en PSP fue de 23.50% respecto al material inicial. En su estudio con la mosca soldado negro Eggink & Dalsgaard (2023) reporta un contenido de humedad del 22-25% y un contenido de cenizas de 3.3-10% lo que indica que los resultados obtenidos representan un porcentaje aceptable para ambos casos. Se describe que el contenido de minerales y proteínas de diferentes fuentes es variable y dependiente en gran medida de la alimentación y estadio de desarrollo, un ejemplo de esto es que los exoesqueletos necesitan mayor rigidez, así contienen más proteínas y cenizas que los puparios, que únicamente sirven de protección durante la metamorfosis que da lugar a la transformación de la larva a la mosca adulta (Eggink & Dalsgaard, 2023).

3.2 Determinación del contenido de nitrógeno por el método Kjeldahl, grasa y fibra.

No se logró determinar con precisión el contenido de nitrógeno, grasas y fibras del material debido a la inconsistencia de los resultados obtenidos, lo que impidió su interpretación confiable. Ante esta situación, se optó por continuar con el resto de la caracterización para no comprometer el avance del estudio. Para mejorar la obtención de estos datos en futuras investigaciones, se podrían emplear métodos más sensibles y específicos, como la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) para proteínas, extracción Soxhlet con disolventes adecuados para grasas, y el método de Dumas como alternativa más precisa al de Kjeldahl para el análisis de nitrógeno, minimizando así posibles

interferencias y variaciones en los resultados. Estos métodos no se pudieron realizar debido a la falta de tiempo y disposición de equipos.

3.3 Comportamiento del pH durante la fermentación ácido-láctica

El pH inicial en todos los tratamientos evaluados fue de 7.8, se observó que durante las primeras 24 h, el pH descendió hasta 5.7-5.9, conforme el transcurso del tiempo hasta las 48 h, el pH se mantuvo estable para todos los tratamientos evaluados. Como se puede observar en la figura 6 a las 72 h, el pH en los tratamientos evaluados con *L. plantarum* (T1 y T3) elevaron su valor, lo que puede estar ligado a la presencia de agentes patógenos que compitieron contra los lactobacilos, eso también se constata con el aroma generado en estos tratamientos. Para contrarrestar esto, se adicionaron 50 mL de ácido acético al 5% (v/v) diariamente para mantener estable la fermentación. En los tratamientos T2 y T4 no se observó un aumento en el pH pero se optó por agregar 4.4 g de sacarosa (11% respecto al sustrato) diariamente para contribuir a la reproducción de BAL (*E. faecium*) y la generación de ácidos orgánicos. Posteriormente en las siguientes 96 h a 168 h, el pH se estabilizó de 4.3-4.6 óptimo para las BAL y contribuyendo a la desmineralización del material.

