

## Evaluación antimicrobiana de quitosano de caparazón de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), encapsulado sobre filetes de merluza *Merluccius gayi* (Guichenot, 1848)

Diego Carrillo Freire<sup>1,3</sup> , Luis Humberto Vásquez Cortez<sup>2,3</sup> , Luis Jordan Aguilar Ledesma<sup>2</sup> , Norwin Bravo<sup>3</sup> ,  
Mario Efrén Rendon Almeida<sup>2</sup> , Eduardo Neptali Colina Navarrete<sup>2</sup> , Luis Humberto Torres Salcedo<sup>3</sup> ,  
Fausto Freddy Soledispa Lucas<sup>5</sup> , Sanyí Lorena Rodríguez Cevallos<sup>3</sup> .

**Resumen:** Evaluación antimicrobiana de quitosano de caparazón de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), encapsulado sobre filetes de merluza *Merluccius gayi* (Guichenot, 1848). **Introducción:** El quitosano, biopolímero derivado de la quitina, posee propiedades antimicrobianas, antifúngicas y la capacidad de formar películas biodegradables, lo que lo convierte en un conservante natural prometedor para productos pesqueros. Su encapsulación permite una liberación controlada y mejora su estabilidad. **Objetivo:** Evaluar la eficacia del quitosano extraído de caparazones de *Litopenaeus vannamei*, encapsulado en fosfatidilcolina de soja, aplicado como recubrimiento sobre filetes de merluza (*Merluccius gayi*) almacenados al vacío a temperatura ambiente y a 4 °C. **Materiales y métodos:** El quitosano fue encapsulado mediante gelación iónica y aplicado sobre los filetes como película protectora. Se evaluaron parámetros fisicoquímicos (textura, elasticidad, pH) y microbiológicos. Las muestras fueron analizadas en el laboratorio de CESECCA, determinando la presencia de *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* y el conteo total de aerobios y anaerobios, conforme a la norma INEN 183:2013. **Resultados:** Las muestras tratadas presentaron una notable reducción del crecimiento microbiano. No se detectaron *Vibrio parahaemolyticus* ni *Vibrio cholerae* en los filetes recubiertos. Los niveles de aerobios y anaerobios totales se mantuvieron dentro de los límites establecidos. Además, los parámetros fisicoquímicos indicaron una mejor conservación en comparación con los controles, especialmente bajo refrigeración. **Conclusiones:** La encapsulación del quitosano constituye una alternativa sostenible y eficaz frente a conservantes químicos, permitiendo prolongar la vida útil y garantizar la seguridad microbiológica de productos pesqueros sin afectar sus propiedades sensoriales. Esta estrategia responde a la creciente demanda de soluciones naturales, seguras y ecológicas en la industria alimentaria, promoviendo alimentos de alta calidad y menor impacto ambiental. **Arch Latinoam Nutr 2025; 75(4): 254-265.**

**Palabras clave:** camarón, quitosano, hidrólisis ácida, exoesqueleto.

**Abstract:** Antimicrobial evaluation of encapsulated chitosan from white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) on fillets *Merluccius gayi* (Guichenot, 1848). **Introduction:** Chitosan, a biopolymer derived from chitin, exhibits antimicrobial and antifungal properties and can form biodegradable films, making it a promising natural preservative for seafood. Its encapsulation enables controlled release and increases stability. **Objective:** To evaluate the effectiveness of chitosan extracted from *Litopenaeus vannamei* shells, encapsulated in soybean phosphatidylcholine, applied as a coating on *Merluccius gayi* fillets stored under vacuum at room temperature and 4 °C. **Materials and methods:** Chitosan was encapsulated by ionic gelation and applied to fish fillets as a protective film. Physicochemical parameters (texture, elasticity, pH) and microbiological indicators were analyzed. Samples were tested at CESECCA laboratory to detect *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, and total aerobic and anaerobic counts, according to INEN 183:2013 standards. **Results:** Treated samples showed a significant reduction in microbial growth. *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* were not detected in coated fillets. Aerobic and anaerobic bacteria levels remained within acceptable limits. Physicochemical tests revealed improved preservation compared to controls, particularly under refrigerated conditions, with better pH and texture retention. **Conclusions:** Encapsulated chitosan is a sustainable and effective alternative to conventional preservatives, extending shelf life and enhancing food safety in seafood products without altering sensory properties. This strategy aligns with the increasing demand for natural, eco-friendly preservation methods in the food industry, supporting high-quality production and reduced environmental impact. **Arch Latinoam Nutr 2025; 75(4): 254-265.**

**Keywords:** shrimp, chitosan, acid hydrolysis, exoskeleton.

### Introducción

La quitina es un polisacárido estructural lineal compuesto por unidades repetidas de N-acetil-D-glucosamina unidas mediante enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$ , que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, principalmente en los exoesqueletos

<sup>1</sup>Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías, Manta, Ecuador. <sup>2</sup>Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Babahoyo, Los Ríos. <sup>3</sup>Universidad Nacional de Cuyo, Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria, ICAI-CONICET. <sup>4</sup>Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí Facultad de Administración, Contables y Comercio. Autor para la correspondencia: Diego Carrillo Freire, e-mail: carrillofreirediego@gmail.com



de crustáceos, insectos, cangrejos y en las paredes celulares de hongos. Después de la celulosa, constituye el segundo biopolímero más abundante a nivel mundial. Entre las fuentes más importantes de quitina destacan los residuos generados por la industria acuícola, especialmente los caparazones de camarón y cangrejo, los cuales representan un desafío ambiental significativo debido a su lenta degradación y acumulación. La valorización de estos desechos mediante procesos de extracción de quitina y su posterior transformación en quitosano se enmarca dentro de los principios de la economía circular, ofreciendo una alternativa sostenible para reducir el impacto ambiental de los residuos marinos.

El quitosano es un biopolímero derivado de la quitina presente en exoesqueletos de crustáceos, ampliamente estudiado por sus propiedades antimicrobianas, capacidad para formar películas biodegradables y su potencial uso en conservación de alimentos, medicina y aplicaciones ambientales (1,3). Su biodegradabilidad, biocompatibilidad y versatilidad tecnológica lo posicionan como un material funcional de gran interés en diferentes industrias (4,5). Además, variables estructurales como el peso molecular y el grado de desacetilación influyen directamente en su solubilidad y actividad biológica, modulando su comportamiento en sistemas alimentarios y biomédicos (6).

