



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Iztapalapa

**“Uso de bacterias lácticas
en recubrimientos de quitosano para la conservación poscosecha
de litchi y rambután”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

M. en C. Gustavo Martínez Castellanos
Comité tutorial:

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto^a

Asesores:

Dra. Laura J. Pérez Flores^b

Dra. Clara Pelayo Zaldívar^a

^aDepartamento de Biotecnología,

^bDepartamento de Ciencias de la Salud,

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

México, D.F., 17 de Diciembre de 2009

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el No. de Registro 175043”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de CONACyT. Asimismo se agradece a la Unión Europea y al CONACyT por los financiamientos otorgados a través del proyecto Alfa Polylife y a los apoyos integrales para la Formación de Doctores en Ciencias 2006-2007 para la movilidad, estancia de investigación por 3 meses en la Universidad Estatal de Campinas en Brasil, para realizar estudios de la morfología de películas de quitosano mediante microscopía electrónica.

El H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados:

“Uso de bacterias lácticas en recubrimientos de quitosano para la conservación poscosecha de litchi y rambután”

que presentó:

M. en C. Gustavo Martínez Castellanos

El día 17 de Diciembre de 2009

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Laboratorio de Biopolímeros.

H. Jurado

Presidente: Dra. Laura J. Pérez Flores. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biología Experimental.

Secretario: Dra. Clara Pelayo Zaldívar. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Sinodales: Dr. Fernando Díaz de León Sánchez. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biología Experimental.

Dra. Claudia Patricia Larralde Corona. Centro de Biotecnología Genómica, IPN.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer especialmente a la Dra. Keiko Shirai Matsumoto, por el gran apoyo recibido en la dirección del presente trabajo. Muchas gracias Keiko, por haber creído en mí, por tu amistad, tu ayuda y todas las enseñanzas que me has brindado.

A la Dra. Laura J. Pérez Flores por sus atenciones y comentarios que siempre me han motivado y la asesoría tan valiosa recibida para realizar el presente trabajo.

A la Dra. Clara Pelayo Zaldívar, por su gran gentileza, paciencia y principalmente por su calidad humana y profesional brindada durante la asesoría del presente trabajo. Gracias por esos consejos tan oportunos que me hicieron ver una ventana de oportunidad ante las situaciones desfavorables durante mi estancia en el doctorado.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco, por sus valiosas observaciones y sugerencias al presente trabajo.

Al Instituto Tecnológico Superior de Misantla, institución que me ha permitido realizar mis actividades laborales, agradezco por darme la oportunidad de seguirme preparando profesionalmente.

A la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, institución en la que he aprendido mucho, por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto.

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para realizar la parte experimental de esta investigación.

Asimismo, agradezco a la Unión Europea el financiamiento otorgado a través del proyecto Alfa Polylyfe para asistir a la UNICAMP.

De manera muy especial quiero agradecer a la familia Novoa por su gran apoyo incondicional y gracias a esta experiencia compartida he ganado su amistad, la cual me hace sentirme como parte de su familia, Gracias Doña Ivone.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biopolímeros: Ulises, Carmen, Neith, Diana, Gabriel, Zaizy, Marco, Laura y demás personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo. Muchas gracias a todos por su ayuda incondicional y los gratos momentos compartidos. Siempre los recordaré con afecto.

DEDICATORIAS

A mis padres, Silvio Gustavo Martínez Fernández y Almadelia Castellanos Jácome, por darme la vida y haberme transmitido todas las enseñanzas que me han hecho un hombre de bien. Gracias por haber creído en mí y haberme apoyado incondicionalmente en el desarrollo de todos mis estudios.

Con amor, especialmente a mí querida esposa Lucia Domínguez Tejeda y mis hijos: Jocelyn, Oscar y recientemente Alejandro, que me han dado muchísimos motivos para vivir y afrontar todos aquellos grandes retos.

A mis hermanos: Fabiola, Arturo, Patricia y Cesar. Quienes en aquellos momentos difíciles de la vida han extendido su fraternal mano, para apoyarme a seguir adelante.

Gustavo

CONTENIDO

	Pág
Lista de figuras.....	x
Lista de tablas.....	xiii
Abreviaturas acrónimos.....	xiv
Resumen.....	xvi
Abstract.....	xix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. Películas y Recubrimientos.....	2
2.1.1. Polímeros utilizados para la formación de películas y recubrimientos.....	2
2.1.2. Propiedades funcionales de los recubrimientos comestibles.....	3
2.2. Quitosano.....	3
2.2.1. Quitina.....	3
2.2.2. Quitosano.....	3
2.2.3. Propiedades y características del quitosano.....	4
2.2.4. Actividad antimicrobiana.....	5
2.2.5. Mecanismos de acción del quitosano.....	5
2.2.6. Características de barrera de los recubrimientos de quitosano.....	6
2.2.7. Combinación del quitosano con sustancias activas.....	7
2.2.8. Modificaciones químicas del quitosano.....	7
2.2.9. Combinación de quitosano con microorganismos.....	8
2.3. Bacterias ácido lácticas.....	8
2.3.1. Definición general.....	8
2.3.2. Clasificación.....	8
2.3.3. Características fermentativas.....	8
2.3.4. <i>Lactobacillus plantarum</i>	9
2.3.4.1. Componentes antimicrobianos producidos por <i>Lb. plantarum</i>	9
2.3.5. Producción de ácido láctico.....	10
2.3.6. Fermentación ácido láctica.....	10
2.3.7. Factores que afectan la fermentación ácido láctica.....	10
2.3.8. Inmovilización de bacterias lácticas en soportes.....	10
2.3.8.1. Liberación celular a partir de soportes.....	11
2.4. Frutos.....	13
2.4.1. Desarrollo fisiológico.....	13

2.4.1.1. Cambios sensoriales durante la maduración.....	13
2.4.2. Frutos climatéricos.....	14
2.4.3. Frutos no climatéricos.....	14
2.4.4. Uso de microorganismos en frutos.....	14
2.4.5. Rambután.....	15
2.4.6. Litchi.....	16
3. ANTECEDENTES.....	20
4. JUSTIFICACIÓN.....	24
5. OBJETIVOS.....	26
Objetivo general.....	26
Objetivos específicos.....	26
6. HIPÓTESIS.....	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
7.1. Quitosano.....	29
7.2. Microorganismos.....	29
7.3. Concentración mínima inhibitoria.....	29
7.4. Incorporación de los microorganismos al quitosano.....	29
7.4.1. Determinación de la sobrevivencia de las BAL en quitosano.....	30
7.4.2. Determinación de la sobrevivencia de las BAL en películas preformadas de quitosano.....	30
7.5. Características fisicoquímicas y mecánicas de las películas preformadas de quitosano.....	31
7.5.1. Formación de las películas.....	31
7.5.2. Espesor de las películas preformadas.....	31
7.5.3. Propiedades mecánicas.....	31
7.5.4. Permeabilidad al vapor de agua (WVP).....	32
7.5.5. Construcción de las isotermas de adsorción.....	33
7.5.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las películas preformadas de quitosano.....	33
7.6. Modificación del quitosano.....	34
7.6.1. Adición de prebióticos.....	34
7.6.2. Modificación química del quitosano.....	34
7.6.3. Viabilidad de <i>Lb. plantarum</i> en películas de quitosano modificado.....	34
7.7. Ensayos con frutos de rambután.....	35
7.7.1. Material biológico.....	35
7.7.2. Características de calidad.....	36
7.7.2.1. Firmeza de la pulpa.....	36

7.7.2.2. Determinación de los sólidos solubles totales (SST).....	36
7.7.2.3. Cambios de color del fruto.....	36
7.7.2.4. Pérdida de peso.....	36
7.7.3. Determinación de la viabilidad de los microorganismos en frutos de rambután.	37
7.7.4. Determinación de ácido láctico.....	37
7.7.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del pericarpio de rambután.....	37
7.7.6. Análisis estadístico.....	38
7.8. Ensayos con frutos de litchi.....	38
7.8.1. Material biológico.....	38
7.8.2. Características químicas y de calidad.....	39
7.8.2.1. Cambios de color del fruto.....	39
7.8.2.2. Índice de daño.....	39
7.8.2.3. Acidez titulable (AT).....	39
7.8.2.4. Determinación de los sólidos solubles totales (SST).....	40
7.8.2.5. Extracción de fenoles y antocianinas.....	40
7.8.2.6. Determinación de antocianinas totales.....	40
7.8.2.7. Determinación de antocianinas.....	41
7.8.2.8. Determinación de fenoles.....	41
7.8.3. Determinación de la viabilidad de los microorganismos en frutos de litchi.....	41
7.8.4. Análisis estadístico.....	42
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
8.1. Efecto del quitosano sobre bacterias lácticas.....	43
8.1.1. Efecto de distintos tipos de quitosano en las MIC de tres bacterias ácido lácticas.....	43
8.1.2. Efecto del método de incorporación de la BAL sobre la viabilidad.....	45
8.1.3. Evaluación de la viabilidad de <i>Lb. plantarum</i> sobre películas preformadas de quitosano.....	47
8.2. Caracterización fisicoquímica de los recubrimientos de quitosano.....	48
8.2.1. Permeabilidad al vapor de agua.....	48
8.2.3. Isotermas de adsorción.....	49
8.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	50
8.3. Ensayo de los recubrimientos en frutos de rambután (<i>Nephelium lappaceum</i>)	53

8.3.1. Crecimiento de bacterias gram positivas en el pericarpio de rambután.....	53
8.3.2. Efecto de recubrimientos con quitosano y bacterias lácticas en la calidad poscosecha de rambután.....	55
8.3.2.1. Efecto de los tratamientos en los sólidos solubles totales y pH de los frutos.....	55
8.3.2.2. Cambios de firmeza de la pulpa.....	58
8.3.2.3. Pérdida de peso.....	59
8.3.2.4. Cambios de color del pericarpio y producción de ácido láctico.....	61
8.3.3. Micrografías electrónicas de barrido del pericarpio de frutos de litchi sometidos a los tratamientos probados.....	65
8.4. Modificación del recubrimiento.....	68
8.4.1. Efecto de la fuente de carbono sobre la viabilidad de <i>Lb. plantarum</i>	68
8.4.2. Modificación química del quitosano.....	69
8.4.3. Análisis de la viabilidad y sobrevivencia de <i>Lb. plantarum</i> en películas de quitosano modificadas.....	71
8.5. Experimento con frutos de litchi (<i>Litchi chinensis son cv. Brewster.</i>)	74
8.5.1. Determinación de la viabilidad de <i>Lb. plantarum</i> durante el almacenamiento.....	74
8.5.2. Determinación de ácido láctico en frutos de litchi.....	75
8.5.3. Análisis de los parámetros de calidad.....	76
8.5.3.1. Pérdida de peso, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT) y cociente SST/AT.....	76
8.5.3.2. Cambios de color del fruto.....	78
8.5.3.3. Índice de daño.....	81
8.5.3.4. Determinación de antocianinas.....	83
8.5.3.5. Determinación de fenoles.....	85
8.5.4. Microscopía electrónica de barrido del litchi (SEM).....	86
9. CONCLUSIONES.....	88
10. PERSPECTIVAS.....	89
11. TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICACIONES.....	90
11.1. Publicaciones.....	90
11.2. Congresos.....	90
12. BIBLIOGRAFÍA.....	91

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química del quitosano (Fwu-Long, <i>et al.</i> , 2006).	4
Figura 2. Esquema general de la metodología seguida en el desarrollo experimental.	28
Figura 3. Viabilidad de <i>Lb. plantarum</i> inoculado en películas de quitosano (171.4 kDa) almacenadas a 25 °C y 75 % HR.	48
Figura 4. Isotermas de adsorción de películas de quitosano de 171.4 kDa (20 g/L). Q (□), QBAL superficial (Δ), QBAL embebido (○).	50
Figura 5. Micrografías electrónicas de películas de quitosanos de 171.4 kDa preparadas a 20 g/L (3000X): a) Superficie y b) Fractura transversal; con aplicación superficial de <i>Lb. plantarum</i> (7000X): c) Superficie y d) Fractura transversal; embebiendo a <i>Lb. plantarum</i> en las películas (7000X): e) Superficie y f) Fractura transversal (3000 X).	52
Figura 6. Crecimiento de bacterias gram positivas (Log UFC/mL) en frutos de rambután mediante siembra en placa por extensión en agar MRS a 10 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (Δ). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	53
Figura 7. Crecimiento de bacterias gram positivas (Log UFC/mL) en frutos de rambután mediante siembra en placa por extensión en agar MRS a 25 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (Δ). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	54
Figura 8. Cambios de firmeza en pulpa de rambután almacenado a 10 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (Δ). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	58
Figura 9. Cambios de firmeza en pulpa de rambután almacenado a 25 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (Δ). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	59
Figura 10. Pérdida de peso en rambután almacenado a 10 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (Δ). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	60
Figura 11. Pérdida de peso en rambután almacenado a 25 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (Δ). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	60
Figura 12. Gráficos polares de los cambios de color de frutos de rambután de acuerdo a la escala CIE (L^* y a^*) durante el almacenamiento a: a) 25 °C; b) 10 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (Δ).	62

Figura 13.	Efecto del índice de impregnación de ácido láctico sobre la calidad del color (a^*) en frutos almacenados a 10 °C. Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	64
Figura 14.	Micrografías electrónicas de los tratamientos de frutos de rambutan almacenados a 10 °C: a y b (C); c y d (Q); e y f (BAL) ; g y h (QBAL).	66
Figura 15.	Crecimiento de <i>Lb. plantarum</i> en medio mínimo nutritivo adicionado con diferentes carbohidratos y acidificación del medio. Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	68
Figura 16.	Viabilidad de <i>Lb. plantarum</i> en películas de quitosano de 400 kDa (10 g/L) almacenadas a 92% de HR y 10 °C. BAL (+); Q (\diamond); Q/GA (\circ); Q/F (\triangle); Q/GA/F (\square); GA (X). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	71
Figura 17.	Acidez titulable de películas de quitosano de 400 kDa inoculadas con <i>Lb. plantarum</i> y almacenadas a 92 % HR y 10 °C. Q (\diamond); Q/GA (\circ); Q/F (\triangle); Q/GA/F (\square). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	72
Figura 18.	Cambios de pH en películas de Quitosano de 400 kDa inoculadas con <i>Lb. plantarum</i> y almacenadas a 92 % HR y 10 °C. Q (\diamond); Q/GA (\circ); Q/F (\triangle); Q/GA/F (\square). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).	73
Figura 19.	Crecimiento de bacterias lácticas (Log UFC/mL) en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. Siembra en placa por extensión en agar MRS. C (\diamond); BAL (\triangle). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	74
Figura 20.	Determinación de ácido láctico en pericarpio de litchi. C (\diamond); BAL (\triangle). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	75
Figura 21.	Pérdida de peso en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 \pm 5 % HR. C (\diamond); Q/GA (\square); BAL (\triangle) y Q/GA/BAL (\times). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	77
Figura 22.	Valores de luminosidad (L^*) en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (\diamond); Q/GA (\square); BAL (\triangle) y Q/GA/BAL (\times). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	79
Figura 23.	Croma o saturación (C^*) en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (\diamond); Q/GA (\square); BAL (\triangle) y Q/GA/BAL (\times). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	80

Figura 24.	Valores h en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (◇); Q/GA (□); BAL (△) y Q/GA/BAL (×). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	81
Figura 25.	Índice de daño en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (◇); Q/GA (□); BAL (△) y Q/GA/BAL (×). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	82
Figura 26.	Evolución de cianidina-3-rutinósido en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (◇); BAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	83
Figura 27.	Antocianinas totales medidas por la absorbancia (<i>A</i> /g pericarpio) en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (◇); BAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	84
Figura 28.	Concentración de fenoles (mg catequina/g pericarpio) en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (◇); BAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).	85
Figura 29.	Micrografías electrónicas de la superficie de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR al inicio del experimento (3000X): a) C; b) BAL; y a los 14 días: c) C; d) BAL.	87

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Crecimiento de lactobacilos cultivados en agar MRS adicionado con quitosano	44
Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias determinadas con los diferentes quitosanos.	44
Tabla 3. Viabilidad de lactobacilos en películas de quitosano en medio MRS después de 24h a 30 °C.	46
Tabla 4. Tasas de crecimiento de bacterias lácticas sobre soportes de quitosano en concentraciones de 20 g/L.	47
Tabla 5. Características fisicoquímicas y mecánicas de las películas de quitosano de 171.4 kDa (20 g/L) estabilizadas a 25 °C y gradientes de humedad relativa de 0-75 %.	49
Tabla 6. Tinción diferencial Gram e identificación por morfología de aislados obtenidos ¹ de la superficie de rambután almacenado a 10 °C.	56
Tabla 7. Tinción diferencial Gram e identificación por morfología de aislados obtenidos ¹ de la superficie de rambután almacenado a 25 °C.	56
Tabla 8. Sólidos solubles totales y pH en frutos de rambután almacenados a 10 °C.	57
Tabla 9. Sólidos solubles totales y pH en frutos de rambután almacenados a 25 °C.	57
Tabla 10. Concentración de ácido láctico en el pericarpio de frutos de rambután almacenados a 10 °C.	63
Tabla 11. Permeabilidad al vapor de agua de quitosanos de 171.4 y 400 kDa a 20 g/L modificados con diferentes aditivos en condiciones de prueba 0 - 75 y 75 - 92 % HR a 10 °C.	69
Tabla 12. Permeabilidad al vapor de agua de quitosanos de 171.4 y 400 kDa modificados con diferentes aditivos en condiciones de prueba 75 - 92 % HR a 10 °C.	70
Tabla 13. Características de calidad de frutos de litchi almacenados 21 días a 10 °C y 75 ± 5 % HR.	78

ABREVIATURAS ACRÓNIMOS

Lb. = *Lactobacillus*

BAL = Bacteria ácido láctica

a_w = Actividad de agua

MRS = Man Rogosa Sharpe

WVP = Permeabilidad al vapor de agua

VTVA = velocidad de transmisión de vapor de agua

HR = Humedad relativa

SEM = Microscopía electrónica de barrido

GA = Glutaraldehído

Q = Quitosano

QBAL = Quitosano con *Lb. plantarum*

C = Control

PP = Pérdida de peso

MIC = Concentración mínimas inhibitoria

IIA = Índice de impregnación de ácido

AT = Acidez titulable,

SST = Sólidos solubles totales

UE = Unidades experimentales

V = Volumen

h = Horas

N = Normalidad

A = Absorbancia

kDa = kilo Dalton

HPLC = Cromatografía líquida de alta resolución

Mw =Peso Molecular

DA = Grado de acetilación

Ton = Tonelada

Ha = Hectárea

T.S. = Resistencia a la tensión

GRAS = Alimentos considerados como seguros (Generally regarded as safe)

PPO = Polifenol Oxidasa

POD = Peroxidasa

S.S. = Sólido séco

RESUMEN

Entre los tratamientos alternativos al uso de químicos propuestos para mejorar el manejo poscosecha de litchi y rambután se encuentran las inmersiones en ácidos y el desarrollo de recubrimientos comestibles y películas. Otra alternativa es el uso de microorganismos para disminuir la incidencia de fitopatógenos por competencia y la producción de compuestos antagonistas. Estos tratamientos poscosecha están bien documentados; sin embargo, hay pocos reportes acerca de la combinación de microorganismos y recubrimientos. Por lo que es importante analizar las interacciones entre los agentes de control biológico y los recubrimientos y sus efectos sobre la calidad poscosecha de los frutos. El objetivo del presente trabajo consistió en estudiar el efecto de *Lb. plantarum* como productor de ácido láctico *in situ* y su interacción con los recubrimientos de quitosano, así como su efecto en la conservación poscosecha de frutos de rambután y litchi.

Se determinó el efecto del quitosano en el crecimiento de tres especies de bacterias lácticas. *Lb. acidophilus* y *Lb. spp.* mostraron menor crecimiento en presencia de quitosano, mientras que *Lb. plantarum* fue el microorganismo que presentó la mayor resistencia al biopolímero en las condiciones probadas, por lo que se seleccionó para estudios posteriores.

Se usaron dos metodologías para determinar la forma de aplicación de los lactobacilos en el recubrimiento. En la primera se incluyeron los lactobacilos se dispersaron en la solución de quitosano, para posteriormente formar las películas mediante evaporación de solventes. Las bacterias ácido lácticas no mostraron viabilidad en concentraciones de quitosano de 5, 10, 20 y 30 g/L, sin embargo, fueron capaces de sobrevivir en una concentración de 2 g/L. En la segunda, la incorporación de los lactobacilos se realizó sumergiendo las películas de quitosano, previamente preparadas con soluciones de hasta 20 g/L mediante evaporación de solventes de una suspensión celular. Con esta segunda metodología las bacterias fueron capaces de sobrevivir por un periodo de 10 días sobre la superficie de las películas de quitosano en condiciones de humedad relativa (HR) de 92 hasta 75 %.