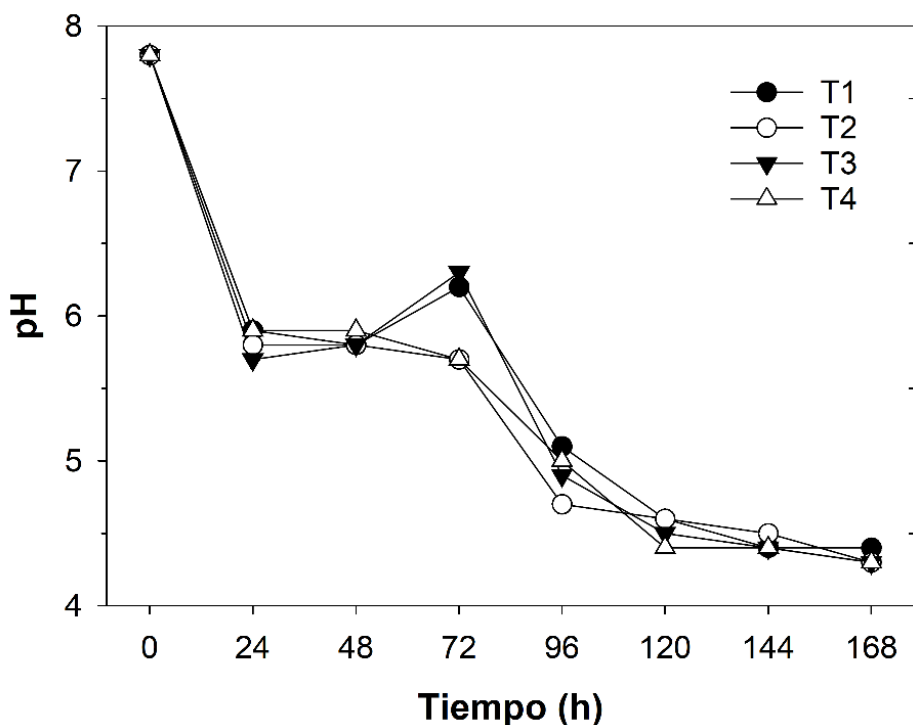


Figura 8 Comportamiento del pH en los distintos tratamientos fermentativos

3.4 Producción de ácido durante la fermentación ácido-láctica medido por ATT

La producción de ácidos orgánicos fue notable con 0.1-0.2 g a partir de las primeras 24 h en todos los tratamientos fermentativos, se reportó como ácido-láctico al ser el producto mayoritario. Durante las 48 h la producción se mantuvo estable entre 1.23-1.40 g para todos los tratamientos. Como se puede observar en la figura 7 en las 72 h T2 y T4 mantuvieron su producción alrededor de 0.93 y 1.16 g pero en el caso de T1 y T3 se refleja una disminución en la producción debido al aumento del pH provocado por microorganismos patógenos presentes naturalmente en los puparios. Esto se contrarrestó con la adición de ácido acético a ambos tratamientos por lo que es importante señalar que el aumento en la concentración de ácido en estos tratamientos (T1 y T3) es generado únicamente por la adición de este compuesto para la estabilización del sistema, mientras que en los tratamientos T2 y T4 el aumento de ácido y por ende la disminución del pH fue por el metabolismo de *E. faecium* al consumir la sacarosa añadida.

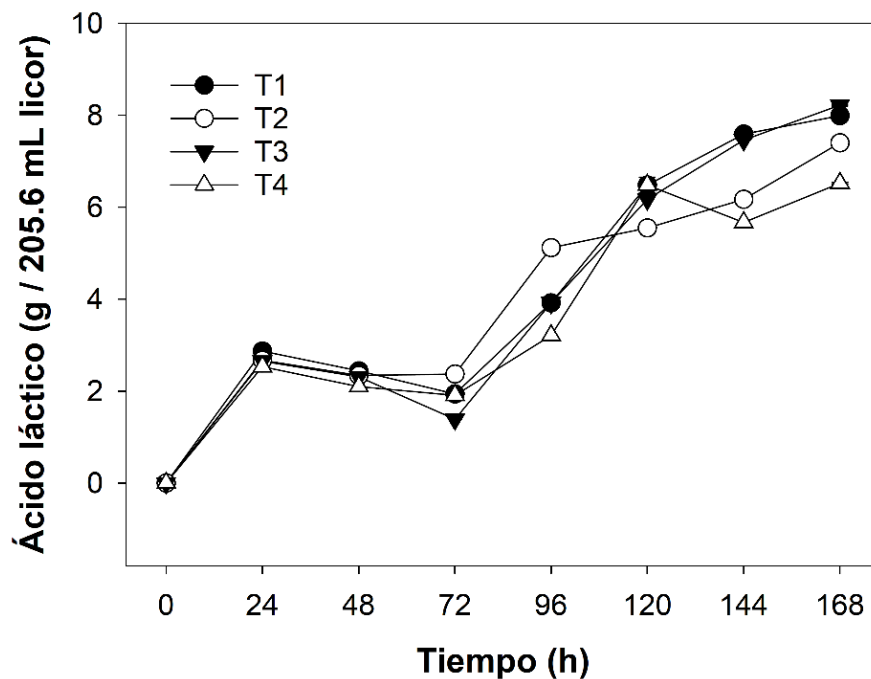


Figura 9 Producción de ácido láctico en los distintos tratamientos durante la fermentación ácido-láctica.

3.5 Contenido de humedad, cenizas y grado de desmineralización de la quitina obtenida por fermentación ácido-láctica

En la tabla 5 se presentan los datos obtenidos de humedad, cenizas, grado de desmineralización (GDM) y rendimiento de las quitinas obtenidas por fermentación ácido-láctica y las quitinas control obtenidas por el método químico convencional. Se tomó como material de control a las quitinas de los puparios con (QQPCP) y sin pigmento (QQPSCP).

Tabla 5. Valores de humedad, ceniza, grado de desmineralización y rendimiento de las quitinas obtenidas.

Material	Humedad (%)	Cenizas (%)	GDM (%)	Rendimiento (%)
T1	4.63 ± 0.19	1.46 ± 0.15	91.99 ± 0.91	58.36 ± 0.01
T2	5.65 ± 0.15	0.58 ± 0.08	96.83 ± 0.44	61.07 ± 0.01
T3	5.70 ± 0.22	1.05 ± 0.00	93.84 ± 0.18	61.77 ± 0.01
T4	6.03 ± 0.07	0.88 ± 0.11	94.88 ± 0.51	62.01 ± 0.01
QQPCP	7.35 ± 0.15	1.60 ± 0.78	88.35 ± 0.02	32.73 ± 1.13
QQPSP	7.84 ± 0.05	2.13 ± 0.01	90.56 ± 4.83	39.97 ± 1.82

T1 = Tratamiento usando puparios sin pigmento y *L. plantarum*. T2 = Tratamiento usando puparios sin pigmento y *E. faecium*. T3 = Tratamiento usando puparios con pigmento y *L. plantarum*. T4 = Tratamiento usando puparios con pigmento y *E. faecium*. QQPCP= Quitina química convencional de puparios con pigmento. QQPSP= Quitina química convencional con puparios sin pigmento