La aplicación de recubrimientos a base de quitosano en productos pesqueros ha sido objeto de múltiples investigaciones internacionales, demostrando su eficacia para prolongar la vida útil, inhibir microorganismos patógenos y mantener parámetros sensoriales de calidad. Estudios en filetes de trucha, salmón y tilapia han evidenciado reducciones significativas en los recuentos microbianos y un retraso en el deterioro al aplicar recubrimientos de quitosano, especialmente cuando se combinan con aceites esenciales (7,9). A nivel tecnológico, se han desarrollado películas activas e inteligentes basadas en quitosano que incorporan compuestos antimicrobianos o indicadores de frescura, aportando soluciones innovadoras para el envasado de alimentos (10,11).

Estos enfoques permiten reducir el impacto ambiental y mejorar el rendimiento del biopolímero para diferentes aplicaciones industriales. La revisión enfatiza que los recubrimientos de polisacáridos pueden actuar como barreras contra la pérdida de humedad y la entrada de patógenos, lo que contribuye a la seguridad alimentaria. Además, los autores discuten las propiedades funcionales de diferentes polisacáridos, sugiriendo que su aplicación podría ser clave para reducir el desperdicio de alimentos y promover prácticas más sostenibles en la industria alimentaria (9).

En el presente estudio se evaluará la capacidad del quitosano extraído de residuos de caparazón de *Litopenaeus vannamei*, encapsulado en fosfatidilcolina de soya, para prolongar la vida útil de filetes de merluza (*Merluccius gayi*) almacenados bajo condiciones controladas. Se analizarán propiedades químicas, físicas y microbiológicas, incluyendo textura, elasticidad, pH, carga microbiana y presencia de patógenos relevantes como *Vibrio parahaemolyticus*.

El quitosano presenta aplicaciones específicas y una relevancia actual demostrada en múltiples sectores: en la conservación de alimentos se emplea como recubrimiento y película comestible para frutas, hortalizas y productos cárnicos, mostrando en estudios experimentales y revisiones una prolongación de la vida útil mediante la reducción de la respiración, la pérdida de agua y el crecimiento microbiano (1,5).

El estudio de Carrillo Freire et al. (12) demostró que la encapsulación de compuestos bioactivos en matrices de alginato de sodio puede mejorar significativamente su estabilidad frente a factores ambientales como la luz ultravioleta tipo C, así como su biodisponibilidad y propiedades de foto protección. Estos hallazgos refuerzan la aplicabilidad de sistemas de encapsulación para preservar la actividad funcional de agentes antimicrobianos o bioactivos en alimentos y productos biotecnológicos. De manera análoga, el presente trabajo utiliza quitosano encapsulado como material activo, beneficiándose de la protección que ofrece la matriz para mantener su actividad antimicrobiana durante el almacenamiento en filetes de merluza (*Merluccius gayi*), asegurando así un efecto prolongado y controlado frente a la carga microbiana.

En los últimos años, el uso de nanopartículas de quitosano ha ganado atención como una alternativa prometedora para combatir patógenos alimentarios.

Dadas estas características, el quitosano ha sido ampliamente investigado como base para el desarrollo de apósitos antibacterianos destinados al tratamiento de heridas crónicas, como las asociadas a diabetes o enfermedades hepáticas, que representan un reto creciente en el ámbito clínico. Diversos estudios han profundizado en el potencial de los biomateriales basados en quitosano y en las estrategias dirigidas a potenciar sus beneficios mediante la incorporación de compuestos bioactivos. En conjunto, estas evidencias refuerzan la relevancia del quitosano como una alternativa prometedora en el diseño de sistemas avanzados para el cuidado y la cicatrización de heridas (13).

En síntesis, el quitosano representa un biopolímero multifuncional con gran potencial en la conservación de alimentos, la industria biomédica y la protección ambiental. Su obtención a partir de residuos de camarón no solo contribuye a la valorización de subproductos marinos, sino que también responde a la creciente demanda de materiales sostenibles, seguros y eficaces en diversas áreas tecnológicas y científicas.

Los recubrimientos comestibles a base de quitosano se han consolidado como una alternativa eficaz para reducir el deterioro microbiano y prolongar la vida útil de productos pesqueros altamente perecederos. Su naturaleza catiónica favorece la interacción con las membranas celulares de bacterias Gram negativas, generando efectos antimicrobianos directos que retrasan el crecimiento de patógenos y microorganismos alterantes durante el almacenamiento en refrigeración. Además, la capacidad del quitosano para formar películas semipermeables contribuye a disminuir la pérdida de humedad, la oxidación lipídica y el ablandamiento de la textura, factores críticos en la calidad postmortem del camarón. Estudios previos han demostrado que la combinación de quitosano con otros biopolímeros, como la gelatina, mejora aún más la estabilidad fisicoquímica y sensorial del *Litopenaeus vannamei* bajo condiciones refrigeradas, evidenciando reducciones significativas en los recuentos microbianos y en los índices de deterioro durante el almacenamiento prolongado (14).

La interacción electrostática entre el quitosano y las membranas bacterianas contribuye a la inhibición del crecimiento microbiano, lo que se traduce en una mayor estabilidad del producto y una extensión

significativa de su vida útil. Investigaciones recientes han reportado que la aplicación de recubrimientos basados en quitosano mejora de forma notable los parámetros fisicoquímicos y sensoriales del camarón refrigerado, reduciendo el deterioro estructural y la proliferación microbiana durante el almacenamiento prolongado (15).

En investigaciones realizadas con productos reestructurados a base de surimi de *Pangasianodon hypophthalmus*, la aplicación de quitosano mostró reducciones significativas en los recuentos de microorganismos alterantes y una mejora en los parámetros sensoriales y de textura, extendiendo la vida útil durante el almacenamiento en frío (16).

La aplicación de recubrimientos comestibles basados en mezclas de alginato y quitosano ha mostrado un impacto significativo en la preservación de la calidad del camarón durante el almacenamiento en frío demostraron que la incorporación del sobrenadante libre de células de *Streptococcus thermophilus* FUA 329 en esta matriz polimérica potencia la acción antimicrobiana del sistema, reduciendo los recuentos microbianos y retardando el deterioro físico y químico del *Litopenaeus vannamei*. Los autores evidenciaron mejoras notables en parámetros como el pH, la estabilidad del color, el contenido de compuestos volátiles totales y la aceptabilidad sensorial, permitiendo una extensión significativa de la vida útil del producto durante el almacenamiento refrigerado (17).