Los análisis de permeabilidad al vapor de agua (WVP) mostraron que las películas de quitosano tuvieron valores de permeabilidad de 2.1 gmm/kPadm² en condiciones de prueba de 0 a 75 % de HR. Para mejorar las características de permeabilidad del quitosano se decidió entrecruzarlo con glutaraldehído (GA) a una concentración del 0.02 % (p/v), lo que produjo una disminución significativa de la permeabilidad ($\alpha < 0.05$).

Se analizó la adición de fructosa como prebiótico para mejorar la viabilidad de *Lb. plantarum* sobre las películas. Los resultados mostraron que tanto la adición de GA como de fructosa, ayudaron a mantener las viabilidades de *Lb. plantarum* por más tiempo que con el quitosano nativo.

Se realizó un primer experimento con frutos de rambután para analizar el efecto de *Lb. plantarum* y quitosano en la retención de la calidad de estos frutos. Los frutos de rambután (*Nephelium lappaceum*) fueron recubiertos con quitosano y *Lb. plantarum* y se almacenaron a 10° y 25 °C durante 15 y 10 días, respectivamente. Los factores limitantes para la conservación de los frutos se relacionaron con la pérdida de color del pericarpio, la pérdida de peso y la senescencia de los frutos.

Los análisis de viabilidad mostraron que los valores de log de UFC de *Lb. plantarum* combinado con quitosano no presentaron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) durante el periodo de almacenamiento a 10 °C y 25 °C. Los tratamientos de *Lb. plantarum* solo o combinado con quitosano disminuyeron significativamente la pérdida de peso y color (a^* y L^*) con respecto a los frutos control.

Los sólidos solubles totales (SST) y el pH del jugo de los frutos almacenados a 10 °C, no mostraron diferencias significativas con respecto a los análisis iniciales, pero si presentaron cambios significativos en el almacenamiento a 25 °C, lo que se atribuyó a la sobremaduración y senescencia de los frutos. En contraste a los resultados observados en el experimento *in vivo*, la viabilidad de las bacterias ácido lácticas en los recubrimientos de quitosano se redujo en un 71.8 % después de 10 días de almacenamiento a 25 °C y 75 % HR. Las determinaciones de ácido láctico en el pericarpio de los frutos mostraron que las bacterias lácticas se encontraban metabólicamente activas a 10 °C.

Para complementar el estudio se investigó el efecto de *Lb. plantarum* y quitosano, nativo y modificado con glutaraldehído, en la preservación del color y la calidad del *Litchi chinensis sonn.* La viabilidad obtenida en frutos tratados con *Lb. plantarum* mostró niveles más altos en comparación con los frutos control, de 5.3 a 4.5 log UFC/g fruto ($\alpha < 0.05$) durante 21 días de almacenamiento a 10° C y 75 % HR.

La aplicación de las bacterias lácticas en el pericarpio del fruto redujo significativamente la pérdida del color ($\alpha < 0.05$), manteniendo los parámetros de color (L^* y C^*) en valores mayores a los de los frutos control durante los 21 días de almacenamiento ($L^*=29.36 \pm 1.36$ y $C^*=25.77 \pm 1.32$). Los análisis realizados para evaluar la concentración de antocianinas por HPLC, mostraron que la cianidina-3-rutinosido, la antocianina más abundante en el pericarpio de litchi, tuvo una disminución menor a la del fruto control. Estos resultados tuvieron una buena correlación con la concentración total de antocianinas determinada por espectrofotometría ($R^2=0.9334$). Por otra parte, los análisis de fenoles totales mostraron que *Lb. plantarum* disminuyó su oxidación, efecto que podría estar relacionado con la reducción de la pérdida de antocianinas. Como resultado de lo anterior, la aplicación de *Lb. plantarum* disminuyó significativamente el oscurecimiento y preservó el color rojo del pericarpio de litchi.

Por lo tanto, en ambos experimentos *in vivo* en rambután y litchi se demostró que *Lb. plantarum* permaneció viable en la superficie de los frutos, solo ó en combinación con quitosano. El desarrollo del microorganismo fue evidente por las cuentas microbiológicas (log UFC) y por la producción de ácido láctico. Estos efectos explican la conservación del color en frutos de rambután y litchi. Además, *Lb. plantaum* fue capaz de mantener la concentración de antocianinas y fenoles en el pericarpio del fruto de litchi.

ABSTRACT

Acid dips, edible coatings and films are alternative treatments to the use of chemicals to extend the storage life of litchi and rambutan fruits. The use of microorganisms to diminish the incidence of phytopathogens by competition and production of antagonistic compounds is another alternative. These postharvest treatments are well documented, but few reports combining microorganisms and coatings are found in the scientific literature. Therefore, it is important to study interactions between biological control agents and coatings, and their effects on postharvest quality of fruits. The aim of the present work was to study the effect of *Lb. plantarum* as an *in situ* biological producer of lactic acid and its interaction with chitosan coatings as well as their effect on postharvest life of rambutan and litchi fruits.

The effect of chitosan on the growth of three species of lactic acid bacteria was determined. *Lb. acidophilus* and *Lb. spp.* grew to a lesser extent in presence of chitosan, whereas *Lb. plantarum* displayed greater resistance to the biopolymer under the conditions evaluated, hence it was selected for further use in this study.

Two methodologies were used in order to determine the form of application of the selected microorganism in the fruit coatings. In the first one *Lb. plantarum* was dispersed in the chitosan solution and subsequently the film was formed by casting. The lactic acid bacteria did not show viability at chitosan concentrations of 5, 10, 20 and 30 g/L, but was able to survive at a concentration of 2 g/L. In the second methodology, the microorganism was incorporated by dipping chitosan films (up to 20 g/L), previously formed, in cellular suspensions. Bacteria were able to survive up to 10 days on chitosan film surfaces in relative humidities (RH) up to 92 %. The analyses of water vapor permeability (WVP) showed values for chitosan films of 2.1 gmm/kPadm² at 0 to 75 % partial pressures. In order to improve chitosan WVP, a chemical crosslinking between the biopolymer and glutaraldehyde (0,02 % (w/v)) was made. Our results showed a significant reduction in permeability of the modified chitosan ($\alpha < 0.05$).

The addition of fructose as prebiotic improved *Lb. plantarum* viability. The results showed that glutaraldehyde and fructose addition helped to maintain *Lb. plantarum* viabilities during longer periods than unmodified chitosan.

An experiment with rambutan (*Nephelium lappaceum*) was conducted in order to evaluate the effect of *Lb. plantarum* and chitosan on the fruit quality retention. Ripe fruits coated with chitosan and bacteria were stored at 10 ° and 25 °C for 15 and 10 days, respectively. The limiting factors for rambutan conservation were related to pericarp discoloration, weight loss and fruit senescence.

The viability analyses showed that *Lb. plantarum* combined with chitosan did not present significant changes ($\alpha < 0.05$) in log CFU values during the storage period at 10 °C and 25 °C. *Lb. plantarum* alone and combined with chitosan, significantly diminished weight and color losses (a^* and L^*) with respect to control fruits.

Total soluble solids (TSS) and pH of juice extracted from fruits stored at 10 °C did not show significant differences with respect to the initial values, but a significant difference was found at 25 °C possibly due to the more advanced senescence process of fruits stored at the higher temperature. In contrast to the results observed in the *in vivo* experiment, the viability of lactic acid bacteria on chitosan coatings was reduced 71.8 % after 10 days of storage at 25 °C and 75% HR. Lactic acid determinations showed that the lactic bacteria were metabolically active.

The effect of *Lb. plantarum* alone and in combination with unmodified chitosan and chitosan modified with glutaraldehyde on the preservation of color and quality of *Litchi chinensis sonn* was also investigated. The viability observed in fruits treated with *Lb. plantarum* showed higher log CFU values in comparison with control fruits, ranging from 5.3 to 4.5 log CFU/g fruit ($\alpha < 0.05$) at 21 days of storage at 10 °C and 75% RH. The application of bacteria on fruit pericarp significantly reduced color loss ($\alpha < 0.05$), maintaining color values (L^* and C^*) above those of the control fruits at 21 days of storage ($L^* = 29.36 \pm 1.36$ and $C^* = 25.77 \pm 1,32$). The HPLC analyses to evaluate anthocyanins of the rind showed that cyanidin-3-rutinoside, the more abundant anthocyanin of litchi pericarp, had a smaller reduction than that registered in control fruits. These data were correlated with total anthocyanins determined by spectrophotometry ($R^2 = 0.9334$). The analyses of phenols showed that *Lb. plantarum* diminished the oxidation of these compounds, effect that could be related to the observed reduction in the loss of anthocyanins. As a result, the application of *Lb.*

plantarum significantly diminished browning and preserved the red color of litchi pericarp.

Therefore, both rambutan and litchi in vivo experiments demonstrated that *Lb. plantarum* remained viable on fruit surfaces alone or in combination with chitosan. The development of microorganisms was evident by microbiological counts (log CFU values) and the lactic acid production. These effects explained the color preservation of rambutan and litchi fruits. Additionally, *Lb. plantarum* was able to maintain anthocyanins and phenols on the litchi pericarp.

I. INTRODUCCIÓN

La generación de microatmósferas modificadas en el interior de los frutos por aplicación de películas y recubrimientos es una alternativa de conservación poscosecha, sin embargo para la elaboración de estos cubrientes de superficie es importante tener en cuenta la selección de los materiales, concentración, naturaleza química y posible interacción entre ellos, así como las condiciones de preparación y pruebas para la caracterización de sus propiedades mecánicas y de barrera al transporte de gases.

Uno de los materiales estructurales que ofrece muchas ventajas para formular recubrimientos y películas es el quitosano, debido a su actividad antimicrobiana y su excelente compatibilidad con otras sustancias (Nisperos-Carriedo, 1994).

La combinación de microorganismos con tratamientos hidrotérmicos y algunas sustancias activas, tales como fungicidas y recubrimientos para la conservación poscosecha de frutos es una de las nuevas alternativas para disminuir el uso de sustancias químicas y conservar la calidad química y sensorial de los frutos, contribuyendo también a las condiciones de inocuidad que exigen los mercados (Govender, *et al.*, 2005; El Ghaouth, *et al.*, 2000). *Lb. plantarum* ha sido utilizado como agente de biocontrol en la industria alimentaria por su producción de ácido láctico y algunos compuestos antimicrobianos (Reina, *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha sugerido el uso de quitosano como soporte de esta bacteria para la producción de ácido láctico e incluso también se le ha propuesto como cubriente y protector para la formulación de microcápsulas de bacterias lácticas (Krishnan *et al.*, 2001; Iyer *et al.*, 2005).

Sin embargo, es insuficiente la información acerca de las interacciones entre el quitosano, las bacterias ácido lácticas (BAL) y el efecto de ambos en la calidad poscosecha de frutos. Por otra parte, es indispensable estudiar los efectos de la temperatura y humedad relativa en el comportamiento de la BAL y su relación con el quitosano, así como la combinación de estos dos factores sobre la conservación poscosecha de frutos. Por lo tanto, en este estudio se elaboraron recubrimientos de quitosano con la incorporación de una BAL, se analizó la interacción del material estructural sobre el desarrollo del microorganismo, su funcionalidad y se evaluó su

efecto en la calidad poscosecha de litchi y rambután en condiciones reales de almacenamiento.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Películas y Recubrimientos

El uso de películas y recubrimientos para mejorar la calidad y vida comercial de frutas y hortalizas es común, ya que tienen la capacidad de retardar la velocidad de respiración, disminuir la pérdida de vapor de agua y emanación de compuestos volátiles y de combatir, controlar y/o prevenir el crecimiento de larvas y microorganismos (Gontard *et al.*, 1994). En frutos y hortalizas también se ha observado que las bajas presiones de oxígeno, generadas en el interior de los frutos por las películas y recubrimientos, tienen efectos benéficos sobre la fisiología del producto, tales como la reducción de la tasa respiratoria, la inhibición de la producción y acción del etileno, así como la reducción de algunas fisiopatías (Ke y Kader, 1992; Pesis, *et al.*, 1993).

2.1.1. Polímeros utilizados para la formación de películas y recubrimientos

La selección de los materiales para formar recubrimientos, se realiza en función de sus características y de las condiciones a las que serán sometidos en el recubrimiento. Los biopolímeros usados para la formación de recubrimientos se clasifican de acuerdo a su composición, carga molecular y solubilidad en agua, pudiendo utilizarse polisacáridos, proteínas, ceras naturales y resinas (Donhowe y Fennema, 1994; Bósquez-Molina, 2004). Sin embargo, es importante resaltar que los biopolímeros naturales de alto peso molecular proporcionan una matriz macromolecular con resistencia cohesiva, con mejor funcionalidad (Díaz-Sobac, 2003). Los carbohidratos y las proteínas tienen la capacidad para formar películas de excelente integridad, sin embargo, dicha capacidad depende de sus características químicas. La carga de un polímero puede ser determinante para la formación de una película; por ejemplo los alginatos y las pectinas requieren la adición de un ión polivalente, usualmente calcio, para facilitar la formación de la película y al igual que las proteínas son susceptibles a cambios de pH (Donhowe y Fennema, 1994).

Existen aditivos que pueden mejorar y modificar las propiedades mecánicas, nutritivas y sensoriales de los recubrimientos, tales como: plastificantes, surfactantes y conservadores químicos. Sin embargo, también pueden alterar adversamente las propiedades de permeabilidad al vapor de agua, gases o transporte de solutos; su influencia dependerá de su concentración, estructura química, grado de dispersión en la película y grado de interacción con el polímero (Kester y Fennema, 1986).

2.1.2. Propiedades funcionales de los recubrimientos comestibles

Un recubrimiento es una delgada capa de material comestible formado sobre un alimento a partir de una emulsión o hidrodispersión que es aplicado por atomización, inmersión, aplicación mecánica o manual con brochas (Bosquez *et al.*, 2000). Además, estos recubrimientos son biodegradables con lo cual se evita la acumulación de desechos y problemas ambientales (Petersen *et al.*, 1999). La aplicación de recubrimientos comestibles proporciona muchas ventajas respecto a la interacción de los alimentos frescos con el medio que los rodea, como la disminución del intercambio gaseoso (O_2 y CO_2), migración de grasas y aceites, y transporte de solutos, mejorando las propiedades mecánicas y la integridad de los alimentos, además de la retención de los compuestos volátiles, (Kester y Fennema, 1986).

2.2. Quitosano

2.2.1. Quitina

La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza después de la celulosa, con características estructurales y químicas similares, es uno de los componentes estructurales mayoritarios del exoesqueleto de insectos, crustáceos, artrópodos, anélidos, moluscos, celenterados y es componente de la pared celular de algunos hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, así como de algas como las diatomeas (Shahidi, *et al.*, 1999).

2.2.2. Quitosano

El quitosano, un derivado desacetilado de la quitina (2-amido-2-desoxi-beta-D-glucosa) (Fig. 1), es uno de los compuestos más prometedores para la elaboración de películas y recubrimientos debido a que es un biopolímero natural no tóxico, biodegradable, biofuncional, biocompatible y con poder antimicrobiano (El Ghaouth, *et al.*, 1991; Wang, 1992; Darmadji e Izumimoto, 1994; Jongrattiporn, *et al.*, 2001; Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003). Este biopolímero posee actividad antimicrobiana contra una amplia variedad de microorganismos incluyendo hongos, algas y algunas bacterias. Su funcionalidad y actividad del quitosano dependen de sus características como peso molecular (Mw), grado de acetilación (DA), célula huésped, presencia de nutrientes naturales, composición química o nutricional de los sustratos y condiciones ambientales (Plascencia-Jatomea, 2004; Pacheco *et al.*, 2007).

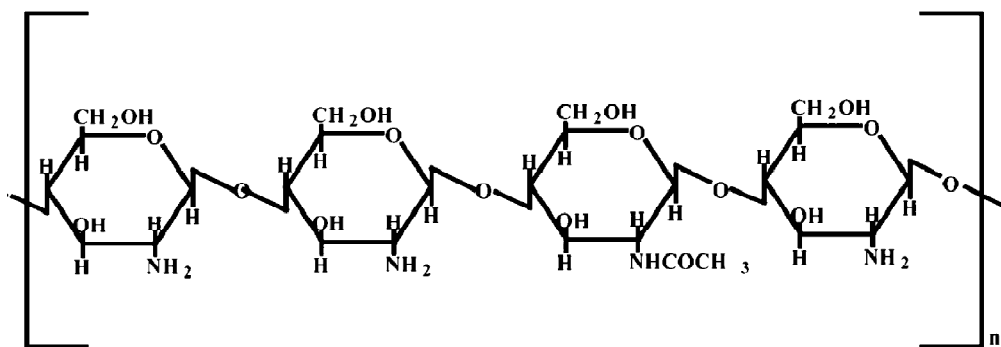


Figura 1. Estructura química del quitosano (Fwu-Long, *et al.*, 2006).

Las películas formadas a partir de quitosano son claras, fuertes, flexibles, buenas barreras al oxígeno y se forman por moldeo de soluciones acuosas; protegen los alimentos de la degradación por hongos y modifican la atmósfera de frutos frescos (Nisperos-Carriedo, 1994). Estudios previos demuestran que estas películas tienen un alto potencial para prolongar la vida de almacenamiento y controlar la senescencia y descomposición de muchos frutos, tales como: durazno, fresa y uva (Du, *et al.*, 1997; El Ghaouth, *et al.*, 1991; Romanazzi, *et al.*, 2002).

2.2.3. Propiedades y características del quitosano

Como se mencionó previamente, el quitosano es biodegradable, no tóxico, biocompatible con células y tejidos animales, puede ser química o enzimáticamente modificado, es insoluble en agua, disolventes inorgánicos y medios alcalinos, pero es soluble en ácidos orgánicos diluidos como: ácido acético, fórmico, succínico, láctico y málico, cuando el pH de la solución es inferior a 6 (Rabea *et al.*, 2003).

Las propiedades y características del quitosano como pureza, viscosidad, desacetilación, peso molecular y estructura polimórfica pueden variar debido a varios factores en su proceso de manufactura, que pueden influir en las características finales del producto (Goosen, 1997). Dependiendo del estado del quitosano ya sea sólido o en solución, existirán otros parámetros que jueguen un papel importante. En el estado sólido, las propiedades dependen de la accesibilidad y la movilidad de las cadenas del polímero, parámetros relacionados con la cristalinidad y morfología, la hidratación y la cinética de hidratación. En solución las propiedades dependen de los parámetros de solubilidad y conformación. La viscosidad de las soluciones de quitosano se ven afectadas por el grado de acetilación, peso molecular, concentración, pH y temperatura, menores concentraciones del biopolímero permiten una mayor solubilidad, así como menores grados de acetilación, aumentan la viscosidad de la solución (Rabea *et al.*, 2003).

2.2.4. Actividad antimicrobiana

Se ha reportado actividad antimicrobiana del quitosano contra diversos microorganismos incluyendo hongos, algas y algunas bacterias gram negativas y positivas. Esta actividad depende de factores intrínsecos como el tipo de quitosano, el peso molecular, el hospedero, la composición nutritiva y química del sustrato, pH del medio de cultivo y las condiciones ambientales. La actividad antimicrobiana del quitosano es más alta a pH de 6.0 o menores, de 7.5 contra hongos fitopatógenos, debido a la protonación de la mayoría de los grupos aminos (Rabea *et al.*, 2003).

2.2.5. Mecanismos de acción del quitosano

Los mecanismos exactos de acción aún no se conocen. Sin embargo, diversos investigadores han propuesto la existencia de interacciones entre las cargas (+) del quitosano y las cargas (-) de la membrana celular, con la consecuente desnaturalización o rompimiento de los componentes celulares o proteínicos de los microorganismos (Shahidi, *et al.*, 1999); también se ha propuesto la capacidad quelante del quitosano sobre oligoelementos importantes para el desarrollo celular; la activación de mecanismos de defensa en las células huésped, los cuales se relacionan con la reducción de aflatoxinas, la inducción de fitoalexinas y de compuestos fenólicos, y el incremento en la producción de quitinasas, quitosanasas, glucanasas o fenilalanina amoníalinas (Vander *et al.*, 1998); también se ha propuesto la penetración del quitosano al interior de la célula microbiana y su interacción con el DNA, inhibiendo la síntesis de proteínas (Plascencia-Jatomea, 2004).