La humedad reportada en los cuatro tratamientos oscila de 4.63-6.03%, ligeramente más baja en comparación a las quitinas obtenidas por el método convencional que es de 7-8%. Los tratamientos T1 y T3, ambos evaluados con *L. plantarum* y que necesitaron la adición de ácido acético al 5% (v/v) presentaron un contenido de cenizas mayor al 1%, mientras que los tratamientos T2 y T4,

que fueron evaluados con *E. faecium* presentaron contenidos de cenizas por debajo del 1%, esto indica que la producción de ácidos orgánicos por este microorganismo son más afines a los minerales presentes en los puparios, independientemente de la presencia del pigmento Aurora Pink, en este sentido este proceso demostró una mayor desmineralización alcanzando valores de 96 y 94%, mientras que T1 y T3 presentaron desmineralizaciones de 91 y 93%, respectivamente. En ambos casos se alcanzó una mayor desmineralización en comparación con el método químico convencional, en donde el tratamiento evaluado a los puparios pigmentados presentó un contenido de cenizas de 1.6% y los puparios sin pigmentar un contenido final del 2.1%, lo que se traduce a grado de desmineralización de 88 y 90%, respectivamente.

3.6 Determinación de color de los materiales con y sin pigmento y de las quitinas obtenidas por fermentación ácido-láctico

Los resultados mostraron valores notables de luminosidad (L^*), con rangos que oscilaron entre 23-37 en el caso de todos los materiales con pigmento (Puparios, quitina por fermentación, quitina química), indicando una tonalidad menos oscura debido al pigmento agregado. Los materiales sin pigmento oscilaron entre los 23-27, una tonalidad más oscura que a simple vista podía ser apreciable. El componente a^* mostró variaciones entre 4 y 6 para los no pigmentados, lo que refleja la presencia de matices ligeramente rojizos, pero en los pigmentados se puede notar una tonalidad más elevada de rojos oscilando entre los 8 y 9 debido a la presencia del pigmento aurora Pink con tonalidades rosa-rojizos. Por otro lado, el componente b^* reveló una tendencia hacia tonos amarillos en un rango de 1 a 2 en el caso de los materiales SP y de 0.3 a 2 en los materiales CP, sugiriendo una muy baja tonalidad amarilla. Los puparios naturalmente presentan una coloración oscura, generalmente café-negro, lo que concuerda con los valores obtenidos para L^* , a^* y b^* ; debido al proceso de producción, la adición de pigmento rosa-rojo modifica la coloración natural de los puparios a un rojo intenso, lo que también se constata con los valores obtenidos para L^* , a^* y b^* para PSP y los tratamientos fermentativos evaluados a este material.

En cuanto a la diferencia de color (ΔE) de las quitinas obtenidas con respecto al material inicial (puparios con y sin pigmento). Los resultados demuestran una diferencia de color significativa en los tratamientos T1 y T2 (sin pigmento) que es de 8.15-7.81 con respecto a la quitina química que es de 4.76. En cuanto a T3 y T4 la diferencia oscila entre 1.32-3.68 y la quitina química en 2.12. La mayor diferencia en color se observó para los tratamientos evaluados con los puparios sin

pigmentar (T1 y T2), mientras que la menor diferencia fue observable para los tratamientos con pigmento adicionado, esto debido principalmente a fuerte unión del pigmento al material. Esta tendencia también se pudo observar en los tratamientos químicos, en donde la quitina química de los puparios con pigmento presentó una diferencia total del color de 2.12 y la quitina química de los puparios sin pigmentar un valor de 4.76.

Tabla 6. Determinación de color de las quitinas y puparios con y sin pigmento.

Material	Color			
	L^*	a^*	b^*	ΔE
PCP	34.00 ± 0.00	9.77 ± 0.06	0.37 ± 0.06	-
PSP	23.7 ± 0.26	4.2 ± 0.17	1.5 ± 0.10	-
T1	31.43 ± 0.15	4.67 ± 0.12	2.07 ± 0.06	7.77 ± 0.11
T2	30.70 ± 0.20	4.63 ± 0.21	1.60 ± 0.00	7.02 ± 0.35
T3	35.10 ± 0.10	9.63 ± 0.15	1.07 ± 0.06	1.32 ± 0.13
T4	37.57 ± 0.06	9.10 ± 0.10	1.13 ± 0.06	3.68 ± 0.05
QQPCP	32.63 ± 0.21	8.70 ± 0.20	1.57 ± 0.15	2.12 ± 0.018
QQPSP	27.73 ± 0.12	6.60 ± 0.17	0.83 ± 0.06	4.76 ± 0.22

PCP= puparios con pigmento. PSP= puparios sin pigmento. T1= tratamiento usando puparios sin pigmento y *L. plantarum*. T2= tratamiento usando puparios sin pigmento y *E. faecium*. T3= tratamiento usando puparios con pigmento y *L. plantarum*. T4= tratamiento usando puparios con pigmento y *E. faecium*. QQPCP= quitina química convencional de puparios con pigmento. QQPSP= quitina química convencional con puparios sin pigmento

3.7 Cinética de Crecimiento de las Bacterias del Ácido Lácticas durante la fermentación

La evaluación de la cinética de crecimiento de las bacterias lácticas se realizó mediante el conteo de las pacas en dos tipos de medios: Agar MRS para las BAL y agar nutritivo para las bacterias patógenas. Como se puede observar en las figuras 8 para T2 y T4 con *E. faecium*, el incremento de unidades de colonias es notable en las primeras 24 h y se mantienen constantes hasta las 168 h, tomando en cuenta la adición de ácido acético al 5% p/v que les proporciono un medio ácido sin bacterias patógenas que les impidiera desarrollarse. En cambio, en T1 y T3 con *L. plantarum* a partir de la 96h hubo un declive del microorganismo. Esto pudiera deberse a la deficiencia de sustrato que les permitiera seguir reproduciéndose a pesar de que cada 24 h se le adicionaba 11% de sacarosa.