## Materiales y métodos

La quitina fue extraída de los desechos de camarón proporcionados por empresas procesadoras locales, mediante procesos de desproteínización, desmineralización y despigmentación a escala de laboratorio. Posteriormente, la quitina obtenida fue sometida a un proceso de desacetilación para la obtención de quitosano, el cual se encapsuló

y aplicó como recubrimiento sobre filetes de merluza (*Merluccius gayi*).

El estudio se llevó a cabo con el propósito de evaluar la eficacia antimicrobiana del quitosano extraído del caparazón de camarón (*Litopenaeus vannamei*), encapsulado y aplicado sobre filetes de merluza (*Merluccius gayi*), así como determinar el rendimiento de extracción de quitina y quitosano. Para ello, se diseñó un procedimiento experimental que comprendió la extracción, caracterización y aplicación del biopolímero, seguido de análisis microbiológicos y de rendimiento. La investigación se desarrolló en las instalaciones del Centro de Estudios en Seguridad y Calidad Alimentaria (CESSECA), donde se realizaron los análisis microbiológicos correspondientes, garantizando el cumplimiento de protocolos estandarizados para la evaluación de la actividad antimicrobiana. Esta estructura metodológica permitió establecer un enfoque sistemático para relacionar la eficacia del quitosano encapsulado con su potencial de uso como agente conservante en productos pesqueros.

El uso de métodos biológicos como enzimas específicas (chitosanasas, quitinasas) o microorganismos productores de enzima representa una alternativa más sostenible frente a los tratamientos químicos convencionales para la modificación y depolimerización del quitosano, ya que permite controlar de forma más precisa el tamaño de cadena, obtener oligosacáridos con bioactividades definidas y reducir el uso de reactivos agresivos y subproductos tóxicos (6). Por otro lado, técnicas físicas como la sonicación (ultrasonido) y la irradiación ( $\gamma$ -ray o *electron beam*) se han aplicado para mejorar propiedades específicas: la sonicación facilita la reducción del peso molecular, incrementa la solubilidad y mejora la dispersión de las soluciones, mientras que la irradiación permite una ruptura controlada de cadenas que potencia la bioactividad, la capacidad antioxidante y la funcionalidad antimicrobiana en determinados rangos de dosis. El uso de recubrimientos de quitosano de alto peso molecular ha

demostrado ser una estrategia efectiva para mejorar la calidad y la vida útil de los filetes de bagre refrigerados. Los resultados sugieren que el quitosano puede ser una alternativa viable a los conservantes químicos tradicionales, ofreciendo beneficios tanto para la calidad del producto como para la salud del consumidor (7,8).

El quitosano presenta aplicaciones concretas y evidencia comprobada en múltiples sectores: en conservación de alimentos, recubrimientos y películas comestibles aplicados a frutas (manzana, fresa, mango), hortalizas y productos cárnicos han mostrado reducción de la respiración, menor pérdida de peso y descenso de recuentos microbianos, lo que se traduce en una prolongación significativa de la vida útil frente a controles sin tratamiento (10). Los resultados sugieren que estos materiales biodegradables podrían desempeñar un papel crucial en la mejora de la vida útil de los productos alimenticios y en la promoción de un futuro más sostenible.

#### *Desproteínización*

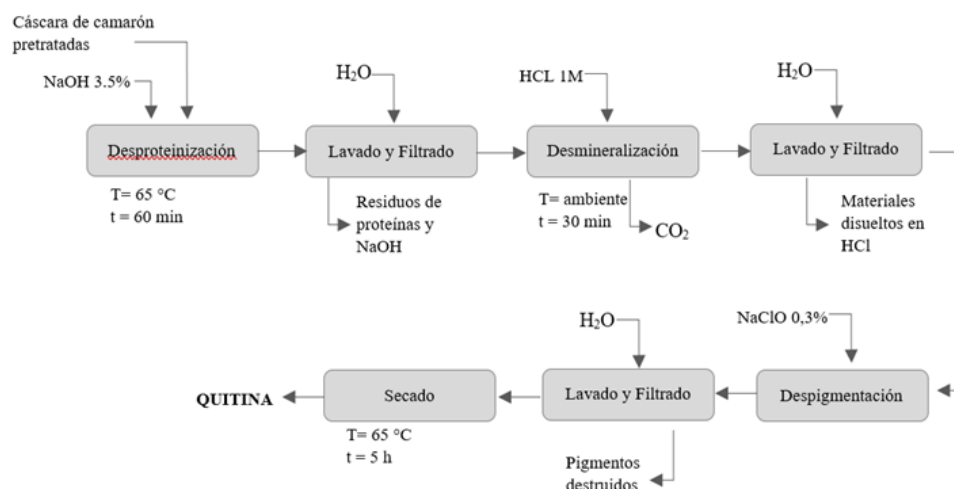
La desproteínización se realizó para eliminar proteínas presentes en el caparazón, como se observa en la (Figura 1). Diagrama de flujo de pretratamiento de materia prima, se colocaron 100 g de caparazón seco en un vaso de precipitación de 2 L y se adicionó una disolución de NaOH al 3,5% p/p en una relación 1:10 (p/v). La mezcla se calentó a 65 °C durante 60 min, bajo agitación constante a 250 rpm. Posteriormente, se filtró y lavó con abundante agua destilada hasta alcanzar un pH neutro (~7).

#### *Desmineralización*

El material desproteínizado fue tratado con HCl 1 M, en una relación 1:15 (p/v), a temperatura ambiente con agitación a 280 rpm durante 30 min. La reacción disuelve los carbonatos liberando CO<sub>2</sub>. Luego se filtró y lavó hasta neutralidad.

#### *Despigmentación*

Para eliminar pigmentos residuales, la pasta resultante se trató con NaClO al 0,3% p/p, en una relación 1:20 (p/v), durante 20 min a temperatura ambiente. Se lavó con agua destilada, se filtró y se secó en estufa a 60 °C durante 5 h. Esta secuencia permitió obtener quitina con bajo contenido proteico y mineral.



**Figura 1.** Diagrama de flujo de pretratamiento de materia prima

#### *Obtención de Quitosano (N-desacetilación)*

La obtención de quitosano a partir de la quitina se realizó mediante desacetilación alcalina. La quitina seca se trató con una solución de NaOH al 50% p/p en una relación 1:15 (p/v), bajo agitación constante. La mezcla se mantuvo a 100 °C durante 2 h, promoviendo la N-desacetilación de los grupos acetilo. Una vez finalizado el proceso, el material se lavó repetidamente con agua destilada hasta alcanzar un pH neutro y se secó a 60 °C hasta peso constante. El producto final corresponde a quitosano parcialmente desacetilado, apto para aplicaciones alimentarias y encapsulación.