Las actividades antimicrobianas del quitosano difieren notablemente con respecto a su peso molecular ya que se ha reportado que los quitosanos con alto peso molecular son más efectivos disminuyendo el crecimiento de algunas bacterias gram positivas que sus oligómeros, además el ácido orgánico utilizado como solvente también influye sobre su actividad, particularmente se ha observado que el ácido acético no afecta el crecimiento de bacterias lácticas, pero sí el de otras bacterias gram positivas y negativas (Hong Kyoon *et al.*, 2002).

2.2.6. Características de barrera de los recubrimientos de quitosano

El quitosano forma películas y recubrimientos claros, fuertes, flexibles y con buenas propiedades de barrera al oxígeno (Nisperos-Carriedo, 1994). Caner *et al.*, (1998) reportaron que las películas de quitosano producidas con ácido acético mostraron los valores más bajos de permeabilidad al vapor de agua comparados con los obtenidos con otros ácidos (propiónico, fórmico y láctico). Por otra parte, Wiles *et al.*, (2000) probaron diferentes grados de acetilación del quitosano en la formación de películas y no encontraron diferencias significativas entre los valores de permeabilidad al vapor de agua. Park *et al.*, (2002) reportaron que la fuerza de las películas se incrementó cuando se aumentó el peso molecular, observándose los valores más altos cuando se utilizó

ácido acético como solvente. La fuerza del recubrimiento pudo haber sido producto de la formación de dímeros por el efecto del disolvente (Park *et al.*, 2002). Otros resultados demuestran que los quitosanos de alto grado de acetilación muestran bajos valores de permeabilidad al vapor de agua, que no se ven afectados por la variación de pH cuando se utiliza ácido acético como disolvente (Myong *et al.*, 2006).

2.2.7. Combinación del quitosano con sustancias activas

Una de las características importantes de los recubrimientos elaborados con quitosano es que se les pueden incorporar diversas sustancias activas tales como compuestos antimicrobianos, antioxidantes, nutrientes, colorantes y saborizantes, que pueden ser liberados de manera controlada (Park y Zhao, 2004). Ouattara *et al.*, (2000) reportaron que las formulaciones enriquecidas con ácidos acético y propiónico liberaron concentraciones entre 2 y 22 %, permaneciendo en la matriz estructural de 48 a 168 h para cada ácido respectivamente, inhibiendo el crecimiento de algunas bacterias (*Enterobacteriaceae* y *Serratia liquefaciens*), pero no el de bacterias ácido-lácticas.

Algunas biomoléculas como la lisozima pueden combinarse exitosamente con quitosano para incrementar su biofuncionalidad y eficacia antimicrobiana. La eficacia lítica de la lisozima hacia *Micrococcus lysodeikticus* o *Micrococcus luteus* ha sido evaluada en estructuras poliméricas naturales o sintéticas tales como celulosa, poli(acrilamida) (Datta *et al.*, 1973), quitosano, sílica gel, poliestireno y divinil benceno (Crapisi *et al.*, 1993). Cuando la lisozima es incorporada a la matriz de recubrimientos de quitosano es liberada de manera controlada, reteniendo su actividad lítica contra la pared celular bacteriana (Park *et al.*, 2004).

2.2.8. Modificaciones químicas del quitosano

Una de las deficiencias más notables del quitosano, se presenta con la disminución de las propiedades mecánicas y el debilitamiento de su estabilidad estructural, particularmente cuando acarrea demasiada humedad o virtualmente se “moja” (Knaul *et al.*, 1999). Para disminuir estas deficiencias, se han propuesto diversas modificaciones químicas. Knaul *et al.*, (1999) mejoraron significativamente las características mecánicas del quitosano cuando lo entrecruzaron químicamente con

glioxal y/o glutaraldehído. Por otra parte, Fwu-Long, *et al.*, (2006) disminuyeron la WVP de películas de quitosano cuando entrecruzaron este biopolímero con glutaraldehído y ácido aglicón-geniposídico. En este mismo estudio se observó que la actividad antimicrobiana del material no se vio afectada por el entrecruzamiento.

2.2.9. Combinación de quitosano con microorganismos

Diversos estudios demuestran que las propiedades funcionales del quitosano pueden mejorar y aportar una alternativa muy prometedora para asegurar la calidad y seguridad de los productos alimenticios. En particular, algunos investigadores han probado la combinación de quitosano o sus derivados con microorganismos para mejorar productos alimenticios o mejorar las características de soportes para la producción de ácido láctico (El Ghaouth *et al.*, 2000; Goksungur *et al.*, 2005). Zhou *et al.*, (1998) reportaron que el recubrimiento de este biopolímero a microcápsulas de alginato, puede ayudar a liberar controladamente bacterias ácido lácticas microencapsuladas durante la producción de productos lácteos como el queso. De acuerdo con estos reportes, se puede proponer la aplicación de quitosano con algunas bacterias lácticas sin afectar severamente su viabilidad.

2.3. Bacterias ácido lácticas

2.3.1. Definición general.

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de microorganismos integrado por géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Pueden ser descritos como cocos o bacilos Gram-positivos no esporulados, anaeróbicos, microaerófilicos o aerotolerantes; los cuales son oxidasa, catalasa y bencidina negativos, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de los carbohidratos (Carr *et al.*, 2002).

2.3.2. Clasificación.

Pueden clasificarse en géneros diferentes dependiendo de su morfología, modo de fermentación de la glucosa (homofermentativas y heterofermentativas), crecimiento a

diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a alta concentración de sal y tolerancia ácida o alcalina (Axelsson, 1998).

2.3.3. Características fermentativas

Las BAL que poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto principal de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis (Embden-Meyerhof) son clasificadas como homofermentativas, mientras que, las heterofermentativas convierten hexosas a pentosas por la vía de 6-fosfogluconato-fosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, algunos otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Carr *et al.*, 2002).

2.3.4. *Lactobacillus plantarum*

Lb. plantarum es una de las bacterias ácido lácticas homofermentativas mejor conocidas y usadas de manera común para la producción de ácido láctico a partir de varios azúcares fermentables (lactosa, sacarosa, glucosa y fructosa). Este microorganismo presenta altos rangos de conversión de estos carbohidratos, pero también es capaz de asimilar algunos otros compuestos como pectinas presentes en las plantas y por tanto es uno de los microorganismos dominantes en la fermentación de vegetales (Fu y Mathews, 1999).

2.3.4.1. Componentes antimicrobianos producidos por *Lb. plantarum*

Recientemente las BAL han tomado gran importancia en el campo de los alimentos debido a que se ha observado que pueden controlar el crecimiento de diversos microorganismos (Laitila, *et al.*, 2004). Esto es debido a su habilidad para acidificar el medio y producir una gran variedad de compuestos con amplio espectro antimicrobiano tales como: ácido láctico, ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, y compuestos de bajo peso molecular (Ouwehand, 1998; Cataloluk, 2001). *Lb. plantarum* es capaz de producir diferentes compuestos con actividad antimicrobiana (ácidos fenil láctico, 4-hidroxi fenil láctico, benzoico, 5-metil-2, 4-imidazolidinediona, tetrahidro-4-hidroxi-4-metil-2H-pirano-2-ona y 3-(2- metil propil)-2, 5-piperazinediona), los cuales son efectivos contra lactobacilos, lactococos, algunos patógenos como *Listeria*

monocytogenes, *Bacillus cereus* y *Clostridium perfringens* (Enan *et al.*, 1996; Suma *et al.*, 1998) y algunos hongos como *Fusarium avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum* y *F. oxysporum* (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Lavermicocca *et al.*, 2000; Laitila *et al.*, 2002).

2.3.5. Producción de ácido láctico

La producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos en el medio, lleva a una acumulación y disminución del pH del ambiente, inhibiendo a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. La forma no disociada de este ácido orgánico tiene la capacidad de penetrar la pared celular microbiana, donde el pH más alto del contenido celular promueve su disociación, liberando iones hidrógeno y el anión correspondiente; interfiriendo con el metabolismo celular (Ouwehand, 1998; Hall, 2002).

2.3.6. Fermentación ácido láctica

La fermentación ácido láctica, es uno de los métodos más antiguos para preservar alimentos, que consiste en un proceso microbiano muy complejo en el cual una población de bacterias lácticas llega a ser la microflora predominante. Mediante este proceso, se obtienen productos estables debido a la rápida fermentación láctica anaeróbica, la cual reduce el pH a niveles que inhiben el crecimiento de microorganismos oportunistas que descomponen los alimentos (Shirai *et al.*, 1996).

2.3.7. Factores que afectan la fermentación ácido láctica

La producción de ácido láctico y los compuestos antimicrobianos depende de la composición y condiciones del medio siendo los principales factores que influyen: i) carbohidratos fermentables; ii) factores orgánicos e inorgánicos de crecimiento; iii) anaerobiosis; iv) temperatura; v) cloruro de sodio; vi) ácidos orgánicos y pH; vii) dióxido de carbono; viii) compuestos inhibitorios; ix) capacidad amortiguadora del sustrato; x) número inicial de bacterias ácido lácticas; y xi) número inicial de microorganismos competitivos (Owens y Mendoza, 1985).

2.3.8. Inmovilización de bacterias lácticas en soportes

Las bacterias ácido lácticas han sido inmovilizadas para permitir su desarrollo en condiciones adversas de actividad de agua (a_w), pH o temperatura, así como para mejorar su aplicación. La inmovilización se ha realizado en diversos soportes, tales como alginato, quitosano y otros polímeros; de esta forma se ha mejorando su liberación, actividad y viabilidad. Elezi *et al.*, (2003) probaron exitosamente la inmovilización celular de *Lactobacillus brevis*, en celulosa deslignificada para la producción en bioreactores por lote de ácido láctico, disminuyendo el tiempo de fermentación de 48 a 13 h. Por otra parte, Zhou *et al.*, (1998) reportaron que la producción de ácido láctico por bacterias lácticas puede disminuir con la inmovilización celular, pero puede ser compensada por el aumento de la carga celular sobre los soportes.

Para la sobrevivencia y liberación de bacterias en quitosano, el peso molecular del polímero es un factor determinante, ya que su actividad y liberación celular se ve disminuida en soportes con quitosano de bajo peso molecular (Zhou *et al.*, 1998), aunque por otra parte, la estabilidad de las BAL se ve mejorada en soportes de alginato recubiertos con quitosano de alto peso molecular, incluso en condiciones muy ácidas (pH de 1 a 3) (Lee *et al.*, 2004; Iyer *et al.*, 2005). En contraste, Goksungur *et al.*, (2005), analizaron la producción de ácido láctico por *Lb. casei* NRRL B-44, aumentando la bioconversión de lactosa a ácido láctico, disminuyendo el rompimiento celular cuando las células se inmovilizaron en soportes de alginato-quitosano en comparación con soportes de alginato-Ca, incluso encontraron que las células fueron tan estables, que se pudieron reutilizar hasta cinco veces sin pérdida de la actividad celular o deformación. Lo anterior muestra que el quitosano a pesar de tener un efecto antimicrobiano, puede servir como soporte y tener un efecto protector para algunos microorganismos, permitiendo su sobrevivencia y actividad.

2.3.8.1. Liberación celular a partir de soportes

La inmovilización celular de BAL para la producción de ácido láctico en soportes de alginato de calcio, puede llevar al desplazamiento de los iones calcio por los iones lactato, que desestabilizan la matriz y llevan a la ruptura de la estructura o su disolución (Audet *et al.*, 1989; Li, 1996). Además, las células bacterianas cercanas a la

superficie o que se encuentran en esta periferia, pueden fácilmente separarse de los soportes y crecer en los medios de cultivo (Tanaka *et al.*, 1989). Para estabilizar estas matrices y evitar la consecuente disociación celular, se han probado diversos recubrimientos como poli-L-lisina, polietilen imina, glutaraldehido y quitosano (Champagne *et al.*, 1992; Bódalo *et al.*, 1997; Goksungur *et al.*, 2005).

Por otra parte, debe tomarse en cuenta que la liberación celular es parte esencial de la actividad y desarrollo de los microorganismos en los soportes. Audet *et al.*, (1998) reportaron que el crecimiento celular puede desarrollarse en colonias alojadas en pequeñas cavidades cercanas a la superficie de los soportes. Entonces, la fuerza celular de las microcolonias en estas cavidades puede disminuir la resistencia y abrir brechas en la estructura del soporte permitiendo así la liberación celular. Cachón *et al.*, (1995) también mostraron que *Lb. lactis* puede colonizar eficientemente la periferia de soportes de alginato formando un “estado estacionario”, contribuyendo a la liberación de BAL a través del crecimiento celular. Smidsrod y Skjak-Braek (1990) reportaron que soportes de alginato (2 % p/v) tienen tamaño de poro entre 0.005-0.2 μm mucho más pequeños que la mayoría de las células ($> 0.5 \mu\text{m}$) y por tanto interfieren con el movimiento celular a través del soporte, en dicho estudio se observó crecimiento celular en cadenas cortas de 3-5 células a través del soporte.

La encapsulación celular puede preservar por largos periodos la viabilidad de las bacterias ácido lácticas. Song *et al.*, (2003) mostraron que la encapsulación de *Lb. casei* en soportes de alginato puede conservar su viabilidad durante un periodo de 6 semanas con una cuenta de $2.0 \pm 5 \times 10^7$ UFC/mL, con respecto a valores de $3.0 \pm 0.5 \times 10^4$ UFC/mL de bacterias no encapsuladas. Por otra parte, se ha observado que la utilización de prebióticos como raftilina, raftilosa y amilosa de maíz mejoran la sobrevivencia y estabilidad de bacterias lácticas encapsuladas en soportes de alginato recubiertos con quitosano en condiciones de pH 2.0 (Iyer y Kailasapathy, 2005).

2.4. Frutos

2.4.1. Desarrollo fisiológico

La vida de los frutos puede dividirse en tres etapas fisiológicas: el crecimiento, la maduración y la senescencia; aunque no es fácil establecer una clara distinción entre las dos últimas. El crecimiento implica la división celular y el subsiguiente desarrollo de las células que dan cuenta del tamaño final alcanzado por el fruto y de la especialización de sus tejidos. La maduración suele iniciarse antes de que termine el crecimiento e incluye diferentes actividades en los distintos frutos. Al crecimiento, especialización de tejidos, maduración y senescencia suele hacerse referencia conjunta hablando de desarrollo. La senescencia es un fenómeno genéticamente programado y altamente regulado durante el cual algunas rutas biosintéticas se inhiben y otras se activan. Esta incluye cambios dramáticos en la mayoría de los organelos, particularmente en los plástidos, las células mesofílicas y el tejido parenquimático de la pulpa de los frutos que conducen finalmente a la muerte (Dangl, *et al.*, 2002).

2.4.1.1. Cambios sensoriales durante la maduración

Es importante señalar que existe un periodo en el que los frutos adquieren las características de aroma, sabor, textura, color y succulencia que los definen como comestibles, proceso que es conocido como maduración de consumo. La división y el crecimiento del fruto solo se completan cuando éste permanece unido a la planta, pero la maduración de consumo y la senescencia pueden proseguir después de la cosecha en frutos climatéricos (Willis *et al.*, 1989). El fruto sufre tras la recolección, numerosas transformaciones físicas y químicas determinantes para su aceptación por el consumidor.

Los atributos de calidad del fruto producto de estas transformaciones pueden ser agrupados en: cambios de olor, color, sabor y textura. La maduración de consumo es un cambio que transforma el tejido fisiológicamente maduro pero no comestible en otro visual y gustativamente atractivo; además señala las etapas finales del desarrollo y constituye el comienzo de la senescencia (Pérez y Laborde, 1994).

Estos cambios representan un amplio espectro de procesos bioquímicos sintéticos y degradativos, muchos de los cuales están relacionados entre sí. Dos de los más importantes son la respiración y la síntesis de etileno, fenómenos que han recibido una atención prioritaria cuando se intenta explicar el mecanismo del proceso de maduración (Willis *et al.*, 1989).

2.4.2. Frutos climatéricos

Muchos frutos exhiben un gran incremento en la tasa respiratoria en la parte final de la maduración, este periodo es llamado climaterio y por ello se les llama a este tipo de frutos climatéricos. Durante las fases finales del crecimiento celular del fruto, la respiración de los frutos disminuye a valores muy bajos; sin embargo es seguido por un incremento de cuatro a cinco veces en la tasa con la llegada de la maduración de consumo, denominado pico respiratorio o climatérico y posteriormente la respiración disminuye en el periodo post climatérico ó senescencia (Kays, 1991). Los frutos climatéricos se caracterizan también porque la síntesis de etileno se incrementa en respuesta a la exposición a bajos niveles de esta hormona (proceso denominado producción autocatalítica de etileno).

2.4.3. Frutos no climatéricos

El climaterio respiratorio no ocurre en todos los frutos, muchos de ellos no parecen mostrarlo. Más bien, los frutos no climatéricos mantienen una relativamente baja, pero consistente tasa respiratoria durante la maduración de consumo (Kays, 1991).

2.4.4. Uso de Microorganismos en Frutos

A pesar de que los recubrimientos son una de las mejores opciones para el control poscosecha de patógenos en frutos, los largos tiempos de almacenamiento disminuyen su habilidad para el control de patógenos. Una de la alternativas, es el uso de microorganismos para controlar el crecimiento de patógenos y disminuir la incidencia de enfermedades poscosecha (Cooke, 1993). El control biológico es actualmente una de las opciones más prometedoras para reducir el uso de fungicidas

sintéticos (Fan y Tian, 2001; El Ghaouth *et al.*, 2002). Por ello se han investigado las adaptaciones ecológicas y las características de crecimiento de los microorganismos en diversos frutos, ya que las bacterias aisladas del mismo tipo de producto, tendrán las mayores ventajas de sobrevivir en este tipo de microecosistemas (Vescovo *et al.*, 1996; Breidt y Fleming, 1997).

Las BAL han sido ampliamente estudiadas para controlar el crecimiento de patógenos en productos fermentados. Especies como *Lb. plantarum* tiene efectos fungistáticos, controlando el desarrollo de *Fusarium* en el malteado de la cebada, efecto relacionado con la producción de compuestos de bajo peso molecular, como el ácido láctico y el ácido benzoico entre otros (Niku-Paavola, *et al.*, 1999; Laitila *et al.*, 2002). Sin embargo, no se han explotado sus propiedades y características en frutos, ya que algunas especies de BAL son flora normal de estos productos.

La aplicación de microorganismos de biocontrol después de la cosecha sólo ha tenido resultados preventivos, por lo cual el control de los patógenos poscosecha no puede basarse solamente en la aplicación de estos microorganismos. Por lo tanto, se recomienda su uso dentro de esquemas de manejo que integren prácticas apropiadas, tales como el uso de recubrimientos, métodos de recolección, manejo y desinfección, así como el uso de sustancias naturales que potencien la acción de estos microorganismos.

2.4.5. Rambután

El rambután (*Nephelium lappaceum*) es un fruto no climatérico altamente perecedero, de la misma familia (*Sapindaceae*) que el litchi y longan. Este fruto es nativo del oeste de Malasia y de la isla de Sumatra (Watson, 1988; Tindall, 1994). Entre las principales regiones productoras en el mundo se encuentran Indonesia, Malasia, Singapur, Tailandia, Vietnam y Australia.

En nuestro país es un fruto poco conocido, pero existe potencial para incrementar su consumo, así como para el establecimiento y desarrollo de huertas. En el 2008 según datos de la SAGARPA, se obtuvo una producción de 865 toneladas en una superficie de 117.5 hectáreas, que se puede comercializar a un precio en el medio rural de 15,000 pesos por tonelada con un costo de producción de 6,000 pesos/Ton (SIAP, SAGARPA, 2009; FIRA, 2009). Cabe mencionar que en el mercado al menudeo este

fruto, se puede llegar a cotizar entre 60 y 70 pesos el kilogramo, dependiendo de la calidad (FIRA, 2009).

Considerado un fruto atractivo y exótico, posee una pulpa clara, con un contenido de sólidos solubles de 17 a 21 %, baja acidez (0.36%, principalmente por la presencia de ácido cítrico) y un contenido de vitamina C de alrededor de 70 mg/100g de porción comestible (Kader, 2006). Los principales problemas que presenta son el daño por frío y el oscurecimiento de la piel y las espinas, los cuales se relacionan con la deshidratación y el daño mecánico (Landrigan *et al.*, 1996). En el litchi el oscurecimiento del pericarpio se ha relacionado con la degradación de las antocianinas y del ácido ascórbico, y con las actividades de las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa que actúan sobre los fenoles y pueden por tanto, acelerar la degradación de antocianidinas, aumentando el número de subproductos de color oscuro a pardo (Underhill y Critchley, 1995; Jiang *et al.*, 2004).