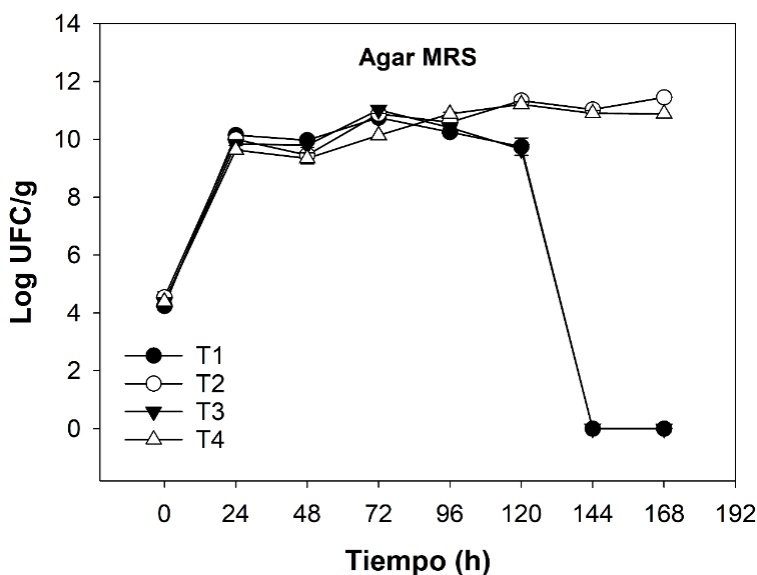
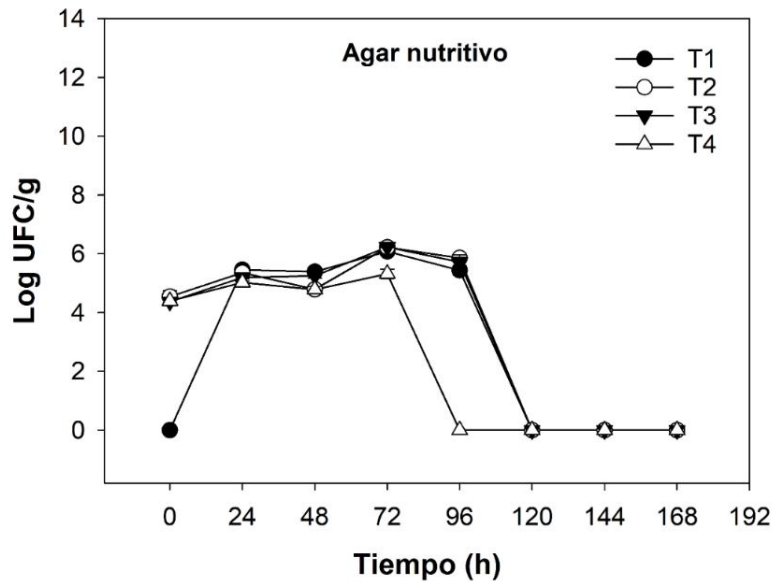


Figura 10 Cinética de crecimiento de las bacterias *L. plantarum* en tratamientos T1 y T3; y *E. faecium* en T2 Y T4, en medio agar MRS.

En cuanto a la figura 9. Se puede observar una clara disminución de las bacterias patógenas que competían contra las BAL.

Figura 11 Cinética de crecimiento de las bacterias en medio agar nutritivo (AN).



Discusión:

El rendimiento del proceso fue uno de los indicadores claves que permitió observar la presencia de la quitina como resultado final. En el caso de la fermentación ácido-láctica de los tratamientos T1, T2, T3 y T4, la eficiencia ronda entre el 58.36% y el 62.01%. En un trabajo realizado por Xiong et al. (2023) con el mismo método con la mosca soldado negro, el rendimiento fue de 59.90% y 47.31% que se asemeja con el resultado obtenido, lo que indica que si ocurrió la remoción de minerales durante el proceso. Estos resultados fueron significativamente mayores en comparación con los obtenidos en el método químico convencional de 32.75% y el 39.97%, demostrando así una mayor eficiencia y una viabilidad económica evidente entre ambos métodos.