#### *Preparación de la Solución de Quitosano y Encapsulación*

##### *Hidrólisis ácida*

La quitina extraída del caparazón de *Litopenaeus vannamei* fue sometida a un proceso de desacetilación alcalina para obtener quitosano, el cual constituyó el material activo a encapsular. El quitosano se obtuvo exclusivamente mediante desacetilación alcalina. Sin embargo, en la metodología experimental aquí presentada, el quitosano se obtuvo exclusivamente mediante el proceso de N-desacetilación alcalina, y este quitosano fue el material encapsulado y aplicado como recubrimiento en filetes de merluza.

##### *Preparación de la solución de quitosano*

Para la encapsulación, se preparó una solución acuosa de quitosano al 1% (p/v) disolviendo el biopolímero

en ácido acético glacial al 1% (v/v), bajo agitación magnética constante durante 12 h a temperatura ambiente hasta lograr una solución completamente homogénea y transparente. La solución se filtró para eliminar impurezas no disueltas y se mantuvo en agitación suave hasta su uso.

##### *Encapsulación por gelificación iónica*

La solución de quitosano fue encapsulada utilizando la técnica de gelificación iónica con alginato de sodio. Se preparó previamente una solución de alginato de sodio al 1% (p/v) en agua destilada, agitada hasta homogeneización completa. Posteriormente, la solución de quitosano se incorporó a la matriz de alginato y se homogenizó durante 10 min para asegurar una distribución uniforme.

La mezcla obtenida se introdujo gota a gota en una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 0,1 M, mediante un sistema de goteo controlado. Se utilizó una jeringa manual acoplada a una aguja de acero inoxidable de 0,6 mm de diámetro interno, lo cual permitió obtener microcápsulas esféricas con tamaño homogéneo. Las gotas formadas se mantuvieron en la solución de  $\text{CaCl}_2$  durante 30 min para completar la reticulación. Finalmente, las microcápsulas se lavaron con agua destilada para eliminar iones libres de calcio y se conservaron en refrigeración hasta su aplicación.

La formación de microcápsulas se llevó a cabo mediante un sistema de goteo controlado, en el que la solución de quitosano se extruyó gota a gota sobre una solución de gelificación, generando microcápsulas por gelificación iónica. Para asegurar la uniformidad del tamaño, se utilizó una jeringa con aguja de acero inoxidable de 0,6 mm de diámetro, controlando el flujo mediante una bomba peristáltica (o en su defecto, manualmente de forma homogénea). Las microcápsulas obtenidas se dejaron curar durante un tiempo determinado para estabilizar su estructura antes de ser recolectadas, lavadas y aplicadas sobre los filetes de merluza.

#### *Diseño experimental y tratamientos*

Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro tratamientos y tres repeticiones por tratamiento. Cada repetición correspondió a un lote independiente de filetes de merluza tratados bajo condiciones idénticas.

Los tratamientos evaluados fueron: con el objetivo de analizar el efecto de recubrimientos a base de quitosano y quitosano encapsulado sobre su conservación microbiológica. El tratamiento T1 correspondió al control negativo, compuesto por filetes sin ningún tipo de recubrimiento. T2 consistió en la aplicación de una solución de quitosano sin encapsular al 0,5 % (p/v), mientras que T3 empleó una solución de quitosano sin encapsular al 1 % (p/v). Finalmente, T4 incluyó la aplicación de un recubrimiento elaborado con microcápsulas de quitosano al 1 % (p/v), obtenidas mediante la técnica de gelificación iónica. Esta distribución experimental permitió comparar el efecto de diferentes concentraciones de quitosano libre y de su forma encapsulada sobre la estabilidad microbiológica y sensorial de los filetes durante el almacenamiento.

#### *Preparación de los filetes de merluza*

Los filetes de *Merluccius gayi* se adquirieron frescos de un centro de procesamiento autorizado. Los filetes de merluza (*Merluccius gayi*) utilizados fueron adquiridos en un centro de distribución autorizado, seleccionándose piezas frescas de tamaño y peso estandarizados ( $100 \pm 5$  g;  $15 \times 6 \times$

$1,5$  cm) para minimizar la variabilidad experimental. Previamente a la aplicación de tratamientos, los filetes fueron limpiados con agua destilada estéril, escurridos en bandejas de acero inoxidable desinfectadas y secados con papel absorbente estéril, realizando todas las manipulaciones en una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones cruzadas. Se establecieron tres grupos experimentales: (i) control negativo, filetes sin tratamiento, utilizados para observar la evolución natural de la microbiota durante el almacenamiento; (ii) control positivo (opcional), filetes tratados con un conservante comercial aprobado, con el fin de comparar la eficacia frente a un método convencional; y (iii) tratamiento con quitosano encapsulado, filetes sumergidos durante 2 min en la suspensión de microcápsulas de quitosano, asegurando un recubrimiento homogéneo. Posteriormente, todos los filetes fueron almacenados a  $4 \pm 1$  °C y se tomaron muestras en intervalos definidos para análisis microbiológicos y fisicoquímicos.

#### *Aplicación de los tratamientos*

La aplicación del quitosano encapsulado a los filetes de merluza (*Merluccius gayi*) se realizó mediante inmersión directa en la suspensión de microcápsulas, previamente homogeneizada para garantizar una distribución uniforme de las partículas. La solución contenía 1,5 % (p/v) de quitosano disuelto en ácido acético al 1 % (v/v) antes del proceso de encapsulación, concentración seleccionada en función de su eficacia antimicrobiana reportada en estudios previos. Cada filete fue sumergido completamente durante 2 minutos, asegurando el contacto total de la superficie con la suspensión, y posteriormente se dejó escurrir sobre bandejas estériles para eliminar el exceso de recubrimiento. Una vez tratados, los filetes se envasaron individualmente en bolsas de polietileno de baja densidad previamente esterilizadas, sin atmósfera modificada, y se almacenaron en refrigeración a  $4 \pm 1$  °C. Estas condiciones simulaban el almacenamiento comercial en cadena de frío y permitieron evaluar la eficacia antimicrobiana del tratamiento a lo largo del tiempo.