Existen diversos tratamientos poscosecha para conservar las características de calidad del rambután, dentro de los cuales se recomiendan temperaturas de almacenamiento de 8 a 15 °C con humedades relativas (HR) de 90 al 95 % durante 14 ó 16 días de almacenamiento, o durante 3 a 5 días a 20 °C con 60 % HR (O'Hare, 1992; Ketsa y Paull, 2004). Se han recomendado atmósferas controladas conteniendo 7 a 12 % de CO₂ y 3 a 5% de O₂ a 10 °C para retener el color durante 4 ó 5 días (Kader, 1993). Asimismo se ha considerado el uso de bolsas plásticas para reducir la pérdida de agua, prolongando la vida poscosecha de 14 a 21 días (Mendoza *et al.*, 1972; Ketsa y Klaewkasetkorn, 1995; Mohamed y Othman, 1988).

2.4.6. Litchi

El litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) es un fruto exótico no climatérico altamente perecedero, perteneciente a la familia *Sapindaceae*, apreciado comercialmente por su sabor característico. Entre las principales regiones productoras en el mundo se encuentran: China, India, Tailandia, Vietnam, Indonesia, Madagascar, Sudáfrica, Australia, Estados Unidos de Norteamérica e Israel con una producción anual superior a los 2, 000, 000 de toneladas (Kadam y Deshpande, 1995, Jiang *et al.*, 2003). En México, de acuerdo al Anuario Estadístico de la Producción Agrícola, se contaban hasta el 2008

con una superficie sembrada de 3,390.64 ha, una producción de 10,864.56 ton y un valor aproximado de producción de 190, 483, 740 pesos (SIAP, SAGARPA, 2009).

El fruto posee una pulpa clara, con un 80 % de agua, 40.2 a 90 mg vit C /100 g de fruta, 0.20 a 1.1 % de acidez y de 11.8 a 20.6 % de azúcar. Paull *et al.*, (1984); Singh *et al.*, (1987); y Batten (1989) reportan que para la mayoría de las variedades cultivadas, las mejores características están determinadas por el cociente sólidos solubles totales/acidez titulable (18-21 %/0.5-1 %), citándose un cociente de 30-40 como óptimo.

La pérdida de calidad del fruto está estrechamente relacionada con el oscurecimiento de la cáscara, debido principalmente a la pérdida de agua (Scott, *et al.*, 1982; Underhill y Critchley, 1994), así como al estrés por calor generado en los climas cálido-secos donde crece, senescencia, daño por frío y ataque de patógenos e insectos. Las células del mesocarpio son las primeras que se tornan oscuras, seguidas por el epicarpio y endocarpo (Holcroft y Mitchan, 1996). El oscurecimiento del pericarpio está fuertemente afectado por diversos factores de almacenamiento tales como el tiempo y la temperatura, la humedad relativa y la presencia de oxígeno (Kadam y Deshpande, 1995). El oscurecimiento del pericarpio se ha relacionado con la rápida degradación de antocianinas, vitamina C y con las actividades de las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa, produciéndose subproductos de color oscuro a pardo (Underhill *et al.*, 1992; Underhill y Critchley, 1995).

Existen diversos tratamientos poscosecha para conservar las características de calidad del litchi, se ha observado que el enfriamiento con posterior envasado en bolsas de polietileno favorece una vida poscosecha mayor (Ketsa y Leelawatana, 1992). También los tratamientos anóxicos con N₂ puro por tiempos cortos han mejorando la calidad de los frutos de litchi (Jiang., *et al*, 2004). El mantenimiento del pH del pericarpio en valores ácidos, es uno de los factores más importantes para la conservación de las antocianinas y por ende para retener el color, diversos investigadores han probado la inmersión del fruto en soluciones diluidas de ácido clorhídrico, sulfúrico y ascórbico para la preservación de la coloración del pericarpio (Zauberman *et al.*, 1991; Underhill *et al.*, 1992; Duvenhage 1994).

Dentro de los tratamientos más exitosos para controlar el cambio de coloración se encuentra la fumigación con dióxido de azúfre, aunque este compuesto es considerado

tóxico (Swarts y Anderson, 1980; Kremer-Kohne y Lonsdale, 1991; Paull *et al.*, 1995). La fumigación con dióxido de azufre (SO₂) controla el oscurecimiento del fruto, efecto que se ha relacionado con la inhibición de la actividad de la polifenol oxidasa (Underhill, *et al.*, 1992). Sin embargo, en algunos casos se ha observado que el tratamiento con dióxido de azufre produce una decoloración del fruto, que puede revertirse en cierta medida con la aplicación de soluciones de ácido clorhídrico después del tratamiento con este gas (Underhill, *et al.*, 1992; Jonhson, *et al.*, 2002). A pesar de que estos tratamientos disminuyen la actividad de la polifenol oxidasa y mantienen el pH del pericarpio, disminuyendo la oxidación de las antocianinas, se ha encontrado que favorecen el desarrollo de hongos en períodos prolongados de almacenamiento (Jiang, *et al.*, 2003).

Existen otros métodos alternativos, como la aplicación de hidrotermia o tratamientos con vapor, los cuales conservan las características de inocuidad y pueden mejorar la vida poscosecha de diversos frutos. Específicamente para el fruto de litchi se ha recomendado un tratamiento hidrotérmico a 49 °C por 12 min, para prevenir la diseminación de la mosca oriental de la fruta (*Cryptophlebia spp.*) (Follet, *et al.*, 2002).

El litchi es muy susceptible a enfermedades poscosecha producidas por *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rizhopus* y *Colletotrichum* entre otros (Roth, 1963; Prasad y Bilgrami, 1973; Scott *et al.*, 1982; Coates *et al.*, 1994). Se han utilizado muchos fungicidas para inhibir estos microorganismos, por ejemplo, el benomil el cual posee un amplio espectro de actividad fungicida y es un agente efectivo en el control de plagas en litchi. Sin embargo, el uso de fungicidas químicos está limitado por el desarrollo de resistencia en patógenos (Prusky *et al.*, 1985; Viñas *et al.*, 1991; Holmes y Eckert, 1999), toxicidad y al daño que provocan a la salud y al ambiente (Janisiewicz y Korsten, 2002).

También se ha recomendado el uso de recubrimientos para conservar las características poscosecha de litchi. Estudios en litchi y longan han demostrado que la aplicación de recubrimientos de quitosano al 2 % (p/v), retarda efectivamente el oscurecimiento de estos frutos en almacenamiento a bajas temperaturas (Zhang y Quantick, 1997; Jiang y Li, 2000). Por otra parte, en un estudio posterior, Jiang *et al.*, (2005) demostraron que las películas de quitosano conservan las características

poscosecha del fruto de litchi cuando es retirado de un almacenamiento a 2 °C durante un periodo de 20 días y es puesto en condiciones ambientales (25 °C, 80-90 % HR). A pesar de que los recubrimientos son una de las opciones más promisorias para reducir la pérdida de agua y evitar el oscurecimiento, no existen suficientes estudios al respecto.

3. ANTECEDENTES

Existen diversos frutos cuya principal problemática se encuentra en torno al mantenimiento de ciertas características químicas y físicas de su superficie, entre ellos el rambután y el litchi, pertenecientes a dos especies de la familia *Sapindaceae* nativas de regiones tropicales y subtropicales de Asia; ambos frutos son altamente perecederos, no climatéricos (Watson, 1988; Tindall, 1994; Kadam y Deshpande, 1995) y en ellos el oscurecimiento del pericarpio y de los tricomas en el caso del rambután, ocurre con gran rapidez después de la cosecha, problema que se ha relacionado con la deshidratación del pericarpio, el daño mecánico y el daño por frío, entre otros (Landrigan *et al.*, 1996; Underhill y Critchley, 1994).

En el litchi el oscurecimiento de la cáscara se ha atribuido a la rápida degradación de antocianinas, a la oxidación enzimática de la vitamina C o ácido ascórbico y a la producción de fenoles poliméricos debido a las actividades de las enzimas antocianasa, peroxidasas y polifenol oxidasas, produciéndose subproductos de color oscuro a pardo (Underhill *et al.*, 1992; Underhill y Critchley, 1995; Jiang, *et al.*, 2004).

Una de las alternativas que se ha usado para la bioconservación poscosecha de frutos es el uso de quitosano, un biopolímero natural no tóxico, biodegradable, biofuncional, biocompatible y con poder antimicrobiano (El Ghaouth, *et al.*, 1991). Se ha propuesto el uso de recubrimientos de quitosano para retardar el oscurecimiento de estos frutos durante su almacenamiento (Zhang y Quantick, 1997; Jiang y Li, 2000). Jiang *et al.*, (2005) demostraron que los recubrimientos de quitosano pueden disminuir el oscurecimiento poscosecha del fruto de litchi.

Para el caso del fruto de rambután también se ha propuesto la combinación de diferentes atmósferas modificadas, temperaturas y películas para disminuir el oscurecimiento y la pérdida de agua (Mendoza *et al.*, 1972; Mohamed y Othman, 1988; O'Hare, 1992; Kader, 1993; Ketsa y Klaewkasetkorn, 1995; Ketsa y Paull, 2004).

La principal razón del oscurecimiento de estos frutos se ha atribuido a la oxidación de antocianinas, que cambian de color cuando el pH del medio aumenta. A pH ácido tienen color rojo, mientras que en pH alcalino presentan un color azul-violáceo (Ketsa y Leelawatana; 1992). Por lo tanto, uno de los principales objetivos de

las investigaciones en litchi ha sido la conservación de un pH ácido en la cáscara para retener el color, para lo que se han propuesto inmersiones de los frutos en soluciones diluidas de HCl, H₂SO₄ y ácido ascórbico (Zauberman *et al.*, 1991; Underhill *et al.*, 1992; Duvenhage 1994). Otro de los tratamientos más exitosos para controlar el cambio de coloración en litchi es la fumigación con SO₂, que disminuye la actividad de la polifenol oxidasa, manteniendo el pH del pericarpio, estabilizando las antocianinas, y disminuyendo su oxidación (Swarts y Anderson, 1980; Kremer-Kohne y Lonsdale, 1991; Paull *et al.*, 1995; Holcroft y Mitcham, 1996). Sin embargo, este tratamiento puede decolorar el fruto, es considerado un compuesto tóxico que puede contaminar el ambiente y favorece el desarrollo de hongos (Jiang, *et al.*, 2003).

Para controlar la degradación poscosecha por hongos se ha recomendado el control biológico. En el caso del fruto de rambután, la combinación de *Trichoderma harzianum* y metabisulfito de potasio se ha utilizado exitosamente para la disminución y el control de patógenos (*C. gloeosporioides*, *G. microchlamydosporum* y *B. theobromae*) (Sivakumar *et al.*, 2000). Sin embargo, el control biológico se ha enfocado al control de plagas y microorganismos y no se ha abordado con suficiente profundidad el uso de microorganismos en el control de las características químicas, organolépticas y físicas de los frutos, principalmente aquellas que se refieren a los cambios de coloración.

Algunos organismos prometedores para la bioconservación de alimentos son las BAL que son consideradas GRAS. Las BAL han sido ampliamente estudiadas para controlar lácteos y productos vegetales fermentados; sin embargo, no se ha abordado suficientemente sus características como posibles agentes de control en frutas, ya que algunas especies como *Lb. plantarum* son flora normal de estos productos, por lo que se encuentran adaptadas a las condiciones y nutrimentos existentes sobre la superficie de estos frutos.

Entre ellas *Lb. plantarum* ha mostrado varias características atractivas, tales como: producción de compuestos de bajo peso molecular, como el ácido láctico y el ácido benzoico entre otros, y actividad fungistática (Niku-Paavola, *et al.*, 1999; Laitila *et al.*, 2002). Por otra parte, estas bacterias parecen tolerar adecuadamente el quitosano, Krishnan *et al.*, (2001) inmovilizaron *Lb. plantarum* en bioreactores con soportes de

polipropileno con quitosano, aumentando la conversión de glucosa en ácido láctico sin disminuir drásticamente la sobrevivencia o efectividad de estos microorganismos. Resultados similares fueron reportados por Song *et al.*, (2003) quienes encapsularon *Lb. casei* en alginato conservando su viabilidad.

Estos experimentos demuestran que el quitosano además de tener un efecto antimicrobiano, puede funcionar como soporte para algunos microorganismos como las BAL, permitiendo su sobrevivencia y actividad, incluso puede considerarse que la encapsulación celular puede preservar por largos periodos la viabilidad de las bacterias ácido-lácticas.

Una de las nuevas alternativas para la bioconservación poscosecha de frutos, es el uso de recubrimientos bioactivos, que combinan las bondades de los biopolímeros como recubrimientos y se aprovechen como vehículos y soporte de algunos microorganismos para el control de patógenos o la producción de algún metabolito. Algunos estudios han experimentado con éxito la combinación de atmósferas modificadas (recubrimientos y películas) junto con microorganismos, mejorando la calidad de diversos frutos con la aplicación de recubrimientos bioactivos (El Ghaouth y Wilson, 1997).

Otros intentos han combinado diversos tratamientos con la aplicación de un microorganismos, Govender *et al.*, (2005) mejoraron el control poscosecha de la antracnosis y la pudrición del pedúnculo en frutos de mango Keit, cuando utilizaron *Bacillus lincheniformis* combinado con un tratamiento hidrotérmico (5 min., 45 °C) con la inmersión posterior en procloraz (20 s) y la aplicación final de cera con citracina. Otros estudios reportan el uso exitoso de recubrimientos bioactivos de quitosano junto con *Candida saitoana* contra *Penicilium digitatum* y *Penicilium italicum* en naranjas (cvs. Washington navel, Valencia, Pineapple, y Hamlin) y limón cv eureka, obteniendo mejor control de patógenos poscosecha y conservando una mejor calidad, incluso obteniendo resultados similares a los de compuestos sintéticos como el imazalil (El Ghaouth *et al.*, 2000).

La acción de los microorganismos de biocontrol puede mejorarse notablemente combinando estos microorganismos con recubrimientos de quitosano. Sin embargo, deben estudiarse ampliamente las propiedades de estos recubrimientos bioactivos, ya

que esta combinación podría alterar significativamente el crecimiento y viabilidad de los microorganismos usados, además de la posible modificación de las propiedades de barrera de los recubrimientos y por tanto de su biofuncionalidad.

A pesar de estas evidencias y de las exigencias del mercado por la inocuidad y calidad en los productos, no se ha abordado con suficiente profundidad la incorporación de microorganismos en películas y recubrimientos de quitosano, para el control poscosecha de frutos y la conservación de su calidad química y sensorial.

4. JUSTIFICACIÓN

La causa principal de pérdidas poscosecha de litchi y rambután, y una limitante sería para su comercialización en mercados nacionales e internacionales es el oscurecimiento de la cáscara o pericarpio. Hasta el momento, el tratamiento poscosecha más efectivo que se conoce para conservar el color rojo del pericarpio del litchi fresco e inhibir su oscurecimiento es la fumigación con dióxido de azufre (SO₂) seguida de un tratamiento en una solución ácida. El SO₂ forma un complejo con las antocianinas (Holcroft y Mitcham, 1996), estabilizándolas y la solución ácida las mantiene en su forma flavilium de color rojo intenso. La fumigación con SO₂ fue desarrollada comercialmente en Sudáfrica (Swarts, 1983; Swarts, 1985) y la aplicación de ácido clorhídrico (HCl) después del tratamiento con SO₂ por Underhill (1989) en Queensland, Australia y por Zauberman *et al.*, (1989) del Instituto Volcani de Israel.

El tratamiento adecuadamente aplicado conserva el pericarpio de color rojo hasta por 25-30 días en refrigeración (Muy Rangel, 2008; Villaseñor, 2008, comunicación personal), inhibe la producción de compuestos que producen el oscurecimiento de la cáscara y destruye algunas plagas que infestan al litchi al momento de la cosecha. Sin embargo, no se mantiene el color rojo brillante natural del litchi fresco sino un color rojo opaco artificial, el sabor se altera por reducción de la acidez de la pulpa, aumenta la pérdida de peso en el almacenamiento e intensifica las microfracturas de la cáscara (Sivakumar *et al.*, 2007). Asimismo, es un tratamiento poco amigable desde el punto de vista medio ambiental pues el SO₂ que se genera durante el tratamiento se libera al ambiente y las aguas residuales ácidas contaminan el suelo y los mantos acuíferos, a menos que sean tratadas antes de su desecho. Adicionalmente, el uso poscosecha del SO₂ está limitado a uvas en los Estados Unidos (Tongdee, s/año) y restringido en Japón y la Unión Europea (Sivakumar, *et al.*, 2007) debido a los riesgos que presenta para los trabajadores y a las reacciones alérgicas y problemas respiratorios que puede producir en personas sensibles, motivo por el cual los residuos del fumigante se limitan a 10 ppm en los Estados Unidos y Francia, y a 20-50 ppm en otros países miembros de la Unión Europea (Sivakumar 2008, comunicación personal).

Por estas razones, se han propuesto algunos tratamientos alternativos a la fumigación con SO₂ tales como aplicaciones de vapor caliente (Kaiser *et al.*, 1995) e inmersión en soluciones calientes del fungicida benomil (Scott *et al.*, 1982) pero ninguna ha sido aceptada ampliamente o establecida comercialmente (Lichter *et al.*, 2000).

El presente trabajo experimental plantea una nueva alternativa, la aplicación de un recubrimiento a base de quitosano, para reducir la pérdida de agua de la cáscara del litchi y rambután que se ha asociado con su oscurecimiento (Underhill *et al.*, s/año) en combinación con la aplicación de bacterias ácido lácticas que produzcan *in situ* ácido láctico, que ayude a estabilizar las antocianinas por acidificación del pericarpio (Martínez-Castellanos *et al.*, 2009). La utilización de microorganismos en litchi con este último propósito no se encuentra reportada en la literatura.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar el efecto de *Lb. plantarum* en recubrimientos de quitosano en la conservación poscosecha de litchi y rambután.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto inhibitorio del quitosano sobre la viabilidad de bacterias lácticas.
- Evaluar la sobrevivencia de *Lb. plantarum* en recubrimientos de quitosano.
- Determinar las características fisicoquímicas y mecánicas de los recubrimientos de quitosano y quitosano- *Lb. plantarum*.
- Evaluar la viabilidad y sobrevivencia de *Lb. plantarum* en modelos *in vivo*, litchi y rambután.
- Evaluar el efecto de quitosano y *Lb. plantarum* en el período de conservación y la calidad de litchi y rambután.

6. HIPÓTESIS

El quitosano utilizado como material estructural para la elaboración de recubrimientos, permitirá la sobrevivencia y viabilidad de bacterias ácido lácticas, las cuales producirán ácido láctico. Con ello se disminuirá el pH del pericarpio lo que contribuirá a estabilizar las antocianinas, compuestos relacionados con el color del pericarpio, con la consecuente disminución del oscurecimiento de los frutos, contribuyendo a la conservación de su color y disminuyendo la pérdida de la calidad. Por otra parte, la aplicación de estos recubrimientos en los frutos tendrá un efecto positivo en la conservación de sus características químicas.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo experimental de la investigación fue dividido en diferentes etapas que se indican en el diagrama de flujo adjunto. a) En principio se estableció el efecto del quitosano sobre la viabilidad de las BAL en placa; b) Se evaluó la sobrevivencia en películas preelaboradas para analizar la forma de aplicación del microorganismo en el recubrimiento; c) la siguiente etapa consistió en la caracterización fisicoquímica de los recubrimientos elaborados junto con la modificación química del quitosano para mejorar sus propiedades de barrera y d) por último se analizó el efecto de los recubrimientos y de las BAL en las características de calidad poscosecha de rambután y litchi.