En cuanto a los cambios del pH obtenidos de los licores de cada uno de los tratamientos durante las 168 h del proceso (figura 6). Se puede observar la disminución del pH en las primeras 24 h de 5.7-5.9, manteniéndose constante hasta llegar a un pH final de 4.43-4.6 a las 168 h. Lo que indica una rápida acidificación del medio, favoreciendo la desmineralización (DM), y la conservación de la muestra, pero no a la desproteínización (DP). En un trabajo realizado por Rao et al. (2000) encontraron que uno de los factores críticos en la producción de quitina en cuanto a la eficiencia en la DM y DP del material, es el pH inicial del licor de fermentación. De acuerdo con sus resultados, la disminución del pH del licor (de 7.0 a 4.0) evita la formación de microorganismos

no deseados, incremento la eficiencia de la desmineralización (de 44.1 a 67.5 %), pero disminuye ligeramente la eficiencia de la desproteinización (de 89.2 a 88.4 %). Los porcentajes de DM obtenidos en T1, T2, T3 y T4 fue de 91.99-96.83 %. Dando así una comparativa no alejada entre los resultados obtenidos.

Por consecuente, mientras que el pH disminuyo, fue claro el incremento del % ATT de 0.01 g a 1.16 g (figura 7). La producción de ácido láctico está estrechamente relacionada con la reducción del pH; entre los productos de la fermentación de *L. plantarum* y *E. faecium* se encuentra los ácidos orgánicos como: ácido láctico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético, glucosa y etanol; característica que distingue a estas bacteria según un estudio realizado por Jurado Gámez & Jarrín Jarrín (2015); y con ello el aumento de la acidez del medio. Mencionando de igual forma que la adición constante de sacarosa durante todo el periodo de fermentación demuestra el buen uso del nutriente por parte de la cepa láctica y, de manera indirecta, la producción de estos ácidos.

Las tasas de crecimiento también se vieron estrechamente relacionada con la cantidad de acidez total titulable (ATT). Ya que el incremento de la acidez estuvo directamente relacionado con el crecimiento microbiano, lo que sugiere que la producción de ácidos orgánicos es una consecuencia del metabolismo de los azúcares fermentables presentes en el sustrato.

Durante la fase de latencia, la ATT se mantuvo relativamente constante (figura 7), indicando que la actividad metabólica inicial fue baja mientras las bacterias se adaptaban al medio. Sin embargo, en la fase exponencial, se registró un incremento significativo en la acidez, coincidiendo con el crecimiento acelerado de la población bacteriana (figura 8). Este comportamiento es característico de bacterias homofermentativas como *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*, que metabolizan carbohidratos para producir principalmente ácido láctico (Jurado Gámez & Jarrín Jarrín, 2015). En la fase estacionaria, la acidez alcanzó su máximo valor, lo que sugiere que la producción de ácidos se estabilizó debido a la limitación de nutrientes o la acumulación de productos inhibitorios. Posteriormente, en la fase de declinación, se observó una ligera reducción en la acidez, posiblemente debido a la muerte celular y la utilización de ciertos compuestos ácidos por las mismas bacterias o microorganismos secundarios.

CONCLUSIONES

La fermentación ácido-láctica es un proceso ideal para la producción de quitina de los puparios de la mosca mexicana de la fruta, que presentó una menor desmineralización que lo obtenido por el método químico convencional, pero sin la necesidad de emplear ácidos fuertes como el HCl.

La fermentación provocó una reducción gradual del pH, lo que genera un aumento de la acidez total titulable. Estos cambios indican que las bacterias están desempeñando un papel fundamental en la degradación de proteínas y minerales, modificando las propiedades fisicoquímicas del material que pudo ser observable en el grado de desmineralización del material.

Los tratamientos con *L. plantarum* no lograron una fermentación efectiva, por lo que se tuvo que adicionar ácido acético a baja concentración para mantener estable el sistema, lo que no fue necesario para los tratamientos T2 y T4 en donde la bacteria iniciadora fue *E. faecium*, y que generó una cantidad considerable de ácidos orgánicos con potencial uso en diferentes áreas de la industria. El aumento en la acidez total titulable en T2 y T4 es un indicador de la eficiencia del proceso fermentativo, reflejando la acumulación de ácidos orgánicos, como resultado de la actividad metabólica de *E. faecium*.

Los rendimientos del proceso oscilaron entre 58.36 - 62.01%, por arriba de lo obtenido por el método químico convencional que fue de 32.73 - 39.97% lo que indica una mayor eficiencia y rentabilidad del proceso. Aunque resulta necesario evaluar el contenido de proteína residual en el material que pudiera mantener estos valores elevados, se conoce que el proceso químico causa la despolimerización de la cadena de quitina, por ello es que los rendimientos son menores.

La coloración de las muestras indica una fuerte unión entre la quitina y la melanina por lo que resulta necesario evaluar diferentes condiciones de proceso para eliminar la mayor cantidad de este pigmento. El proceso biotecnológico no sólo brinda la posibilidad de obtener un material con pesos moleculares altos, sino que también posibilita la obtención de subproductos como ácidos orgánicos y aminoácidos, además de ser amigable con el ecosistema.

Aunque no fue posible determinar con precisión el contenido de nitrógeno, grasas y fibra del material debido a la falta de resultados consistentes, se logró obtener información relevante sobre otras propiedades fundamentales en el proceso de extracción de quitina mediante fermentación

con BAL. Los cuales proporcionan una visión integral del impacto del proceso en la estructura y composición del material. Estos resultados logran cumplir en gran parte con los objetivos iniciales y contribuyen a una mejor comprensión de la eficiencia del método fermentativo y pueden servir como base para futuras optimizaciones del proceso.