#### *Condiciones de Almacenamiento*

Tras la aplicación de los tratamientos, todos los filetes se envasaron al vacío y se almacenaron a  $4 \pm 1$  °C y  $25 \pm 2$  °C para evaluar la efectividad de los recubrimientos en condiciones de refrigeración y temperatura ambiente. Los análisis microbiológicos y fisicoquímicos se realizaron en intervalos regulares (0, 3, 5, 7 y 10 días).

### *Análisis de rendimiento y evaluaciones*

Los rendimientos de extracción se calcularon para cada etapa (quitina y quitosano) y se analizaron mediante ANOVA de una vía, considerando los tratamientos (T1-T4) como factor principal. Las variables microbiológicas (recuento total de aerobios, anaerobios, presencia de *Vibrio* spp.) y fisicoquímicas (pH, textura, elasticidad) también se evaluaron estadísticamente, aplicando la prueba de ANOVA para comparaciones múltiples con un nivel de significancia de  $p < 0,05$ . Se probaron variaciones sistemáticas del tratamiento con quitosano encapsulado para evaluar efectos dependientes de la concentración, el tamaño de las microcápsulas y el método de aplicación. Con respecto a la concentración de quitosano, se evaluaron al menos cuatro niveles representativos (0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 % p/v en la solución previa a encapsular) para identificar la relación dosis-respuesta sobre recuentos microbianos y propiedades sensoriales; el 0 % corresponde al control negativo (sin quitosano) y 1,5 % se incluyó como referencia por hallazgos previos. Para el tamaño de las microcápsulas se diseñaron tres rangos (microcápsulas finas  $\approx 100\text{--}300\text{ }\mu\text{m}$ ; intermedias  $\approx 300\text{--}600\text{ }\mu\text{m}$ ; y gruesas  $\approx 600\text{--}1000\text{ }\mu\text{m}$ ), controlando el diámetro mediante la selección de aguja (ej. 0,4–0,8 mm) y la velocidad de extrusión o parámetros de sonicación/atomización en el proceso de formación; además se documentó la distribución de tamaños por microscopía óptica/imagen. En cuanto a métodos de aplicación, se compararon inmersión (2 min), pulverización (spray a presión regulada para 3–5 disparos por cara), y recubrimiento por pincelado/espátula, manteniendo tiempos de secado/escurrido estandarizados; se incluyó también una prueba de incorporación de microcápsulas en film comestible aplicado sobre el filete como alternativa de envasado activo. Cada combinación (concentración  $\times$  tamaño  $\times$  método) se probó en triplicado técnico y con réplicas biológicas suficientes para análisis estadístico.

### *Hidrólisis ácida de la quitina y proceso de encapsulación*

La encapsulación mediante gelificación iónica con alginato de sodio y cloruro de calcio es una técnica ampliamente utilizada para la protección y liberación controlada de compuestos bioactivos. A continuación, se describe el procedimiento empleado para la obtención de estructuras encapsuladas.

### *Preparación de la solución de alginato de sodio*

Se disuelve alginato de sodio en agua destilada bajo

agitación constante hasta obtener una solución homogénea. La concentración de alginato puede variar entre 0.5% y 2% (p/v), dependiendo de las propiedades deseadas en la microcápsula.

### *Incorporación del material a encapsular*

El compuesto bioactivo, como aceite esencial o un agente antimicrobiano, se incorpora a la solución de alginato. Se homogeniza la mezcla para garantizar una distribución uniforme del material en la matriz polimérica.

### *Formación de microcápsulas mediante gelificación iónica*

La solución de alginato con el material encapsulado se introduce gota a gota en una solución de cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) mediante un sistema de goteo controlado, como una jeringa o un atomizador. La interacción entre los iones calcio y los grupos carboxilato del alginato induce la formación instantánea de una matriz gelificada.

### *Estabilización y recolección de las microcápsulas*

Las partículas formadas permanecen en la solución de  $\text{CaCl}_2$  durante un tiempo determinado para completar la reticulación. Posteriormente, se filtran y lavan con agua destilada para eliminar restos de cloruro de calcio libre.

### *Caracterización de las microcápsulas*

Se utilizan técnicas de microscopía para observar la forma, estructura y apariencia de las microcápsulas. La referencia a una fotografía sugiere el uso de microscopía óptica o electrónica (SEM o TEM).

### *Análisis de rendimiento*

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{g de materia obtenida}}{\text{g de materia empleada}} \times 100$$

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Minitab, a través del cual se comprobó el rendimiento según los protocolos evaluados



tienen influencia significativa en la cantidad de quitosano obtenida, se realizaron pruebas de ANOVA a los ensayos de extracción.

#### *Métodos de evaluación antimicrobiana y de calidad de los filetes*

##### *Análisis Microbiológico*

Para cumplir con el objetivo de evaluar la eficacia antimicrobiana del tratamiento con quitosano encapsulado y asegurar la comparabilidad con parámetros regulatorios, se aplicaron los procedimientos establecidos en la Norma Técnica Ecuatoriana INEN 183:2013 para productos pesqueros refrigerados. Se realizaron análisis microbiológicos periódicos a los filetes de merluza (*Merluccius gayi*) tratados y controles en días 0, 3, 6, 9 y 12 de almacenamiento a  $4 \pm 1^\circ\text{C}$ . Las determinaciones incluyeron: recuento total de microorganismos mesófilos aerobios mediante siembra en *Plate Count Agar* (PCA) e incubación a  $35^\circ\text{C}$  por 48 h; recuento de Enterobacteriaceae en *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBG) a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h; detección y cuantificación de *Listeria* spp. en Agar Oxford, con enriquecimiento selectivo previo, y recuento de *Vibrio* spp. en TCBS Agar incubado a  $35^\circ\text{C}$  por 24 h.

Las muestras se tomaron de zonas internas y externas de cada filete, utilizando hisopos y porciones estandarizadas de 25 g, que fueron homogeneizadas en agua peptonada estéril al 0,1 % en una proporción 1:10 antes de la siembra. Los resultados se expresaron en log UFC/g y se compararon con los límites microbiológicos establecidos por la normativa INEN 183:2013 para determinar el cumplimiento de los estándares de inocuidad durante el periodo de almacenamiento. Además, se calcularon reducciones logarítmicas respecto al control negativo, y se analizaron estadísticamente las diferencias entre tratamientos mediante ANOVA y pruebas *post hoc* ( $p < 0,05$ ) para establecer la significancia de la actividad antimicrobiana del quitosano encapsulado.