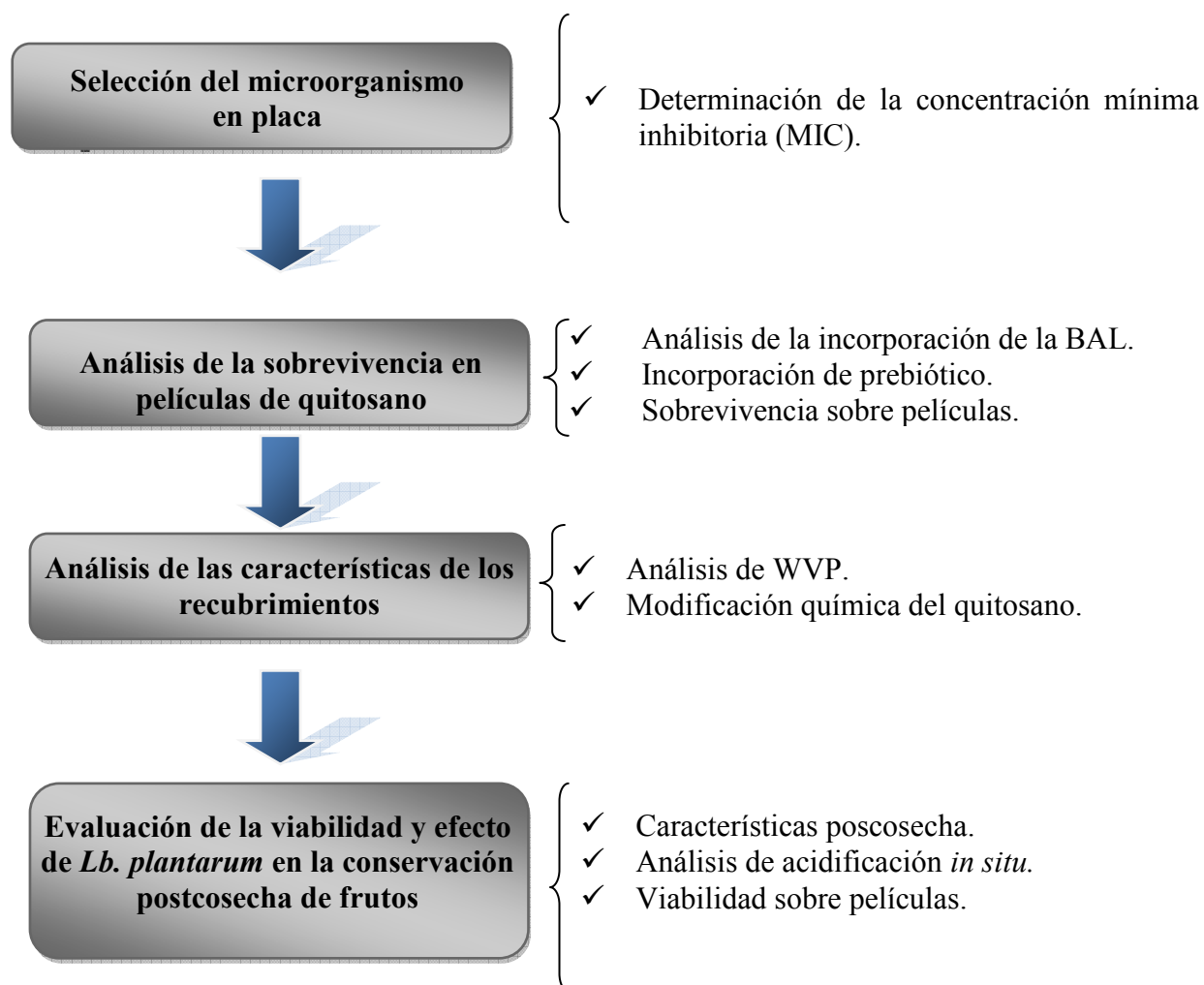


Figura 2. Esquema general de la metodología seguida en el desarrollo experimental.

7.1. Quitosano

Se utilizaron quitosanos de tres diferentes pesos moleculares como materiales estructurales para la elaboración de soportes, recubrimientos y películas. Los primeros tres quitosanos fueron de marcas comerciales: Fluka con 580.8 kDa y 21 % grado de acetilación (DA), quitosano Primex con 171.4 kDa y 18 % de DA; y un quitosano nativo, obtenido en el laboratorio de biopolímeros de la Universidad Autónoma Metropolitana, de 400 kDa y 20 % de DA.

7.2. Microorganismos

Se cultivaron *Lb. plantarum* (APG Eurozym), *Lb. spp.*, *Lb. acidophilus* en medio Man Rogosa Sharpe (MRS) a 30 °C durante 48 h y posteriormente se mantuvieron a 10 °C hasta su utilización.

7.3. Concentración mínima inhibitoria

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) fueron determinadas mediante la determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC/mL) de bacterias en placa, para lo cual el pH del medio MRS se ajustó a pH 5 con ácido acético y se llevó a concentraciones de quitosano de 0, 10, 20, 25 y 30 g/L. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales seriadas de los microorganismos previamente cultivadas en medio MRS a 30 °C durante un periodo de 24 h y se sembraron alícuotas de cada dilución por extensión en placa (Pacheco *et al.*, 2007).

7.4. Incorporación de los microorganismos al quitosano

Para analizar el efecto de la manera de incorporación de los microorganismos a los recubrimientos de quitosano se probaron dos métodos diferentes: bacterias suspendidas en la solución de quitosano (embebidas) y bacterias aplicadas, sobre la superficie (superficiales). En ambos casos se procedió a cultivar los lactobacilos a 30 °C, 24 h, posteriormente, se centrifugaron a 959 g y 5 °C durante 15 min. Los paquetes celulares se lavaron tres veces con agua peptonada 0.1 % (p/v) estéril y se resuspendieron en diferentes soluciones para cada método.

Para incorporar los microorganismos a las superficie se procedió a impregnar esferas de vidrio de 4 mm de diámetro con soluciones de quitosano (20 g/L) durante 20 min, posteriormente fueron secadas a temperatura ambiente durante 48 h. Una vez secas fueron colocadas en suspensiones de bacterias lácticas con 1×10^9 UFC/mL en buffer de fosfatos 0.02 M (pH 7.0) para la su impregnación con los bacilos.

Para los microorganismos embebidos, se siguió la misma metodología, pero las esferas de vidrio se sumergieron dentro de las soluciones de quitosano con el microorganismo incluido en la formulación, a una concentración de 1×10^9 UFC/mL. Posteriormente las esferas se secaron a 30 °C durante 48 h.

7.4.1. Determinación de la sobrevivencia de las BAL en quitosano

Se colocaron ocho esferas con el tratamiento correspondiente en matraces erlenmeyer de 250 mL con medio MRS, se incubaron a 30 °C durante 24 h. De cada uno de los tratamientos se tomaron muestras cada 4 h, las cuales fueron diluidas decimalmente en solución salina isotónica (NaCl 0.09% p/v) sembradas por superficie en placas con agar MRS e incubadas a 30 °C durante 24 h. Las tasas de crecimiento fueron obtenidas ajustando los datos obtenidos con la ecuación 1:

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad (1)$$

donde: X_t es el número de células al tiempo t , X_0 es el número inicial de células, μ es la tasa de crecimiento y t es el tiempo.

7.4.2. Determinación de la sobrevivencia de las BAL en películas preformadas de quitosano

La determinación de la sobrevivencia de las bacterias lácticas en películas de quitosano se evaluó aplicando 0.5 mL de *Lb. plantarum* (1×10^9 UFC/mL) sobre la superficie de las películas en las cajas plásticas de 44 mm de diámetro. Después de dejarlas secar durante 45 min a 25 °C, en la campana de flujo laminar, se determinó inmediatamente la viabilidad (viabilidad inicial). El resto de las películas se estabilizaron en un desecador con una solución saturada de KNO₃ 92 % de HR. Para analizar la

viabilidad de los microorganismos se tomaron tres muestras cada 5 días durante un periodo de 15 días y se colocaron en matraces erlenmeyer con 20 mL de solución fisiológica (0.09 %, NaCl) y se sonicaron 75 s, posteriormente se tomaron alícuotas de 0.1 mL para sembrarlas en placa por superficie.

7.5. Características fisicoquímicas y mecánicas de las películas preformadas de quitosano

7.5.1. Formación de las películas

Para la formación de películas se prepararon soluciones de quitosano con concentraciones de 20 g/L y 10 g/L en ácido acético 0.1 M y se ajustaron a pH 5.0 con NaOH 0.1 N. Posteriormente, 7 g de la solución de quitosano fueron vertidos sobre superficies planas de plástico rígido de 88 mm de diámetro, extendiéndose sobre dicha superficie. Se dejaron secar por convección natural en condiciones ambientales de 22 a 26 °C y 75-85 % de HR durante 72 h. Una vez formadas las películas se retiraron de las superficies plásticas y se almacenaron dentro de desecadores que contenían solución saturada de cloruro de sodio para generar una HR de 75 %.

7.5.2. Espesor de las películas preformadas

A segmentos de cada película de aproximadamente 4 cm² equilibrados a 75 % de HR dentro de desecadores que contenían solución saturada de cloruro de sodio, se les realizaron siete mediciones aleatorias de espesor en diferentes puntos, utilizando un micrómetro digital Mitutoyo (Mitutoyo Ltd. Tokio, Japón).

7.5.3. Propiedades Mecánicas

Las propiedades mecánicas de esfuerzo-deformación de las películas se evaluaron en un equipo TA-XT2i Texture Analyzer. Las muestras se cortaron en tiras de 50 mm de largo por 24.5 mm de ancho y se sujetaron por los extremos mediante mordazas. La fuerza y la elongación fueron determinadas hasta el rompimiento de las películas; los valores obtenidos son el promedio de 7 réplicas. Los valores de resistencia a la tensión (T.S.) se expresaron en Mpa (megapascas).

7.5.4. Permeabilidad al Vapor de agua (WVP)

La permeabilidad se determinó a 25 °C y 10 °C en gradientes de humedad relativa de 0-75 % y 75 - 92 %, utilizando el método gravimétrico sugerido por la ANFOR (Asociación Francesa de Normalización, ANFOR H00-030) y reportado por Martín-Polo *et al.* (1992) y Debeaufort *et al.* (1993). Este método es similar al método de la ASTM E-96-80 (Association of Standard Testing Methods, USA) reportado por McHugh *et al.*, (1993). Las películas utilizadas fueron equilibradas dentro de desecadores que contenían solución saturada de cloruro de sodio a 75 % de humedad relativa durante 48 h. Posteriormente, se hicieron siete mediciones del espesor de dicha películas y se volvieron a colocar en los desecadores durante otras 24 h. Una sección circular de la película se colocó en la parte superior de una celda y se fijó toda la periferia con cinta teflón. Dentro del vial se colocó el material para producir la humedad relativa menor para simular una humedad relativa constante de 0 % ó 75 %.

Las celdas se colocaron en un desecador con tapa esmerilada que contenía una solución saturada de una sal de cloruro de sodio o KNO₃, para generar una humedad relativa de 75 % ó 92 % respectivamente. Debido al gradiente de presión existente, el vapor de agua se difundió a través de la película, observándose una ganancia de peso en la celda (de menor humedad relativa) durante el tiempo de la prueba. La variación en el peso de la celda de permeación fue registrada cada 24 h en una balanza analítica (OHAUS, USA).

La velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA) en g·m⁻¹·s⁻¹ se calculó mediante la ecuación 2:

$$VTVA = \frac{\Delta w}{\Delta t * A} \quad (2)$$

donde: Δw es la ganancia en peso de la celda de permeación durante el periodo de tiempo Δt con un área constante A de 15.902 cm². Se obtuvo la pendiente de Δw vs Δt , mediante regresión lineal y un coeficiente de determinación $R^2 = 0.98$ para los datos. El

valor de **VTVA** se utilizó para determinar la permeabilidad P ($g \cdot m^{-2} \cdot s^{-1} \cdot Pa^{-1}$), de acuerdo a la ecuación 3:

$$P = \frac{VTVA * L}{\Delta p} \quad (3)$$

donde: Δp es el gradiente de presión de vapor entre ambos lados de la película y L es el espesor de la película. Los valores de permeabilidad fueron convertidos a unidades de $g \cdot mm/kPa \cdot d \cdot m^2$, que son comúnmente encontrados en los reportes sobre permeabilidad al vapor de agua de películas y recubrimientos (Donhowe y Fennema, 1994). La determinación de permeabilidad se realizó por quintuplicado a 25 °C y a 10°C.

7.5.5. Construcción de las isotermas de adsorción

Las muestras de las películas utilizadas (17 ± 2 mg) se secaron durante 12 h a 40 °C y se colocaron en un desecador durante 48 h para mantener una humedad menor al 5 %. Las películas se colocaron dentro de una cámara de muestra DVS (Dynamic Vapor Sorption (DVS-2000, Surface Measurement Systems, London, UK). Las muestras fueron secadas a una a_w de 0.01 durante 24 h para asegurar peso seco antes del inicio del análisis. Las actividades de agua seleccionadas para la construcción de las isotermas fueron de: 10.6, 21.1, 31.7, 42.2, 52.8, 63.3, 73.9, 84.4 y 95.0 a una temperatura de prueba de 25 °C. Para cada humedad seleccionada la cámara de muestra se mantuvo a una humedad relativa específica hasta alcanzar el equilibrio de cada muestra. A continuación se uso el cambio de peso de cada muestra, a las humedades relativas seleccionadas para calcular el contenido de humedad en cada condición de prueba y construir las isotermas de adsorción.

7.5.6. Microscopía electrónica de barrido (SEM) de las películas preformadas de quitosano

Las características morfológicas y de homogeneidad de las películas fueron determinadas mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM). Para la incorporación de los microorganismos embebidos se utilizó el mismo procedimiento

citado anteriormente. Por otra parte, para incorporar los microorganismos a las superficies de las películas se procedió a verter 1 ml de solución de lactobacilos (1×10^9 UFC/mL) suspendidos en una solución de Tween al 0.01 % p/v en cajas de plástico rígido de 88 mm, las cuales se dejaron secar por 24 h a temperatura ambiente y posteriormente se agregaron 7 g de solución de quitosano (20 g/L) y se secaron durante 72 h a 25 °C. Se cortaron piezas del recubrimiento de 1 cm^2 , las cuales fueron llevadas a humedad 0 y se congelaron con nitrógeno líquido para fracturarlas (observación transversal) y fueron recubiertas con un baño de argón antes de su observación en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900LV, Japan).

7.6. Modificación del quitosano

7.6.1. Adición de prebióticos

Para establecer el efecto de varias fuentes de carbono sobre la acidificación y viabilidad de la BAL, se inocularon matraces Erlenmeyer con medio mínimo nutritivo y con una fuente de carbono a una concentración de 1 % p/v. Las fuentes de carbono probadas fueron: fructosa, glucosa, manosa, rafinosa, galactosa, sacarosa, maltosa, manitol, sorbitol. Los matraces se incubaron a 30 °C durante 48 h, después de lo cual, se procedió a determinar la viabilidad por dilución seriada. Posteriormente, se determinó el pH de la solución y se titularon 3 alícuotas de 10 mL con NaOH 0.01 N.

7.6.2. Modificación química del quitosano

Se realizó una modificación química para cambiar las propiedades de permeabilidad de las películas de quitosano y disminuir la pérdida de agua de los frutos a probar. Esto se realizó en disolución de quitosano a concentraciones de 20, 15 y 10 g/L con soluciones de glutaraldehído (J T Baker) para ajustar las soluciones de quitosano a concentraciones de 0.2 % v/v.

7.6.3. Viabilidad de *Lb. plantarum* en películas de quitosano modificado

La determinación de la viabilidad de las bacterias lácticas en películas preformadas con quitosano modificado se evaluó aplicando 1 mL de *Lb. plantarum* ($2.89 \times 10^9 \pm 1.81 \times 10^8$ UFC/mL) sobre la superficie de las películas previamente

formadas, sobre cajas plásticas de 88 mm de diámetro. Después de dejarlas secar durante 1.5 h a 25 °C en una campana de flujo laminar, se recortaron cuadros de 4 cm² y se determinó inmediatamente la viabilidad (viabilidad inicial), por otra parte las películas se estabilizaron en un desecador con una solución saturada de NaCl a 92 % de HR. Para analizar la viabilidad de los microorganismos se tomaron tres muestras cada 5 días y se colocaron en matraces erlenmeyer con 40 mL con soluciones isotónicas de NaCl y se agitaron durante 1 minuto y se tomaron alícuotas de 0.1 mL para sembrarlas en placa por superficie. Los tratamientos resultantes fueron quitosano (Q), glutaraldehído (GA), quitosano + glutaraldehído (QGA); quitosano + fructosa (QF); quitosano + fructosa + glutaraldehído (QGAF).

7.7. Ensayos con frutos de rambután

7.7.1. Material Biológico

Se seleccionaron frutos de rambután (*Nephelium lappaceum*) en estado maduro, libres de daños mecánicos por golpes o por infestación de microorganismos e insectos. Para los análisis en frutos se planteó un diseño experimental aleatorizado, con un arreglo factorial 4 x 2, donde los niveles del primer factor fueron los siguientes tratamientos:

- a) Control (C): Frutos sin tratar.
- b) Quitosano (Q): Aplicación de Quitosano a 20 g/L disuelto en ácido acético 0.1 M, ajustado a pH 5 con NaOH 0.1 N.
- c) *Lb. plantarum* (BAL): Inoculación con bacterias lácticas por inmersión en una suspensión celular a una concentración de 1×10^9 UFC/mL durante 15 segundos.
- d) Quitosano con *Lb. plantarum* (Q/BAL): Inoculación con bacterias lácticas por inmersión en una suspensión celular a una concentración de 1×10^9 UFC/mL durante 15 s, seguido por la aplicación de quitosano a 20 g/L disuelto en ácido acético 0.1 M, ajustado a pH 5 con NaOH 0.1 N.

Los niveles del segundo factor fueron las temperaturas de almacenamiento: 10 y 25 °C. La unidad experimental fue de un fruto con 5 repeticiones.

7.7.2. Características de calidad

7.7.2.1. Firmeza de la pulpa

Los cambios en la firmeza de la pulpa se determinaron en los cinco frutos de rambután utilizando un penetrómetro manual (Fruit Pressure Tester FT-327, Italia). Para esto se eliminaron tres porciones de piel de cada fruto y se realizaron mediciones en cada una. Los resultados medidos en kgf se transformaron a newtons (N).

7.7.2.2. Determinación de los sólidos solubles totales (SST)

Esta determinación se realizó mediante un refractómetro (MILTON Mod. LR45227, Riviera Beach, FL, USA) a 20 °C. Para ello, se maceró completamente la pulpa de cada fruto de rambután en un mortero y se filtró a través de una gasa de algodón; del jugo obtenido se tomó una gota y se depositó en el refractómetro realizando la lectura correspondiente. Las determinaciones se realizaron por quintuplicado.

7.7.2.3. Cambios de color del fruto

Para el análisis de los cambios de color de la cáscara de los frutos de rambután se utilizó un colorímetro Minolta (Croma meter CR-200, Japón) y se determinaron los parámetros cromáticos CIE-LAB: L*, a* y b*. Las mediciones fueron realizadas en tres posiciones centradas equidistantes de la periferia del fruto.

7.7.2.4. Pérdida de peso

Se midieron los cambios de peso de tres unidades experimentales por tratamiento durante todo el período de almacenamiento, calculándose la pérdida de peso en porcentaje de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% PP = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (4)$$

en donde: P_i = peso inicial
 P_f = peso final

7.7.3. Determinación de la viabilidad de los microorganismos en frutos de rambután

Para la determinación de la viabilidad de los microorganismos en los frutos de rambután, cada fruto fue lavado con 100 mL de solución salina 0.09 % (p/v) durante 1 min. Posteriormente, se tomaron alícuotas y se hicieron diluciones seriadas en placas de agar MRS incubando a 30 °C durante 24 h.

7.7.4. Determinación de ácido láctico

Para la determinación de la concentración de ácido láctico existente en la superficies de los frutos se procedió a lavar por inmersión cuatro frutos de rambután con 100 mL de agua desionizada a 25 °C durante 2 h. El extracto acuoso se filtró a través de papel filtro Whatman No. 40 y se liofilizó para concentrar el extracto. Posteriormente, las muestras fueron filtradas a través de una membrana de 0.45 µm para ser analizadas en un equipo YSI 2700 Select, Biochemistry analyzer, 1725 Brannum Lane (EUA), equipado con una membrana con la enzima inmovilizada L-lactato oxidasa (YSI Membrane 2329). Las concentraciones fueron calculadas a partir de un estándar de ácido láctico con una concentración de 0.45 g/L. La medición de ácido láctico se basa en dos reacciones: la primera en una oxidación enzimática de lactato a piruvato con la producción de peróxido de hidrógeno; en la segunda este último es hidrólizado por medio de un electrodo de platino a O_2 , $2 H^+$ y $2 e^-$ que producen una corriente eléctrica linealmente proporcional a la concentración de peróxido de hidrógeno y por lo tanto a la concentración del ácido láctico a determinar.