RECOMENDACIONES.

Es importante realizar la caracterización fisicoquímica del material inicial y el material obtenido, pues esto dará una idea más clara sobre la eficiencia del proceso, así como también permitiría dilucidar las mejores condiciones para la posible transformación de este material y las aplicaciones.

Se recomienda establecer un parámetro inicial referente a las condiciones a las que se encuentre la muestra antes del proceso fermentativo, como un lavado y secado, aplicación de alcohol, etc; la presencia de microorganismos en la muestra es un factor clave para el éxito de la fermentación ácido-láctica pues es imprescindible dar a las BAL las condiciones ideales, lo que resulta complicado al realizar fermentaciones de este tipo sin tratar previamente el material.

Se deben evaluar otras técnicas de caracterización y considerar nuevos parámetros, como el perfil de ácidos orgánicos generados, aminoácidos, proteínas, consumo de azúcares, etc. Esto complementaría en gran medida este estudio, haciéndolo más robusto.

Es de gran importancia también conocer el proceso y discutir con balances de materia qué es lo que pasa durante el proceso, la obtención de quitina es un proceso de purificación, lo que indica la remoción de compuestos no deseados, como minerales, proteínas, grasas, pigmentos, entre otros, este análisis ayudaría a conocer el comportamiento del material y los compuestos presentes ante la presencia de los ácidos o posibles enzimas generadas por los microorganismos.

Emplear métodos más sensibles y específicos, como la espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) para proteínas, extracción Soxhlet con disolventes adecuados para grasas, y el método de Dumas como alternativa más precisa al de Kjeldahl para el análisis de nitrógeno, minimizando así posibles interferencias y variaciones en los resultados.

Plantarse nuevas preguntas de investigación ayudaría en gran medida a realizar un nuevo trabajo con mejor enfoque y eliminando prácticas no requeridas, así como hacer más eficiente el uso de reactivos al realizar únicamente los experimentos pertinentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- AIEA, V. A. (2022a). *Manual de Control de Calidad del Producto en la Cría masiva y Liberación de Moscas de la Fruta Estériles*. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/ipc/public/manuals->
- AIEA, V. A. (2022b). *Programa Nacional de moscas de la fruta*.
- Álvarez, G. E. G., & Baena, L. M. (2022). Physicochemical characterization and morphological properties of chitin and chitosan from *Bombyx mori* L. Hybrid Píamo 1. *Acta Agronomica*, 71(1), 29–38. <https://doi.org/10.15446/acag.v71n1.100854>
- Angélica, M., & Martín, B. (2019). *Aplicación de la fermentación láctica como estrategia de transformación y valorización de matrices vegetales*. <http://www.tdx.cat/?locale->
- Barreto Cardoso, M., Signini, R., & Paulo Campana-Filho, S. (2001). On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. In *Polymer Bulletin* (Vol. 47).
- Brovko, O. S., Ivakhnov, A. D., Zhiltsov, D. V., & Boitsova, T. A. (2023). Extraction of Chitin-Containing Complexes from the *Fomes fomentarius* Fungus Fruiting Body by the Sub- and Supercritical Fluid Extraction Methods. *Russian Journal of Physical Chemistry B*, 17(7), 1519–1525. <https://doi.org/10.1134/S199079312307014X>
- Calderón-Parra, J., Santiago, A. D. de, & Díaz, A. C. (2022). Enterococcal infections. *Medicine (Spain)*, 13(50), 2909–2918. <https://doi.org/10.1016/j.med.2022.02.020>
- Caligiani, A., Marseglia, A., Leni, G., Baldassarre, S., Maistrello, L., Dossena, A., & Sforza, S. (2018). Composition of black soldier fly prepupae and systematic approaches for extraction and fractionation of proteins, lipids and chitin. *Food Research International*, 105, 812–820. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.012>
- Carmen Guadalupe Manzanarez Quin. (2016). *SELECCIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS NATIVAS PRODUCTORAS DE ÁCIDO γ - AMINO BUTÍRICO AISLADAS A PARTIR DE QUESOS ARTESANALES MEXICANOS*.