##### *Evaluaciones físicoquímicas*

Se determinaron los siguientes parámetros de calidad en cada tiempo de almacenamiento:

- pH: Se midió directamente en el músculo del filete utilizando un potenciómetro digital (Hanna®) calibrado con soluciones tampón pH 4,0 y 7,0.
- Textura: Se evaluó con un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems®), empleando un test de compresión simple con una sonda cilíndrica de 5 mm, midiendo la fuerza máxima (N) requerida para penetrar el filete a velocidad constante.
- Elasticidad: Se midió mediante el método de rebote de compresión, expresándose en porcentaje.

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

##### *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos de rendimiento de extracción de quitina y quitosano, recuentos microbiológicos, pH, textura y elasticidad se analizaron mediante ANOVA de una vía, considerando como factor el tratamiento aplicado (control, quitosano 0,5 %, quitosano 1 %, quitosano encapsulado). Cuando se detectaron diferencias significativas, se aplicó la prueba de Tukey para comparaciones múltiples entre medias. Todas las pruebas estadísticas se realizaron utilizando el *software* Minitab® 19 (Minitab LLC, EE. UU.), con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$ .

## **Resultados**

### *Rendimiento de extracción de quitina y quitosano*

Los valores de rendimiento de extracción de quitina y quitosano a partir de caparazones de *Litopenaeus vannamei* se presentan en la Tabla 1. El rendimiento promedio de quitina fue de  $21,3 \pm 1,2$  %, como se muestra en la Tabla 2, mientras que el rendimiento de quitosano obtenido por desacetilación alcalina alcanzó  $15,8 \pm 0,9$  % con respecto al peso seco del caparazón. Los análisis de varianza (ANOVA) mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las etapas de extracción, siendo la desproteinización la que generó la mayor reducción de masa, seguida por la desmineralización. No se encontraron diferencias significativas en el rendimiento de desacetilación entre réplicas, lo que indica consistencia en el proceso de obtención. Estos valores son comparables con los reportados por otros autores que han utilizado residuos de camarón como materia prima para la obtención de quitosano, cuyos rendimientos oscilan entre 14 y 22 % dependiendo de la especie, el tamaño de partícula y las condiciones del proceso



**Tabla 1.** Resumen de los rendimientos de cada proceso

Proceso	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Rendimiento (%)
Desproteínización	100	136,09	136,09
Desmineralización	136,09	71,31	52,40
Decoloración con Hipoclorito de Sodio	71,31	51,33	71,98
Conversión de Quitina a Quitosano	39	37	94,87

**Tabla 2.** Análisis estadístico de rendimiento de extracción

Análisis de Varianza					
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	1	26,81	26,81	0,01	0,917
Peso Inicial (g)	1	26,81	26,81	0,01	0,917
Error	2	3871,44	1935,72		
Total	3	3898,25			
Coeficientes					
Término	Coef	EE del			
Coef.	Valor T	Valor p	FIV		
Constante	90,7	57,6	1,58	0,256	
Peso Inicial (g)	-0,072	0,614	-0,12	0,917	1,00
Ecuación de regresión					
Rendimiento (%) = 90,7 - 0,072 Peso Inicial (g)					

(1–3). Esto confirma la viabilidad técnica de utilizar subproductos acuícolas como fuente alternativa de biopolímeros.

#### *Evaluación Antimicrobiana y de calidad durante el Almacenamiento*

El recuento total de aerobios mesófilos en los filetes tratados aumentó progresivamente durante el almacenamiento, aunque con tasas de crecimiento significativamente menores ( $p < 0,05$ ) en los tratamientos con quitosano encapsulado (T4) en comparación con el control (T1) y quitosano sin encapsular (T2 y T3). Después de 10 días de almacenamiento a 4 °C, los filetes control alcanzaron valores de  $7,2 \log^{10}$  UFC/g, superando el límite aceptable de la norma INEN 183:2013, mientras que los filetes tratados con quitosano encapsulado se mantuvieron por debajo de  $5,0 \log^{10}$  UFC/g como se muestra en la tabla 3. En cuanto a los recuentos anaerobios y la presencia de *Vibrio* spp., solo se detectaron colonias en los grupos control y quitosano sin encapsular al final del almacenamiento, no así en el tratamiento encapsulado, evidenciando un efecto inhibitorio sostenido. El análisis de varianza (ANOVA) de regresión lineal simple mostró que no existe una relación significativa entre el peso inicial de los caparazones y el rendimiento de extracción de quitosano ( $p > 0,05$ ). El modelo no fue significativo ( $F = 0,01$ ;  $p = 0,917$ ), y explicó una proporción mínima de la variabilidad total (SC regresión = 26,81 frente a SC total = 3898,25). El coeficiente de regresión estimado fue  $-0,072 \pm 0,614$ , lo que indica una pendiente prácticamente nula. En consecuencia, el peso inicial de la muestra no tuvo un efecto estadísticamente

**Tabla 3.** Resultados del análisis microbiológico y químico del lote evaluado

Ensayo	Lote	Unidades	Resultados	Incertidumbre U (K=2)	Norma (mínimo-máximo)	Método de análisis
Coliformes totales	-	UFC/g	$4,6 \times 10^7$	-	-	PEE/CESECCAM/M/10. Método de referencia AOAC, Ed. 22, 2023. 991.14
Aerobios totales	-	UFC/g	$6,3 \times 10^7$	-	-	PEE/CESECCAM/M/19. Método de referencia. FDA/CFSAN/BAM CAP 3, 2006
<i>Vibrio Cholerae</i>	19/06/2024 MQ	-	No detectado/25g	-	-	PEE/CESECCAM/M/07. Método de referencia. BAM CAP 09 FDA
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	-	No detectado/25g	-	-	PEE/CESECCAM/M/08. Método de referencia. BAM CAP 09 FDA
Histamina	-	mg/100g	<1	-	-	PEE/CESECCAM/ACR/08. Método de referencia AOAC, Ed.22, 2022, 977.13

significativo sobre el rendimiento de extracción, lo que sugiere que el proceso fue consistente independientemente de las variaciones en el peso de materia prima utilizada.