7.7.5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del pericarpio de rambután

Las características morfológicas de los frutos de rambután fueron determinadas mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM). Para esto se procedió a cortar una muestra de la cáscara de los frutos y se colocó en glutaraldehído (5 % v/v). Después las muestras fueron lavadas con buffer de fosfatos 0.1 M cada 30 min durante 10 h, y se deshidrataron con gradientes de etanol al 30, 40, 50, 70, 80, 90 % y alcohol etílico absoluto durante tres periodos de 20 min en cada solución. Una vez deshidratadas con etanol, las muestras se deshidrataron a punto crítico y después fueron recubiertas

con un baño de carbón y oro antes de su observación en un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900LV, Japón).

7.7.6. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del ensayo de rambután se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey – Kramer utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) para evaluar los efectos significativos ($\alpha < 0.05$).

7.8. Ensayos con frutos de litchi

7.8.1. Material Biológico

Se seleccionaron frutos de litchi (*Litchi chinensis son cv. Brewster*) en estado maduro, libres de daños mecánicos por golpes o por infestación de microorganismos e insectos. Se utilizó un diseño en bloques completos y aleatorizados donde las variables fueron los cinco tratamientos aplicados:

- a) Control (C): Frutos sin tratar.
- b) Quitosano/GA (Q/GA): Aplicación de quitosano modificado con GA a 10 g/L disuelto en ácido acético 0.1 M ajustado a pH 5 con NaOH 0.1 N.
- c) *Lb. plantarum* (BAL): Inoculación con bacterias lácticas a una concentración de 1×10^9 UFC/mL aplicadas por aspersión durante 90 segundos sobre la superficie de los frutos. Posteriormente, los frutos se dejaron secar durante 1 h para su almacenamiento.
- d) Quitosano/GA + *Lb. plantarum* (Q/GA/BAL): Inoculación con bacterias lácticas a una concentración de 1×10^9 UFC/mL aplicadas por aspersión durante 90 segundos sobre la superficie de los frutos. Después de 1 h de secado, se aplicó quitosano modificado con GA a 10 g/L ajustado a pH 5.

Los bloques se definieron con el factor tiempo en 0, 7, 14 y 21 días. Las unidades experimentales (UE) fueron envases tipo clamshell de 0.5 kg conteniendo aproximadamente 20 frutos y cada tratamiento tuvo tres repeticiones.

7.8.2. Características químicas y de calidad

7.8.2.1. Cambios de color del fruto

Para el análisis de los cambios de color de la cáscara de los frutos de litchi se utilizó un colorímetro Hunter-Lab Color Flex con el cual se determinaron los parámetros cromáticos CIE: L*, C* y h. La medición de estos parámetros se realizó en 15 frutos de cada unidad experimental y en las zonas del pericarpio intactas y libres de oscurecimiento.

7.8.2.2. Índice de daño

Se evaluó visualmente inmediatamente después del almacenamiento, para lo que se empleó la escala hedónica de seis grados, clasificándose de acuerdo con ella el oscurecimiento de toda la superficie del fruto de litchi. Para procesar los resultados, los datos se transformaron a una escala numérica (ausencia = 0, 1-10 % = 1; 11-20 % = 2; 21-30 % = 3; 31-40 % = 4; 41-50 % = 5 y ≥ 51 % = 6 y se aplicó la siguiente fórmula:

$$\sum_{i=1}^{i=n} = (1 X n_1) + (2 X n_2) + (3 X n_3) + (4 X n_4) + (5 X n_5) + (6 X n_6) / n \quad (5)$$

en donde n se refiere al número total de frutos estudiados:

n_1 = número de frutos en el grado 1

n_2 = número de frutos en el grado 2

n_3 = número de frutos en el grado 3

n_4 = número de frutos en el grado 4

n_5 = número de frutos en el grado 5

n_6 = número de frutos en el grado 6

7.8.2.3. Acidez Titulable (AT)

Se cuantificó el porcentaje de ácido cítrico presente en el jugo del litchi mediante una titulación volumétrica ácido-base (AOAC, 2000). Se tomaron 5 mL de cada UE y se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.1 N. La acidez titulable fue calculada como % de ácido málico mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Ácido málico} = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times meq_{(\text{Ácido málico})}}{Vol \text{ Muestra}} \times 100 \quad (6)$$

Donde: V = Volumen

N = Normalidad

meq = miliequivalente de ácido málico (0.06705)

7.8.2.4. Determinación de los sólidos solubles totales (SST)

Esta determinación se realizó mediante un refractómetro (MILTON Mod. LR45227 Riviera Beach, FL, USA) a 20 °C. Para ello, se maceró completamente la pulpa de cada fruto en un mortero y se filtró a través de una gasa de algodón; del jugo obtenido se tomó una gota y se depositó en el refractómetro realizando la lectura correspondiente. Las determinaciones se realizaron por quintuplicado.

7.8.2.5. Extracción de fenoles y antocianinas

Para esta extracción se maceraron los pericarpios de los frutos de litchi con nitrógeno líquido. Posteriormente, se pesaron 3 g de pericarpio y se extrajeron dos veces con metanol:ácido clorhídrico 1 N en una proporción 85:15 v/v. Los extractos se centrifugaron a 12 100 g durante 15 min, a 5 °C. posteriormente se dejaron secar a 25 °C y se disolvieron en la mezcla metanol:ácido clorhídrico 1 N hasta un volumen de 6 mL.

7.8.2.6. Determinación de antocianinas totales

Esta determinación se realizó con un método espectrofotométrico de acuerdo a lo reportado por Zheng y Tian (2006). Del extracto metanólico de los tratamientos, se tomó una alícuota (6 mL) y se diluyó con metanol:ácido clorhídrico 1 N (85:15 v/v); posteriormente, se leyeron en un espectrofotómetro a tres diferentes longitudes de onda (530, 620 y 650 nm) y se utilizó la siguiente fórmula para la obtención de la absorbancia (A):

$$A = (A_{530} - A_{620}) - 0.1 (A_{650} - A_{620}) \quad (7)$$

7.8.2.7. Determinación de antocianinas

La determinación de antocianinas se realizó mediante HPLC de acuerdo a lo reportado por Hosseinian *et al.*, (2008) para lo cual se tomó una alícuota del extracto (10 μ l) y se inyectó en un HPLC Hewlett Packard Series 110 acoplado a una bomba cuaternaria HP serie 1050 y equipado con una columna X-terra RP 18 de 5 mm de diámetro y 4.6 x 150 mm de longitud. Se utilizó un gradiente de ácido fórmico (4.5 % v/v): metanol en los siguientes tiempos: 0' 90:10; 30' 75:25; 40' 55:45; 42' 10:90; 50' 90:10. Para la cuantificación se utilizó un estándar Fluka 36-428 de cianidina-3-rutinósido, la principal antocianina presente en el pericarpio de litchi (Lee y Wiker, 1991; Riviera-López *et al.*, 1999).

7.8.2.8. Determinación de fenoles

El contenido de fenoles totales fue estimado por un método espectrofotométrico y se expresó como equivalentes de catequina según lo reportado por Jaramillo-Flores *et al.*, (2003) y Thililertdecha *et al.*, (2008). Una alícuota (0.1 mL) previamente diluida del extracto metanólico fue transferida a un tubo de ensayo que contenía 7.9 mL de agua destilada. Luego, se adicionaron 0.1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 5 min, se añadieron 1.5 mL de una solución de Na₂CO₃ (200 g/L) y se dejó reaccionar durante 90 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se determinó la absorbancia a 760 nm y se comparó con una curva de calibración realizada con catequina.

7.8.3. Determinación de la viabilidad de los microorganismos en frutos de litchi

Para la determinación de la viabilidad de los microorganismos en los frutos de litchi, cinco frutos aleatorizados de cada UE fueron lavados con 200 mL de solución salina 0.09 % (p/v) durante 1 min. Posteriormente, se tomaron alícuotas y se hicieron diluciones seriadas en placas de agar MRS incubando a 30 °C durante 24 h.

7.8.4. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico del ensayo con litchi se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de medias (LSD) utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) para evaluar los efectos significativos ($\alpha < 0.05$).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Efecto del quitosano sobre bacterias lácticas

8.1.1. Efecto de distintos tipos de quitosano en las MIC de tres bacterias ácido lácticas

Se analizaron las concentraciones mínimas inhibitorias de dos quitosanos de pesos moleculares medio y bajo (580.8 y 171.4 kDa) con tres bacterias lácticas (*Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* y *Lb. spp*) (Tablas 1 y 2). Esto con el objetivo de analizar el tipo de quitosano a usar para la elaboración de las películas y la bacteria láctica que se inhibiera en menor grado por estos quitosanos (Tabla 2). Los resultados mostraron que el quitosano de 580.8 kDa fue el menos inhibitorio (2 g/L), mientras que el quitosano de 171.4 kDa, tuvo una MIC menor a 0.5 g/L para *Lb. plantarum* y *Lb. spp*. Cabe mencionar que *Lb. acidophilus* fue inhibido a todas las concentraciones probadas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por No *et al.*, (2002) quienes encontraron que un quitosano de peso molecular medio (470 kDa), fue menos inhibitorio que un quitosano de peso molecular bajo (224 kDa) para *Lb. plantarum*. El quitosano de peso molecular medio, tuvo MIC más grande que los valores reportados por No *et al.*, (2002) para quitosanos con pesos moleculares de 1671, 1106, 746, 470, 224 y 28 kDa. Wang *et al.*, (1992) reportaron que los valores de MIC para quitosanos pueden presentar diferencias debidas al método de preparación, las características del quitosano y el pH del medio.

En nuestro caso se observó que las preparaciones de quitosano de peso molecular medio fueron más viscosas y no estaban completamente disueltas al agregarlas al medio de cultivo, mientras que las preparaciones de quitosano de 171.4 kDa presentaron una mejor dispersión en los medios preparados. Otro factor que pudo influir fue el grado de acetilación, que si bien no es tan diferente, sí pudo afectar el número de grupos amino libres y protonados (-NH₃) que se propone interaccionan con los grupos fosfato de los fosfolípidos de la membrana celular de las bacterias lácticas, con la consecuente desnaturalización, ruptura y muerte celular (Du *et al.*, 2004).

Tabla 1. Crecimiento de lactobacilos cultivados en agar MRS adicionado con quitosano

Mw Quitosano (kDa)	Concentración (g/L)	<i>Lb. plantarum</i> (UFC/mL)	<i>Lb. spp.</i> (UFC/mL)
Control	0	$16 \times 10^9 \pm 5.5 \times 10^8$	$7.5 \times 10^9 \pm 7.5 \times 10^8$
580.8	1	$6.3 \times 10^9 \pm 4.9 \times 10^8$	$7.4 \times 10^9 \pm 4.5 \times 10^8$
	2	$2.9 \times 10^9 \pm 9.5 \times 10^8$	$6.1 \times 10^9 \pm 4.5 \times 10^8$
171.4	0.5	0	0

Tabla 2. Concentraciones mínimas inhibitorias determinadas con los diferentes quitosanos.

Quitosano		Microorganismo	
Mw (kDa)	DA (%)	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. spp.</i>
580.8	21	3 g/L	3 g/L
171.4	18	< 0.5 g/L	< 0.5 g/L

8.1.2. Efecto del método de incorporación de la BAL sobre la viabilidad

Cuando se incluyó el microorganismo en la solución de preparación del recubrimiento (embebido) para mejorar las características biofuncionales del quitosano no se observó crecimiento microbiano (Tabla 3), efecto que probablemente se debió a las condiciones de baja a_w y desecación durante la formación de los soportes (48 h, 30 °C), que podrían haber disminuido drásticamente la viabilidad. Cabe mencionar que en estos análisis se pudo observar que a la concentración de 2 g/L del quitosano de 580.8 kDa, *Lb. plantarum* tuvo la capacidad de sobrevivir y recuperarse después de la formación del recubrimiento y la resuspensión en medio MRS, mientras que los otros microorganismos probados no presentaron viabilidad. Esto pudo deberse a que la concentración del quitosano fue tan baja que permitió la sobrevivencia de algunas células, con lo que la población bacteriana pudo recuperarse. Por otra parte, cabe mencionar que la MIC de este quitosano fue la más alta (3 g/L), por lo que el resultado de viabilidad es coherente con la MIC observada.

Respecto al segundo método de incorporación de microorganismos, los cuáles fueron depositados sobre las superficies de películas de quitosano (superficiales) preparadas con una concentración de 20 g/L, elegida porque se ha reportado que facilita la formación de películas con mejores características para disminuir la pérdida de agua y evitar el oscurecimiento de litchi (Jiang y Li, 2000; Jiang, *et al.*, 2005), se observó que los lactobacilos sobrevivieron a esta concentración alta (Tabla 3). Las cuentas microbianas observadas con estas concentraciones de quitosano se atribuyeron a la falta de interacciones físicas y químicas del biopolímero con todas las células bacterianas. Esto debido a que las condiciones de fijación de las bacterias a los soportes fueron a pH neutro de 7.0 y a que el quitosano tiene mayor actividad antimicrobiana en medios ácidos por la protonación del grupo amino (Shahidi, *et al.*, 1999). Por otra parte, las bacterias lácticas pudieron encontrarse ligadas en una pequeña porción de su pared celular y permanecer viables en un estado estacionario en la superficie del quitosano, observándose crecimiento celular a partir de dichas células ligadas al soporte, de acuerdo a lo reportado por Cachón *et al.*, (1995) con *Lb. lactis* en soportes de alginato.

Tabla 3. Viabilidad de lactobacilos en películas de quitosano en medio MRS después de 24h a 30 °C.

Quitosano (kDa)	Aplicación	Concentración (g/L)	Viabilidad(*)		
			<i>Lb. spp.</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. acidophilus</i>
580.8	Superficial	2	+	++	-
		20	++	++	-
	Embebido	2	-	+	-
		20	-	-	-
171.4	Superficial	20	+	+	-
	Embebido	20	-	-	-

+ Indica el grado de crecimiento medido por el grado de turbidez del medio de cultivo líquido.

Las tasas de crecimiento de los microorganismos incorporados en la superficie de los soportes recubiertos con quitosano (20 g/L) se determinaron en medio MRS a 30 °C, durante 24 h (Tabla 4). *Lb. plantarum* y *Lb. spp.* disminuyeron su crecimiento en más de 4 veces con respecto a los controles, lo anterior pudo deberse a que el quitosano ejerció su acción bactericida en una parte importante de las BAL. Es importante notar que *Lb. plantarum* tuvo tasas de crecimiento mayores que las de *Lb. spp.*, además de que sobrevivió cuando fue embebido en los recubrimientos de quitosano a concentraciones de 2 g/L.

El conjunto de características mostradas por *Lb. plantarum* durante estos análisis, tales como, la sobrevivencia mayor en quitosanos de acuerdo a las MIC, las tasas de crecimiento observadas, y el hecho de que haya sobrevivido cuando se le aplicó embebido en el quitosano, hicieron que se seleccionara a esta BAL como el microorganismo a usar en los siguientes análisis.

Tabla 4. Tasas de crecimiento de bacterias lácticas sobre soportes de quitosano en concentraciones de 20 g/L.

Microorganismo	Tratamiento	Tasas de Crecimiento μ (h^{-1})	R ²
<i>Lb. plantarum</i>	Q	0.23 \pm 0.03	0.92
	Medio MRS (C)	1.12 \pm 0.05	0.98
<i>Lb. spp.</i>	Q	0.21 \pm .03	0.87
	Medio MRS (C)	0.96 \pm 0.02	0.99

8.1.3. Evaluación de la viabilidad de *Lb. plantarum* sobre películas preformadas de quitosano

Debido a las dificultades presentadas con la solubilidad del quitosano de peso molecular medio y considerando los problemas que esto ocasionaría durante la aplicación a frutos, se decidió continuar los experimentos con el quitosano de 171.4 kDa. Para ello, se evaluó la viabilidad de *Lb. plantarum* inoculado sobre películas de quitosano de dicho peso molecular (Figura 3). Se observó una disminución lineal de la viabilidad de los microorganismos en películas preformadas de quitosano estabilizadas a 75 % de HR y 25 °C. Lo anterior contrasta con lo reportado por Lee, *et al.*, (2004) quienes encontraron que la viabilidad de *Lb. bulgaricus* mejora con respecto al cultivo celular líquido cuando las bacterias son microencapsuladas en soportes de alginato con recubrimientos de quitosano, permaneciendo viables hasta por 28 días a 22 °C en un medio lácteo. Esto puede ser atribuido a que en los experimentos realizados en este trabajo las condiciones fueron aún más exigentes para los microorganismos usados, ya que solo se encontraban sobre la superficie de películas preformadas de quitosano, que es un agente con capacidad antimicrobiana.

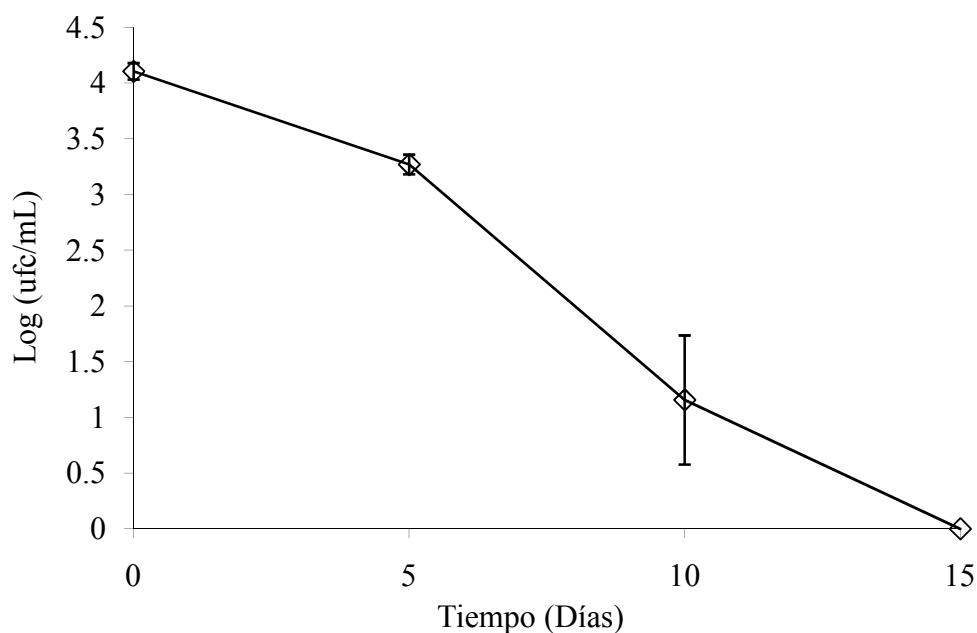


Figura 3. Viabilidad de *Lb. plantarum* inoculado en películas de quitosano (171.4 kDa) almacenadas a 25 °C y 75 % HR.

8.2. Caracterización fisicoquímica de los recubrimientos de quitosano

Las películas de quitosano tuvieron una apariencia homogénea, translúcida, flexibles, fáciles de desprender de la superficie sobre la que se formaron e higroscópicas a humedades relativas altas (85 – 95 %).

8.2.1. Permeabilidad al vapor de agua

Las características fisicoquímicas y mecánicas de las películas preparadas con quitosano de 171.4 kDa a una concentración de 20 g/L mostraron que el material estructural tuvo permeabilidades de 2.1 ± 0.2 g·mm/kPa·d·m², que son valores más bajos de permeabilidad al vapor de agua que los de otros hidrocoloides como los aislados de proteínas de soya, derivados de almidón y zeínas (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2005). Esto es importante debido a que los principales problemas relacionados con la pérdida de la calidad del litchi y rambutan están relacionados con la pérdida de

agua (Nisperos-Carriedo, 1994). Por otra parte, se observó una disminución del 50 % en el valor de permeabilidad cuando se embebieron las bacterias lácticas en los recubrimientos, esto pudo deberse a que los microorganismos no funcionan como barreras permeables al vapor de agua y por tanto, al estar embebidos se redujo la superficie total de la película de quitosano expuesta a la transmisión del vapor de agua con respecto al control (Tabla 5).

Los valores obtenidos para la resistencia a la tensión disminuyeron en las películas con *Lb. plantarum*, efecto debido a que las películas no presentaban la misma continuidad y densidad que las películas control (Figuras 5b y d), debilitando en consecuencia la fuerza cohesiva de la matriz estructural.

Tabla 5. Características fisicoquímicas y mecánicas de las películas de quitosano de 171.4 kDa (20 g/L) estabilizadas a 25 °C y gradientes de humedad relativa de 0-75 %.