- Castañeda Barrera, M. (2016). *OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO PROVENIENTE DE QUITINA DE CUATRO ESPECIES DE INSECTOS Y EVALUACION PRELIMINAR DE SU USO EN REMOCIÓN DE CROMO EN AGUA*.
- Castro, R., Guerrero-Legarreta, I., & Bórquez, R. (2018). Chitin extraction from *Allopetrolisthes punctatus* crab using lactic fermentation. *Biotechnology Reports*, 20. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2018.e00287>
- Chávez Monserrat, L. (2013). *TESIS: SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MATERIALES CON BASE EN QUITOSANO, OBTENIDO MEDIANTE DESACETILACIÓN HETEROGÉNEA DE QUITINA EXTRAÍDA POR UN MÉTODO BIOLÓGICO*.
- Colina, M., Ayala, A., Rincón, D., Molina, J., Medina, J., Ynciarte, R., Vargas, J., & Montilla, B. (2014). EVALUACIÓN DE LOS PROCESOS PARA LA OBTENCIÓN QUÍMICA DE QUITINA Y QUITOSANO A PARTIR DE DESECHOS DE CANGEJOS. ESCALA PILOTO E INDUSTRIAL. In *Rev. Iberoam. Polim* (Vol. 15, Issue 1).
- Dubey, A. K., Podia, M., Priyanka, Raut, S., Singh, S., Pinnaka, A. K., & Khatri, N. (2021). Insight Into the Beneficial Role of *Lactiplantibacillus plantarum* Supernatant Against Bacterial Infections, Oxidative Stress, and Wound Healing in A549 Cells and BALB/c Mice. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.728614>
- Eggink, K. M., & Dalsgaard, J. (2023). Chitin contents in different black soldier fly (*Hermetia illucens*) life stages. *Journal of Insects as Food and Feed*, 9(7), 855–863. <https://doi.org/10.3920/JIFF2022.0142>
- Gharibzadeh, M., Osfouri, S., Jamekhorshid, A., & Jafari, S. A. (2023). Microbial chitin extraction and characterization from green tiger shrimp waste: A comparative study of culture mediums along with bioprocess optimization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125213>
- Greca, L. G., Azpiazu, A., Reyes, G., Rojas, O. J., Tardy, B. L., & Lizundia, E. (2024). Chitin-based pulps: Structure-property relationships and environmental sustainability. *Carbohydrate Polymers*, 325. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121561>

- Hikmate Abriouel, Nabil Ben Omar, Rosario Lucas López, & Antonio Gálvez. (2008). *La doble faceta del género Enterococcus, y su importancia en alimentos*.
- Iber, B. T., Kasan, N. A., Torsabo, D., & Omuwa, J. W. (2022). A review of various sources of chitin and chitosan in nature. In *Journal of Renewable Materials* (Vol. 10, Issue 4, pp. 1097–1123). Tech Science Press. <https://doi.org/10.32604/JRM.2022.018142>
- Ignacio Polo. (2016). *OBTENCIÓN DE QUITINA A PARTIR DE PRODUCTOS DE DESECHO*.
- Iveth Sáenz Mendoza, Alma Palomino Artejo, & Manuel Tirado Gallegos. (2019). *CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA, MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURAL DE LA QUITINA Y QUITOSANO DE LOS INSECTOS Tenebrio molitor Y Galleria mellonella* (Vol. 18, Issue 1). <https://www.researchgate.net/publication/334207332Physicochemical,morphologicalandstructuralcharacterizationofthechitinandchitosanofTenebriomolitorandGalleriamellonellainsects>
- Jorge Delezuk, Adriana Pavinatto, & Sérgio P. Campana-Filho. (2019). ScienceDirect Influence of the process parameters on β -chitin and α -chitin extraction: probing about the grinding and particles size. In *Materials Today: Proceedings* (Vol. 14). www.sciencedirect.com
- José Carmen Ramírez Ramírez. (2007). *Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud*.
- Jose Liedo Fernández, Jorge Toledo Arreola, & Lorena Ruiz-Montoya. (2009). *Manejo evolutivo de plagas: las MOSCAS de la FRUTA*.
- José Loera. (2017). *FICHA TÉCNICA Mosca mexicana de la fruta Anastrepha ludens (Loew) Elaborada por*.
- Jurado Gámez, H., & Jarrín Jarrín, V. (2015). Cinética de crecimiento de Lactobacillus lactis y determinación del efecto probiótico en cepas patógenas. *Biosalud*, 14(2), 49–62. <https://doi.org/10.17151/biosa.2015.14.2.5>
- Jurado-Gámez, H., Ramírez, C., & Aguirre, D. (2013). *Cinética de fermentación de Lactobacillus plantarum en un medio de cultivo enriquecido como potencial probiótico*.

- Koc-Bilican, B., & Çakmak, E. (2024). Removing the uncertainty of chitin structure in chitons (Mollusca: Polyplacophora: Chitonida). *Zoologischer Anzeiger*, 310, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2024.05.002>
- Li, Z., Li, M. C., Liu, C., Liu, X., Lu, Y., Zhou, G., Liu, C., & Mei, C. (2023). Microwave-assisted deep eutectic solvent extraction of chitin from crayfish shell wastes for 3D printable inks. *Industrial Crops and Products*, 194. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.116325>
- Lozano Claudia. (2022). “*EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE QUITINA DE LA CÁSCARA DE CAMARÓN (Litopenaeus vannamei), OBTENIDA ENZIMÁTICAMENTE CON PAPAÍNA Y QUIMOTRIPSINA.*”
- Luo, Q., Wang, Y., Han, Q., Ji, L., Zhang, H., Fei, Z., & Wang, Y. (2019). Comparison of the physicochemical, rheological, and morphologic properties of chitosan from four insects. *Carbohydrate Polymers*, 209, 266–275. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.01.030>
- Marcia, E., Malespín, J., Sánchez, M., & Benavente, M. (2011). *Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos * Autor para la correspondencia*. 24(1), 33–42. www.nexo.uni.edu.ni
- Marinela Nazareth Colina Rincón, D., Karen Dianne Medina Robles, L., Jose Alejandro Vargas Colina, I., Isabel Rincón Prieto, D., Rossana Arismendi, L., & Brinolfo Montilla, L. (2017). Extracción de Quitina Utilizando Ácido Láctico EXTRACCIÓN DE QUITINA UTILIZANDO ÁCIDO LÁCTICO CHITIN EXTRACTION USING LACTIC ACID. In *Publicación Cuatrimestral* (Vol. 2, Issue 2).
- Martín, E., Palma, M., Mercedes, J., Rocha, M., Martha, L. E., Silva, B., & Alejandro Hernández, L. (2013). *Estudio de la Fermentación Láctica para la Recuperación de Quitina a partir de Desechos de Camarón y Langostino*.
- Martín-López, H., Ayora-Talavera, T., Liedo, P., Ramos-Díaz, A., Herrera-Rodríguez, S., Cuevas-Bernardino, J. C., & Pacheco, N. (2024). The Mexican fruit fly puparia (*Anastrepha ludens*) and the black soldier fly imagoes (*Hermetia illucens*), promising alternative sources of chitin. *MRS Advances*. <https://doi.org/10.1557/s43580-024-01008-7>