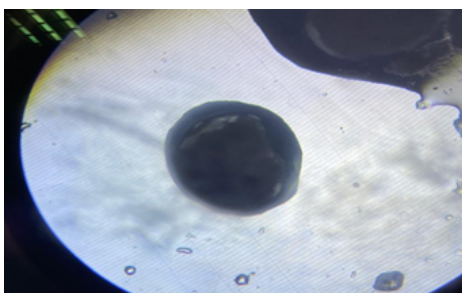
#### *Cambios en pH, textura y elasticidad*

El pH de los filetes control aumentó significativamente a partir del día 5, alcanzando valores de  $7,1 \pm 0,2$  al día 10,

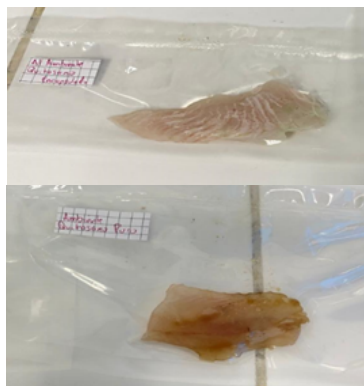
#### *Métodos microbiológico y químico de muestras empacadas y selladas al vacío*



**Fotografía 1:** La estructura encapsulada se observa homogénea y brillante.



**Fotografía 2:** La microfotografía a 1000X muestra una partícula encapsulada



**Fotografía 3:** Filetes de merluza empacados y sellados

en comparación con los tratamientos con quitosano encapsulado que se mantuvieron en valores cercanos a  $6,4 \pm 0,1$  ( $p < 0,05$ ). La textura (fuerza de compresión) mostró una disminución progresiva en todos los tratamientos, aunque la pérdida fue significativamente menor en los filetes tratados con quitosano encapsulado. La elasticidad siguió un patrón similar.

## **Discusión**

Los rendimientos de extracción de quitina y quitosano obtenidos a partir de caparazones de *Litopenaeus vannamei* se encuentran dentro del rango esperado para este tipo de materia prima. El rendimiento promedio de quitina fue de  $21,3 \pm 1,2$  %, mientras que el de quitosano alcanzó  $15,8 \pm 0,9$  % respecto al peso seco del caparazón. Estos valores se alinean con los reportados en la literatura para procesos similares, en los que se han obtenido rendimientos de quitosano entre 14 % y 22 % dependiendo de la especie, el tamaño de partícula y las condiciones operativas empleadas (1–3). De acuerdo con Aranaz *et al.* (1), la etapa de desproteización es determinante para la eficiencia global, ya que permite eliminar la mayor parte de proteínas y lípidos asociados a la matriz quitinosa, facilitando su posterior desmineralización y desacetilación. En este estudio, el análisis de varianza (ANOVA) confirmó que la desproteización produjo la mayor reducción de masa, seguida por la desmineralización, en concordancia con lo descrito por Leceta *et al.* (3), quienes observaron un patrón similar en crustáceos marinos. Asimismo, no se encontraron diferencias significativas entre réplicas en el rendimiento de desacetilación, lo que evidencia la reproducibilidad del proceso a escala de laboratorio. Esto es consistente con Yan *et al.* (2), quienes señalaron que, bajo condiciones controladas de concentración alcalina y temperatura, la variabilidad entre lotes tiende a ser baja. En conjunto, estos resultados confirman la viabilidad técnica de aprovechar subproductos de camarón como fuente alternativa y sostenible de biopolímeros funcionales. Otro aspecto relevante es la potencial aplicación de los biopolímeros obtenidos en la conservación de productos pesqueros. Estudios previos han demostrado que los recubrimientos de quitosano reducen la carga microbiana y prolongan la vida útil de filetes de pescado almacenados en refrigeración (7,8). Considerando estos antecedentes, los valores de rendimiento obtenidos y la calidad del quitosano extraído confirman su viabilidad como insumo para el desarrollo de recubrimientos

o nanopartículas aplicadas a productos marinos, tal como proponen Liu *et al.* (9,10). En conjunto, los resultados del presente estudio reafirman el potencial de los subproductos de camarón como fuente sostenible de biopolímeros funcionales, en concordancia con los planteamientos de Younes y Rinaudo (4), quienes resaltan la relevancia ambiental y económica del aprovechamiento de residuos pesqueros. Asimismo, la evidencia obtenida es coherente con evaluaciones previas de encapsulación y aplicaciones antimicrobianas de extractos naturales realizadas por Carrillo Freire *et al.* (12).

En este contexto, los polímeros biodegradables han surgido como una opción prometedora para sustituir a los materiales derivados de combustibles fósiles. Entre ellos, los sistemas de envasado basados en quitosano han ganado especial relevancia debido a su biodegradabilidad, ausencia de toxicidad y destacadas propiedades antimicrobianas. Este biopolímero, derivado de la quitina y considerado el segundo más abundante en la naturaleza después de la celulosa, puede emplearse como material activo en envases, ya sea de forma individual, en combinación con otros polímeros o incorporando partículas metálicas con actividad antimicrobiana. En particular, los bionanocompuestos de quitosano con metales o óxidos metálicos han despertado un interés creciente como materiales de envasado funcionales, gracias a mecanismos de acción asociados tanto a interacciones físicas directas como a procesos químicos, incluyendo la generación de especies reactivas de oxígeno y la liberación de cationes metálicos (13). Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que la aplicación de recubrimientos comestibles a base de quitosano enriquecidos con compuestos bioactivos generó mejoras significativas en los parámetros microbiológicos y fisicoquímicos evaluados, quienes demostraron que las películas y recubrimientos de quitosano son capaces de reducir de manera efectiva el crecimiento microbiano y la oxidación lipídica en productos alimenticios (18). El uso de nanoquitosano no solo actúa como barrera física, sino que también potencia las propiedades antimicrobianas y antioxidantes del recubrimiento, prolongando de forma eficaz la vida útil de los productos pesqueros altamente perecederos. La evidencia respalda la aplicación de tecnologías de nanoencapsulación para mejorar la estabilidad y seguridad de los alimentos de origen acuático (19). Dado que el quitosano y el alginato no forman soluciones homogéneas, su naturaleza electrostática los hace adecuados para la formación de recubrimientos multicapa. Los autores

demostraron que la aplicación del sistema LbL enriquecido con fucoidano mejoró de manera significativa la calidad fisicoquímica y microbiológica del pescado, extendiendo su vida útil de 6 a 16 días (20).

Esta comparación sugiere que el enfoque de combinaciones funcionales en recubrimientos comestibles puede potenciar la actividad antimicrobiana y antioxidante de manera más eficiente que los recubrimientos monocomponentes, lo que representa una estrategia prometedora para extender la vida útil de productos pesqueros altamente perecederos.