Tipo de recubrimiento	Espesor medio (mm)	Permeabilidad (g·mm/kPa·d·m ²)	T.S. (MPa)
Q	0.021 ± 0.002 ^a	2.15 ± 0.20 ^a	63.44 ± 4.37 ^a
QBAL embebido	0.023 ± 0.002 ^a	1.10 ± 0.09 ^b	43.11 ± 7.62 ^b

*Las letras de los superíndices representan diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) con una análisis múltiple de medias de Tukey.

8.2.3. Isotermas de adsorción

Las curvas de adsorción de los recubrimientos analizados presentaron un comportamiento típico de los polímeros hidrofílicos, las isotermas de adsorción presentaron una forma sigmoideal (Figura 4). La adsorción se incrementó en actividades de agua mayores a 0.74, mientras que a $a_w < 0.63$ se mantuvo baja. Este comportamiento indica que a humedades relativas altas se podría cambiar significativamente la estabilidad estructural de la película disminuyendo las propiedades de barrera. Por otra parte, es importante señalar que la incorporación de los

microorganismos, ya sea en la superficie o embebidos en la película, no cambió el comportamiento de adsorción de agua de las películas de quitosano más BAL.

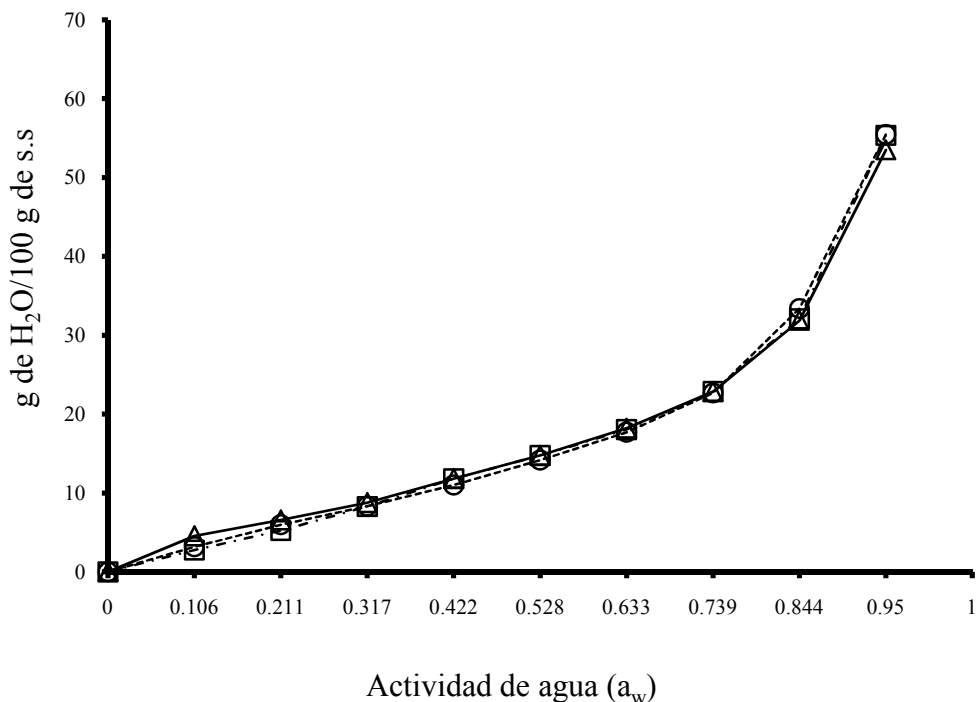


Figura 4. Isotermas de adsorción de películas de quitosano de 171.4 kDa (20 g/L). Q (□), QBAL superficial (Δ), QBAL embebido (○).

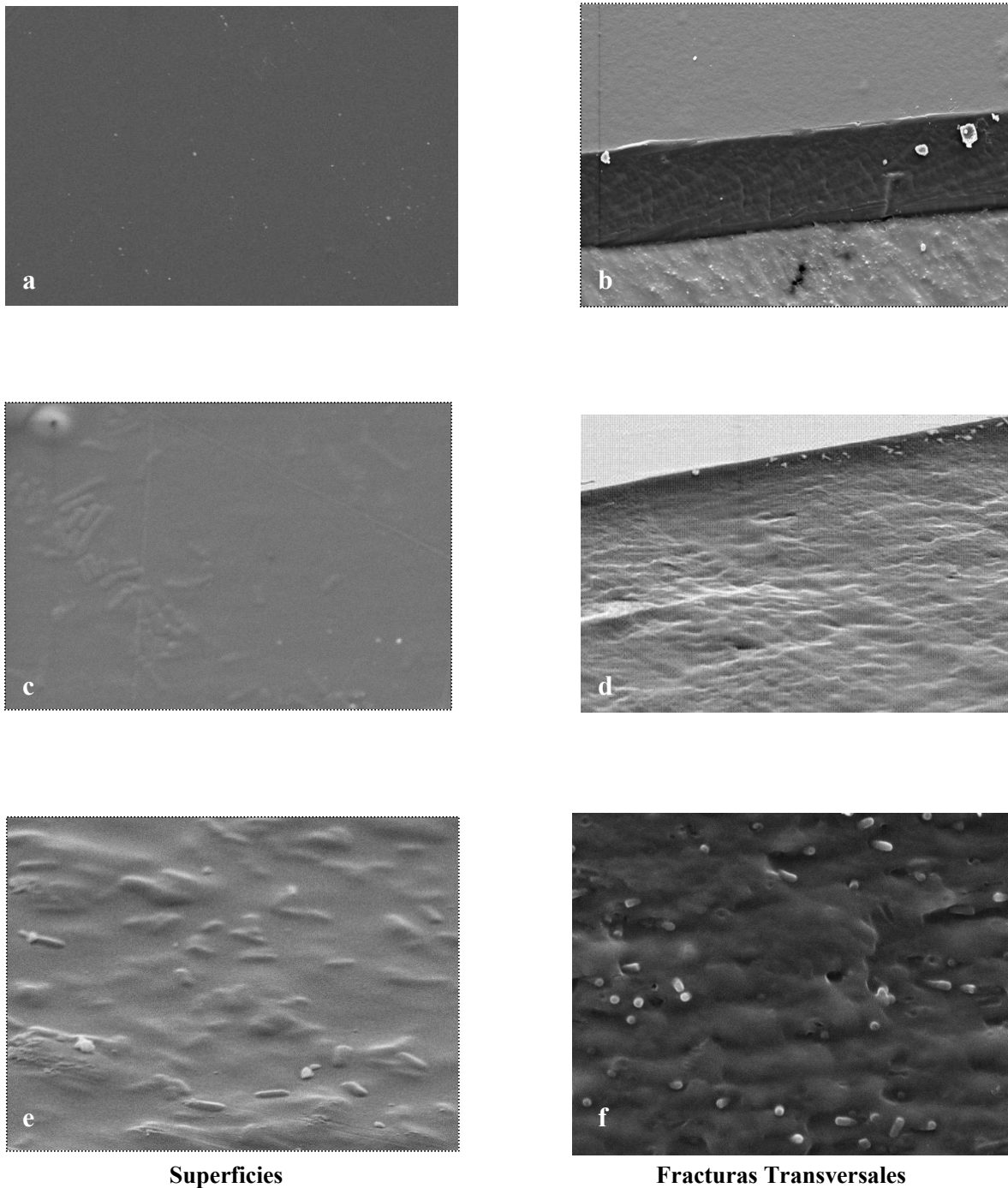
8.2.4. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Cuando se realizaron microscopías electrónicas a las películas de quitosano para analizar la micro morfología de las películas, se observó una superficie homogénea y continua, sin huecos, poros o microcanales que pudieran contribuir al movimiento y difusión de las moléculas de gases (Figura 5a y b). El análisis SEM de películas de quitosano con las bacterias lácticas superficiales mostró distribuciones irregulares de los microorganismos a través de la superficie de la película, sin que estas irregularidades contribuyeran a disminuir la homogeneidad o provocaran huecos o poros que pudieran afectar su microestructura (Fig. 5c y d). En la figura 5d puede observarse que los

microorganismos no quedaron atrapados dentro de la matriz estructural de las películas, lo que pudiera disminuir la viabilidad del microorganismo.

Por otra parte, en el análisis SEM de los microorganismos embebidos en la matriz de quitosano (Figuras 5e y f), se observó una distribución homogénea de éstos sobre la superficie de las películas sin agregados celulares. Esta metodología de incorporación de las bacterias, pudo favorecer las interacciones entre la membrana plasmática y los grupos amino del quitosano, lo que pudo haber provocado la muerte celular, como se observó en los análisis de viabilidad.

Esto es importante debido a que previamente se realizaron pruebas para analizar liberación mediante viabilidad de los microorganismos con los tratamientos en soluciones de buffer de fosfatos 0.02 M ajustadas a pH 5 y pH 7 durante 48 h, los cuales resultaron negativos (datos no mostrados). Es probable que la concentración de los microorganismos que existía en las películas de quitosano fuera demasiado baja para los límites de detección de dicha técnica analítica. Lo anterior sugiere que la liberación de los microorganismos no se lleva a cabo por difusión a través de la película, ya que existen efectos de interacción de las cargas positivas del quitosano con las cargas negativas de las membranas celulares (Shahidi, *et al.*, 1999) que pudieran estar impidiendo la liberación del microorganismo de la matriz.



Superficies

Fracturas Transversales

Figura 5. Micrografías electrónicas de películas de quitosanos de 171.4 kDa preparadas a 20 g/L (3000X): a) Superficie y b) Fractura transversal; con aplicación superficial de *Lb. plantarum* (7000X): c) Superficie y d) Fractura transversal; embebiendo a *Lb. plantarum* en las películas (7000X): e) Superficie y f) Fractura transversal (3000 X).

8.3. Ensayo de los recubrimientos en frutos de rambután (*Nephelium lappaceum*)

8.3.1. Crecimiento de bacterias gram positivas en el pericarpio de rambután

Los resultados encontrados al aplicar microorganismos de *Lb. plantarum* en la superficie de frutos de rambután solos o sobre recubrimientos de quitosano, muestran que en la superficie se encontraron una gran cantidad de microorganismos gram positivos, que fueron capaces de sobrevivir en los frutos almacenados hasta los 15 días a 10 °C y hasta los 10 días a 25 °C (Figuras 6 y 7). La aplicación combinada de *Lb. plantarum* con quitosano disminuyó el crecimiento de las BAL con respecto a la aplicación de *Lb. plantarum* solo, aunque no se encontró una disminución del crecimiento de BAL con respecto al tiempo de almacenamiento. Es importante mencionar que los análisis de viabilidad de *Lb. plantarum* inoculado en película mostraron que este microorganismo no fue capaz de sobrevivir solo en el quitosano, pero si sobrevivió en el fruto de rambután, lo que podría indicar que probablemente las bacterias quedaron atrapadas en la interfase recubrimiento-superficie del fruto, sin que hayan quedado embebidas en su totalidad en la película durante la aplicación del recubrimiento.

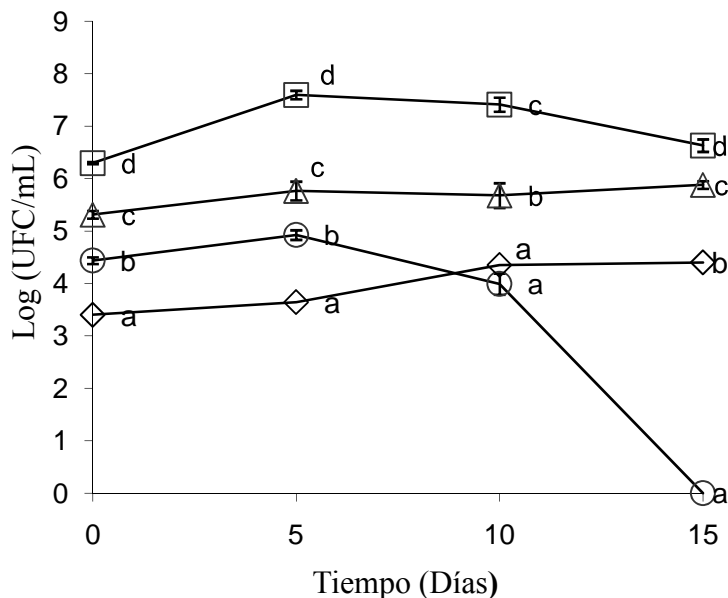


Figura 6. Crecimiento de bacterias gram positivas (Log UFC/mL) en frutos de rambután mediante siembra en placa por extensión en agar MRS a 10 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

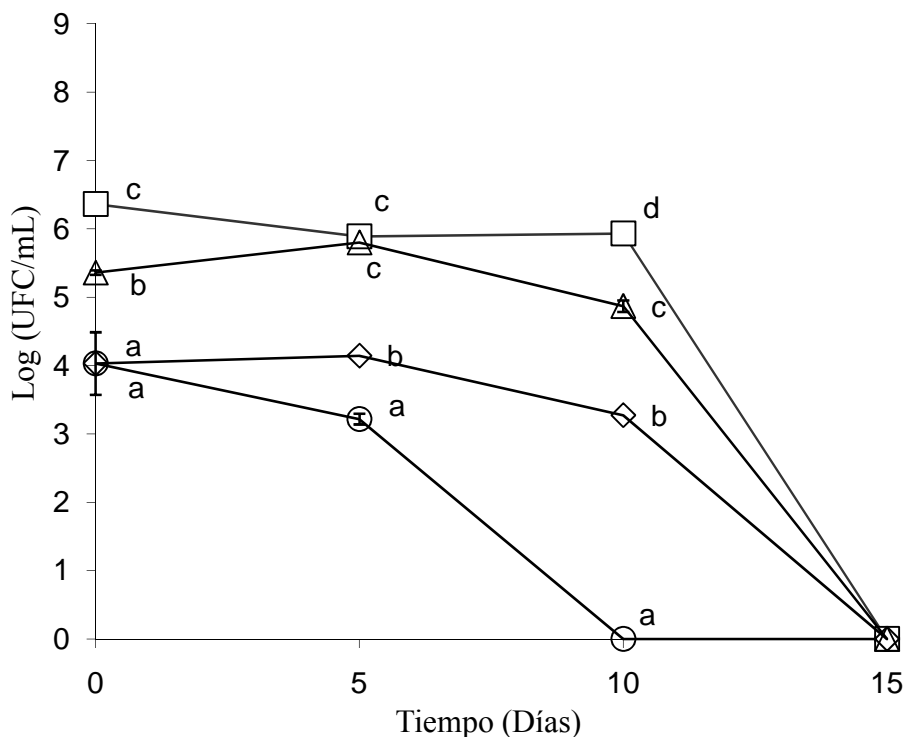


Figura 7. Crecimiento de bacterias lácticas (Log UFC/mL) en frutos de rambután mediante siembra en placa por extensión en agar MRS a 25 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

Este efecto podría ser comparado con el que se ha reportado para diferentes lactobacilos en soportes de alginato recubiertos con quitosano (Lee *et al.*, 2004; Wunwisa, *et al.*, 2004). Existen reportes que prueban que la liberación y sobrevivencia celular en soportes, se lleva a cabo por mecanismos de crecimiento celular en las cavidades de estos y es esta fuerza celular ejercida sobre las cavidades lo que disminuye la resistencia estructural de los soportes, facilitando la liberación y sobrevivencia (Cachón *et al.*, 1995; Audet *et al.*, 1998). A pesar de que dichas cavidades no fueron observadas en las micrografías electrónicas para los microorganismos embebidos en las películas (figura 5 f), las bacterias pudieron quedar atrapadas entre el fruto y el recubrimiento, permitiendo su viabilidad como se observó en estos análisis y que pudiera explicar el aumento de las UFC en el caso del tratamiento QBAL almacenado a 10 °C.

Los análisis de tinción diferencial de Gram, mostraron que el quitosano y la temperatura de almacenamiento de 25 °C promovieron el crecimiento de levaduras sobre la superficie del rambután, principalmente a los 10 días de almacenamiento y a los 15 días de almacenamiento a 10 °C (Tablas 6 y 7). También se puede observar que el número de UFC bacterianas en los tratamientos BAL y QBAL fue significativamente mayor que las observadas en los tratamientos C y Q; por lo que las bacterias presentes en los análisis de viabilidad podrían pertenecer a las inoculadas sobre los frutos de rambután.

8.3.2. Efecto de recubrimientos con quitosano y bacterias lácticas en la calidad poscosecha de rambután

8.3.2.1. Efecto de los tratamientos en los sólidos solubles totales y pH de los frutos

Los análisis de concentración de SST y pH no mostraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) entre tratamientos durante los primeros diez días de almacenamiento en ambas condiciones de temperatura (10 y 25 °C) con respecto a los análisis iniciales (Tablas 8 y 9). La pulpa de los frutos de rambután presentan valores altos de SST que pueden variar entre 17 y 21 %, además de bajos valores de acidez de 0.36 % (Kader, 1993; Landrigan *et al.*, 1996). En contraste, los sólidos solubles totales de los frutos almacenados a 25 °C disminuyeron rápidamente después de 10 días de almacenamiento, lo que posiblemente se puede atribuir al consumo de sustratos en respiración y a un rápido proceso de senescencia de los frutos, (Tabla 9). Por otra parte, a 25 °C, el pH de la pulpa disminuyó durante los 10 primeros diez días de almacenamiento solo en el control (3.91 ± 0.05) y permaneció sin cambio en los otros tratamientos. Los SST y el pH de los tratamientos con quitosano y *Lb. plantarum* no mostraron diferencias significativas ($\alpha < 0.05$) durante el almacenamiento a 10 °C. Lo anterior sugiere que, los tratamientos aplicados ayudaron a conservar las características poscosecha de los frutos (Tabla 8).

Tabla 6. Tinción diferencial Gram e identificación por morfología de aislados obtenidos¹ de la superficie de rambután almacenado a 10 °C.

Tratamiento	Tiempo							
	0		5		10		15	
	Bacilos	Levaduras	Bacilos	Levaduras	Bacilos	Levaduras	Bacilos	Levaduras
C	(++++)	(++)	(++++)	(++)	(+)	(++++)	ND	(++++)
Q ²	ND	(++)	ND	(++++)	(++)	(++)	ND	(++++)
BAL	(++++)	ND	(++++)	ND	(++++)	ND	(++++)	ND
QBAL ²	(++++)	ND	(++++)	ND	(++++)	ND	(++++)	ND

¹Los cultivos fueron realizados en agar MRS incubados a 30 °C durante 24 h. ² 20 g/L. ND: crecimiento no determinado.

Tabla 7. Tinción diferencial Gram e identificación por morfología de aislados obtenidos¹ de la superficie de rambután almacenado a 25 °C.

Tratamiento	Tiempo							
	0		5		10		15	
	Bacilos	Levaduras	Bacilos	Levaduras	Bacilos	Levaduras	Bacilos	Levaduras
C	(++++)	(++)	(++)	(++++)	ND	(++++)	ND	ND
Q ²	ND	(++)	ND	(++++)	ND	(++++)	ND	ND
BAL	(++++)	ND	(++++)	ND	(++)	(++)	ND	ND
QBAL ²	(++++)	ND	(++)	(++)	(++++)	ND	ND	ND

¹Los cultivos fueron realizados en agar MRS incubados a 30 °C durante 24 h. ² 20 g/L. ND: crecimiento no determinado.

Tabla 8. Sólidos solubles totales y pH en frutos de rambután almacenados a 10 °C.

Tratamiento	Sólidos Solubles Totales		pH	
	Tiempo		Tiempo	
	0	15	0	15
C	21.4 ± 0.65 ^a	20.9 ± 0.53 ^a	4.32 ± 0.08 ^a	4.274 ± 0.09 ^a
Q ¹	21.4 ± 0.65 ^a	21.2 ± 0.94 ^a	4.34 ± 0.05 ^a	4.42 ± 0.08 ^a
BAL	20.6 ± 0.61 ^a	21.1 ± 0.70 ^a	4.34 ± 0.05 ^a	4.374 ± 0.04 ^a
QBAL ¹	21.4 ± 0.88 ^a	20.8 ± 0.77 ^a	4.36 ± 0.04 ^a	4.31 ± 0.04 ^a

¹ 20 g/L. *Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

Tabla 9. Sólidos solubles totales y pH en frutos de rambután almacenados a 25 °C.