- Muthukrishnan, S., Merzendorfer, H., Arakane, Y., & Kramer, K. J. (2011). Chitin Metabolism in Insects. In *Insect Molecular Biology and Biochemistry* (pp. 193–235). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384747-8.10007-8>
- Nelly Medina. (2017). *EFEECTO DEL ULTRASONIDO EN LA EXTRACCIÓN Y NANOENCAPSULACIÓN DE POLIFENOLES DE LIMÓN PERSA (CITRUS LATIFOLIA)*.
- Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., & Aiello-Mazzarri, C. (2012). *Quitina y Quitosano, polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones*. <https://www.researchgate.net/publication/235431334>
- Quintero-Fong, L., Luis, J. H., Montoya, P., & Orozco-Dávila, D. (2018). In situ sexual competition between sterile males of the genetic sexing Tapachula-7 strain and wild *Anastrepha ludens* flies. *Crop Protection*, 106, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.12.001>
- Rao, M. S., Munä Oz, J., & Stevens, W. F. (2000). *Critical factors in chitin production by fermentation of shrimp biowaste*.
- Ruiz-Arce, R., Owen, C. L., Thomas, D. B., Barr, N. B., & McPheron, B. A. (2015). Phylogeographic Structure in *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae) Populations Inferred With mtDNA Sequencing. *Journal of Economic Entomology*, 108(3), 1324–1336. <https://doi.org/10.1093/jee/fov082>
- Tharanathan, R. N. (2003). Biodegradable films and composite coatings: Past, present and future. In *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 14, Issue 3, pp. 71–78). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(02\)00280-7](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00280-7)
- Tolesa, L. D., Gupta, B. S., & Lee, M. J. (2019). Chitin and chitosan production from shrimp shells using ammonium-based ionic liquids. *International Journal of Biological Macromolecules*, 130, 818–826. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.018>
- Vallejo-Domínguez, D., Rubio-Rosas, E., Aguila-Almanza, E., Hernández-Cocoletzi, H., Ramos-Cassellis, M. E., Luna-Guevara, M. L., Rambabu, K., Manickam, S., Siti Halimatul Munawaroh, H., & Loke Show, P. (2021). Ultrasound in the deproteinization process for

- chitin and chitosan production. *Ultrasonics Sonochemistry*, 72. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105417>
- Van Huis, A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 58, pp. 563–583). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153704>
- Vega Jacqueline, M., Itzela Quintero-Montenegro, R., & Junca, H. (2024). *CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR DE BACTERIAS ÁCIDO LACTICAS*. <https://orcid.org/0000-0002-4303-4994>
- Xiong, A., Ruan, L., Ye, K., Huang, Z., & Yu, C. (2023). Extraction of Chitin from Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and Its Puparium by Using Biological Treatment. *Life*, 13(7). <https://doi.org/10.3390/life13071424>
- Yuan, B. Q., Yu, T. H., Chen, S. C., Zhang, Z. Q., Guo, Z. K., Huang, G. X., Xiao, J. hua, & Huang, D. W. (2024). Physical and chemical characterization of chitin and chitosan extracted under different treatments from black soldier fly. *International Journal of Biological Macromolecules*, 279. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.135228>
- Zepeda-Cisneros, C. S., Hernández, J. S. M., García-Martínez, V., Ibañez-Palacios, J., Zacharopoulou, A., & Franz, G. (2014). Development, genetic and cytogenetic analyses of genetic sexing strains of the Mexican fruit fly, *Anastrepha ludens* Loew (Diptera: Tephritidae). *BMC Genetics*, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S1>
- Zubiria Suarez, J., Jiménez, A., & las Salas, D. (2014). Ciencia e Ingeniería ANALISIS DE LOS METODOS PARA EXTRACCION DE QUITINA DE LOS RESIDUOS DE CAMARON SEGUN PARAMETROS ECONOMICOS Y AMBIENTALES ANALYSIS METHODS FOR REMOVING WASTE CHITIN SHRIMP AND ENVIRONMENTAL ECONOMIC PARAMETERS AS. *Julio-Diciembre*, 1.