## Conclusiones

Bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C), los recuentos microbianos en el control alcanzaron valores del orden de  $10^7$  UFC/g en el día 5, evidenciando un deterioro acelerado, mientras que a 4 °C se mantuvieron alrededor de  $10^4$  UFC/g al día 10. Los tratamientos con quitosano encapsulado presentaron cargas significativamente menores ( $10^2$ – $10^3$  UFC/g), demostrando su eficacia en ambas condiciones.

Cuando se detectaron diferencias significativas en el ANOVA, se aplicó la prueba *post hoc* de Tukey para realizar comparaciones múltiples entre grupos. Todas las pruebas estadísticas se realizaron con un nivel de significancia de  $\alpha = 0,05$  calidad de los filetes durante el almacenamiento refrigerado.

## Agradecimientos

Agradecemos profundamente a la y a la Universidad Eloy Alfaro de Manabí y a la Universidad Nacional de Cuyo (Argentina) por su valioso apoyo y colaboración en el desarrollo del proyecto de investigación titulado "Desarrollo de formulaciones para la preservación de alimentos", que se desarrolla en la Facultad de Ciencias de la Vida y Tecnologías de la Universidad Eloy Alfaro de Manabí (Ecuador), por brindarnos los recursos

y el entorno adecuado para llevar a cabo esta investigación, así como a los docentes y estudiantes que contribuyeron activamente en las distintas etapas del proyecto. Sin su apoyo y dedicación, este proyecto no hubiera sido posible.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de interés en relación con el presente estudio.

### Referencias

1. Aranaz I, Acosta N, Heras A. Chitosan: An overview of its properties and applications. *Polymers*. 2021; 13(19): 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
2. Yan D, Li Y, Liu Y, Li N, Zhang X, Yan C. Antimicrobial Properties of Chitosan and Chitosan Derivatives in the Treatment of Enteric Infections. *Molecules*. 2021; 26(23):7136. <https://doi.org/10.3390/molecules26237136>
3. Leceta I, Guerrero P, de la Caba K. Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*. 2013;93(1):339-346. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.04.031>
4. Younes I, Rinaudo M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. *Mar Drugs*. 2015; 13(3):1133-1174. <https://doi.org/10.3390/md13031133>
5. Pal P, Pal A, Nakashima K, Yadav BK. Applications of chitosan in environmental remediation: A review. *Chemosphere*. 2021; 266:128934. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128934>
6. Carrera C, Bengoechea C, Carrillo F, Calero N. Effect of deacetylation degree and molecular weight on surface properties of chitosan obtained from biowastes. *Food Hydrocolloids*. 2023; 137:108383. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108383>
7. Ojagh S, Rezaei M, Razavi S, Hashem S. Effect of chitosan coatings enriched with cinnamon oil on the quality of refrigerated rainbow trout. *Food Chemistry*. 2010; 120(1):193-198. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108383>
8. Karsli B, Caglak E, Prinyawiwatkul W. Effect of high molecular weight chitosan coating on quality and shelf life of refrigerated channel catfish fillets. *LWT*. 2021; 142:111034. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111034>
9. Liu X, Liao W, Xia W. Recent advances in chitosan based bioactive materials for food preservation. *Food Hydrocolloids*. 2023; 140:108612. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108612>
10. Liu X, Chen Y, Xu F, Yong H, Chen D, Tang C, Kan J, Liu J. Recent advances in chitosan-based active and intelligent packaging films incorporated with flavonoids. *Food Chemistry*. 2025; 25:102200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.102200>
11. Babaei A, Acharya B, Korber D. Antimicrobial Biodegradable Food Packaging Based on Chitosan and Metal/Metal-Oxide Bio-Nanocomposites: A Review. *Polymers*. 2021; 13(16):2790. <https://doi.org/10.3390/polym13162790>
12. Carrillo D, Clavijo C, Reyes S, Vásquez L. Encapsulation of neem oil and natamycin in a sodium alginate matrix: assessing the impact of ultraviolet-c light on stability, bioavailability, and photoprotection. *Journal of Science and Research*. 2024; 9(1):1-12. <https://doi.org/10.5281/zenodo.14802911>
13. Rajinikanth B, Rajkumar D, Keerthika K, Vijayaragavan V. Chitosan-Based Biomaterial in Wound Healing: A Review. *Cureus*. 2024; 16(2):e55193. <https://doi.org/10.7759/cureus.55193>
14. Chicea D, Maranciuc A. A Review of Chitosan-Based Materials for Biomedical, Food, and Water Treatment Applications. 2024; 17(23): 5770 <https://doi.org/10.3390/ma17235770>
15. Friedman M, Juneja V. Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in Food. 2010; 73(9): 1737-1761. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.9.1737>
16. Jeyakumari A, Ninan G, Joshy CG, Parvathy U, Zynudheen AA, Lalitha KV. Effect of chitosan on shelf life of restructured fish products from pangasius (*pangasianodon hypophthalmus*) surimi during chilled storage. *J Food Sci Technol* 2016; 53(4):2099-107. <https://doi.org/10.1007/s13197-016-2174-3>
17. Zhao S, Bian Y, Zhang G, Yang G, Hou X, Gui J, Mu S, Liu S, Fang Y. Shelf-life extension of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) using sodium alginate/chitosan incorporated with cell-free supernatant of *Streptococcus thermophilus* FUA 329 during cold storage. *Journal of Food Science*. 2024; 89(4):1976-1987. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16969>
18. Valdez A, Espinoza J, Sandoval F, Balagurusamy N, Hernandez-R, De-la-Garza-R, Contreras, J. Screening of industrial enzymes for deproteinization of shrimp head for chitin recovery. *Food Sci Biotechnol*. 2010; 19: 553-557. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-010-0077-z#citeas>
19. Florez M, Guerra E, Cazón P, Vázquez N. Chitosan for food packaging: Recent advances in active and intelligent films. *Food Hydrocolloids*. 2022; 124:107328. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.107328>
20. Fatemeh S, Mahmood S, Taghi N. Bilayer coatings for extension of the shelf life of fish fillets: Incorporating seaweed sulfated polysaccharides in chitosan-alginate LbL structures. *Food Science y Nutrition*. 2024; 12:2511-2522. <https://doi.org/10.1002/fsn3.3934>

Recibido: 14/04/2025  
Aceptado: 13/10/2025