Tratamiento	Sólidos Solubles Totales		pH	
	Tiempo		Tiempo	
	0	10	0	10
C	21.5 ± 0.85 ^a	15.3 ± 0.46 ^a	4.36 ± 0.03 ^a	3.91 ± 0.05 ^a
Q ¹	20.9 ± 0.73 ^a	17.6 ± 0.57 ^b	4.34 ± 0.05 ^a	4.33 ± 0.05 ^b
BAL	21.6 ± 0.49 ^a	17.8 ± 0.82 ^b	4.28 ± 0.04 ^a	4.29 ± 0.09 ^b
QBAL ¹	20.9 ± 0.83 ^a	17.9 ± 0.46 ^b	4.33 ± 0.02 ^a	4.25 ± 0.07 ^b

¹ 20 g/L. *Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

8.3.2.2. Cambios de firmeza de la pulpa

Los análisis de textura mostraron que durante el almacenamiento a 10 °C se mantuvo la firmeza de la pulpa de rambután (Figura 8), mientras que a 25 °C disminuyó drásticamente, efecto que fue atribuido a la sobremaduración y senescencia (Figura 9). La firmeza de todos los tratamientos almacenados a 10 °C presentó un comportamiento similar durante los primeros 10 días. Posteriormente, sólo el tratamiento con quitosano mostró valores altos (19 N) con respecto a los otros tratamientos, lo que pudiera ser atribuido al efecto de este recubrimiento en la fisiología del fruto. De acuerdo a El Ghaouth *et al.*, (2000) los recubrimientos de quitosano afectan significativamente la respiración y la síntesis de etileno, conservando la firmeza por modificaciones de ambos procesos.

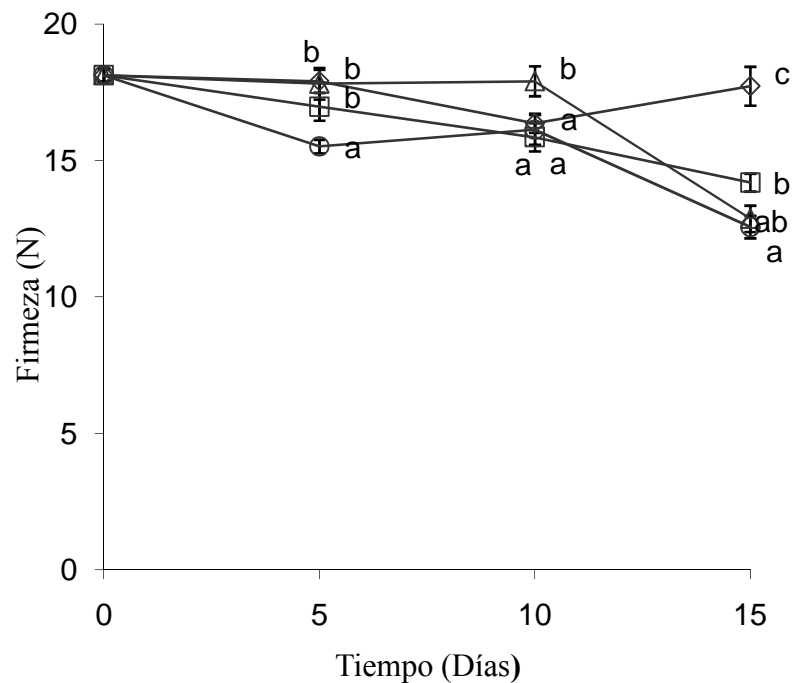


Figura 8. Cambios de firmeza en pulpa de rambután almacenado a 10 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

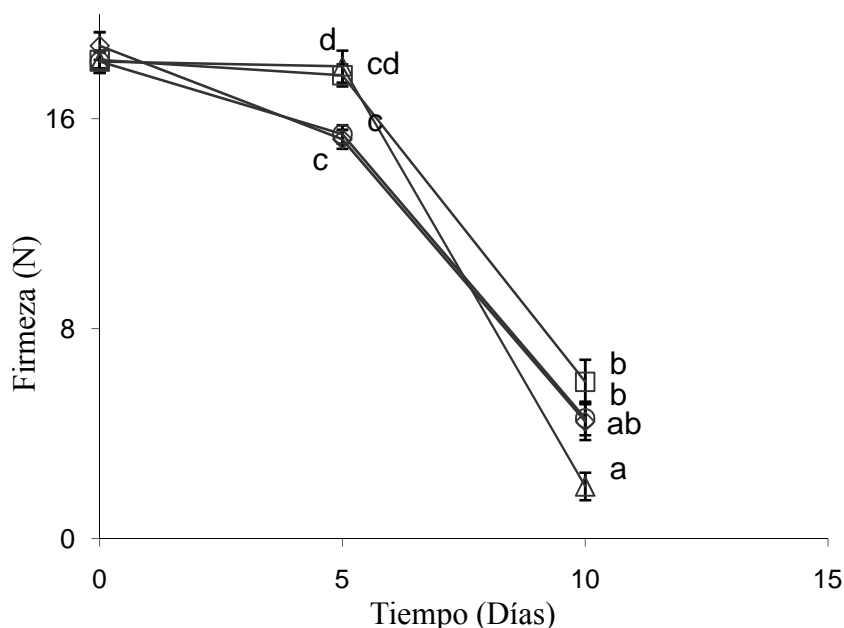


Figura 9. Cambios de firmeza en pulpa de rambután almacenado a 25 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

8.3.2.3. Pérdida de peso

La pérdida de peso de los frutos fue elevada debido a la baja humedad relativa de la cámara de almacenamiento en la que se mantuvieron los frutos (75 ± 2.5 %); sin embargo, bajo esas mismas condiciones los frutos control mostraron pérdidas mayores que los demás tratamientos (Figuras 10 y 11). Los tratamientos C y Q almacenados a 25 °C presentaron valores significativamente superiores de pérdida de peso, que los frutos de rambután tratados con *Lb. plantarum* o los tratados con la combinación Q/BAL (Figura 11). Asimismo, se observó que los frutos tratados con la BAL tuvieron los valores más bajos de pérdida de peso, efecto atribuido al desarrollo de los lactobacilos sobre el pericarpio y observado en los análisis de viabilidad. Este efecto pudiera estar relacionado con la probable secreción de exopolisacáridos por las bacterias, que se encontraban metabólicamente activas, a pesar de las condiciones desfavorables para su crecimiento y que pudo disminuir la permeabilidad del pericarpio, limitando la pérdida de humedad.

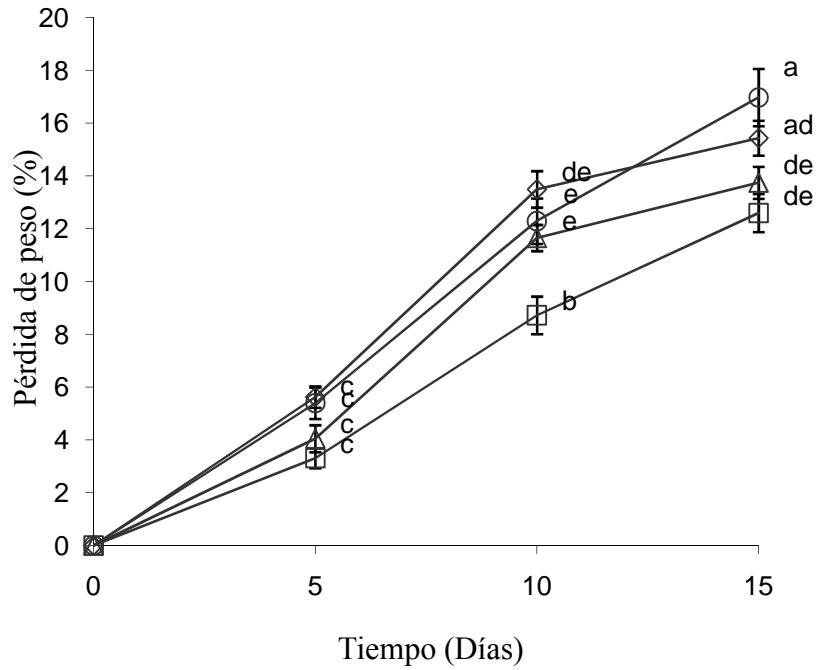


Figura 10. Pérdida de peso en rambután almacenado a 10 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey- ($\alpha < 0.05$).

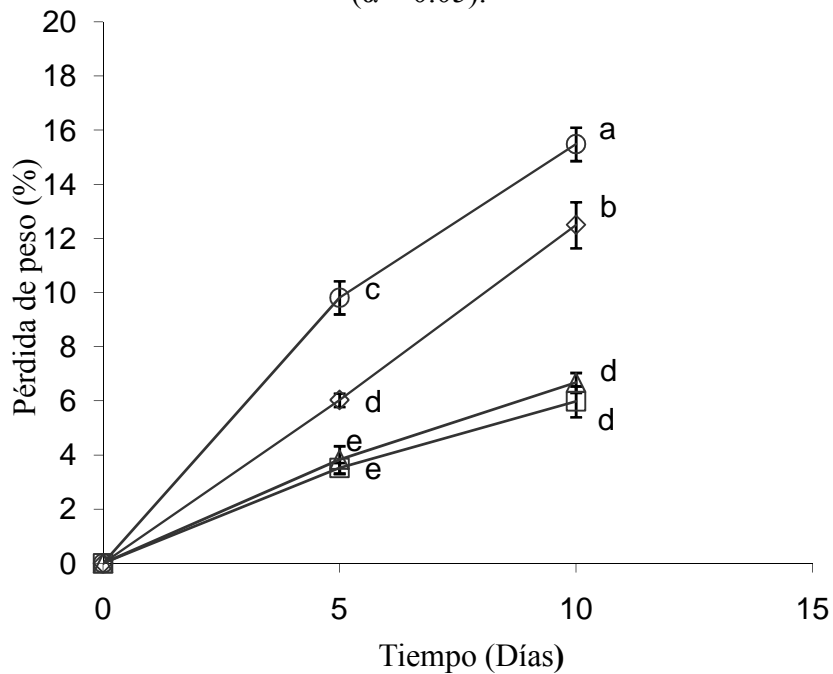


Figura 11. Pérdida de peso en rambután almacenado a 25 °C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey- ($\alpha < 0.05$).

8.3.2.4. Cambios de color del pericarpio y producción de ácido láctico

Los valores de L* (luminosidad) obtenidos, mostraron que el color de los frutos con tratamientos BAL y QBAL fue más claro que el observado con los tratamientos C y Q, lo cual puede deberse a un retraso en el proceso de senescencia como se indicó (Figuras 12a y b). Asimismo, puede observarse en la figura 12b, que estos mismos tratamientos almacenados a 10 °C tuvieron valores más altos de a* al día 15, efecto que puede estar relacionado con la disminución en la pérdida de agua en estos frutos, ya que los mayores efectos del oscurecimiento del rambután, se han asociado con su deshidratación (Landrigan *et al.*, 1996).

Por otra parte, también debe considerarse que si bien la pérdida de peso del tratamiento QBAL no fue diferente a las del tratamiento con quitosano, el microorganismo se encontraba activo, lo que podría estar contribuyendo a la retención de la coloración. Ketsa y Leelawatana, (1992) reportan que las antocianinas en el fruto de litchi son menos estables conforme el pH del medio aumenta, conservándose estables cuando se encuentran en pH ácidos. La presencia del lactobacilo en este trabajo y la producción de ácido láctico por las BAL ocasionaron que el pH del pericarpio se mantuviera ácido estabilizando a las antocianinas. Este efecto no pudo observarse a 25 °C (Figura 12a) ya que la deshidratación a esta temperatura fue muy severa en todos los tratamientos.

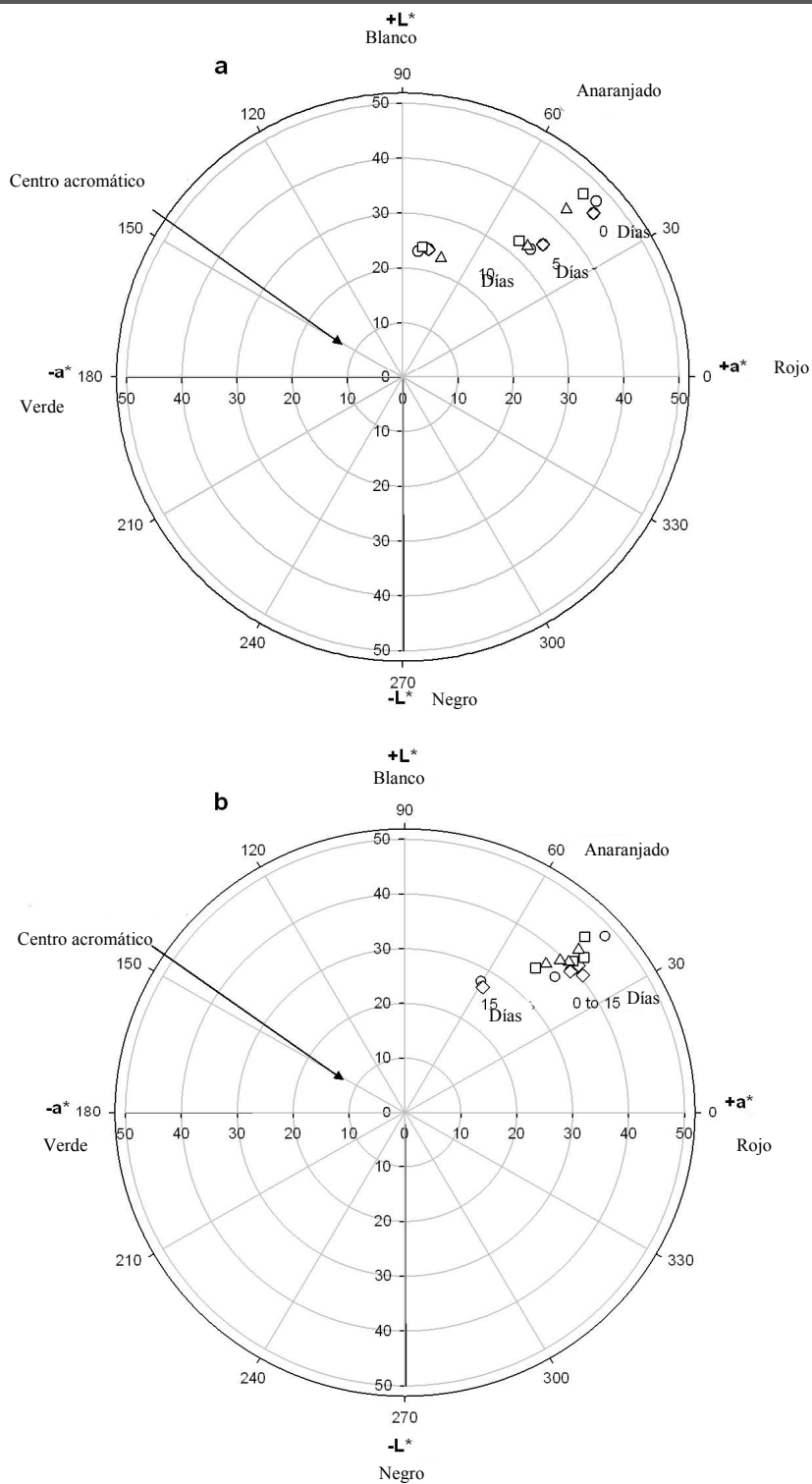


Figura 12. Gráficos polares de los cambios de color de frutos de rambután de acuerdo a la escala CIE (L^* y a^*) durante el almacenamiento a: a) 25 °C; b) 10° C. C (○); Q (◇); BAL (□) y QBAL (△).

La aplicación de *Lb. plantarum* solo o combinado con quitosano contribuyó a disminuir significativamente la pérdida de la coloración (a^*), (L^*) y la pérdida de peso con respecto al control. Además, ambos tratamientos (BAL y Q/BAL) ayudaron a conservar algunos parámetros de calidad del fruto de rambután, tales como el pH y la concentración de sólidos solubles totales. Por otra parte, es esencial remarcar que a pesar de la elevada concentración de quitosano (20 g/L) y a que éste pudo haber embebido una gran cantidad de bacterias lácticas, los microorganismos fueron capaces de sobrevivir durante todo el almacenamiento contribuyendo a conservar las características del fruto de rambután. Los parámetros de calidad presentaron mejores valores para los frutos almacenados a 10 °C, mientras que en los frutos almacenados 25 °C no se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos, debido a la senescencia y sobremaduración de los frutos.

La determinación de ácido láctico en el pericarpio en los frutos almacenados a 10 °C, tratados con *Lb. plantarum* mostró valores más altos ($24.7 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ pericarpio) ($\alpha < 0.05$), que los mostrados por los frutos control ($13.5 \pm 2.2 \mu\text{g/g}$ pericarpio) o los tratados con quitosano ($10.9 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ pericarpio) (Tabla 11). Por otra parte, los pericarpios tratados con quitosano/*Lb. plantarum* presentaron valores de $17 \pm 1.1 \mu\text{g/g}$ pericarpio, menores a los del microorganismo sólo, pero significativamente mayores a los de los tratamientos C y Q.

Tabla 10. Concentración de ácido láctico en el pericarpio de frutos de rambután almacenados a 10 °C.

Tratamiento	Tiempo	
	(Días)	μg de ácido láctico /g de cáscara
C	0	7.61 ± 0.15^a
C	15	13.47 ± 2.24^b
Q 20 g/L	15	10.87 ± 0.23^b
BAL	15	24.68 ± 0.13^d
Q 20 g/L/BAL	15	17.00 ± 1.13^c

*Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

La relación entre el ácido láctico y la pérdida de peso fue determinada y expresada como índice de impregnación de ácido láctico (IIA) de acuerdo a lo reportado por Caro y Joas, (2005). Altos valores de IIA indican altos valores de ácido producido sobre la superficie de rambután con una pérdida de peso baja. La relación entre IIA y a^* en los frutos almacenados a 10 °C después de 15 días de almacenamiento se muestran en la figura 13. Se puede observar que los valores de a^* aumentan con altos valores de IIA, y que ello significa una apariencia visual mejor. Esto indicó que valores altos de ácido láctico sobre el pericarpio de rambután producidos por *Lb. plantarum* produjeron una mejor apariencia y coloración de los frutos. De la misma manera, Caro y Joas (2005) reportaron que altos valores de IIA indicaron mejores características de calidad en frutos de litchi tratados con diferentes ácidos orgánicos. Estos resultados confirman que el quitosano permitió la viabilidad y la actividad metabólica de *Lb. plantarum* sobre la superficie del fruto y que este polímero puede ser usado de manera combinada con el microorganismo para acidificar el pericarpio y mantener la coloración de la superficie del rambután.

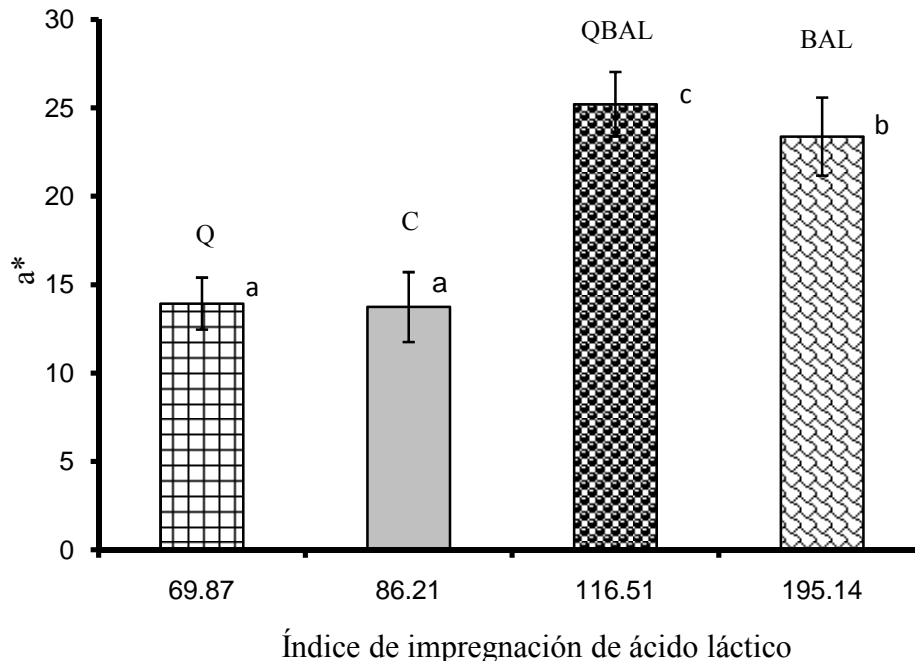


Figura 13. Efecto del índice de impregnación de ácido láctico sobre la calidad del color (a^*) en frutos almacenados a 10 °C. Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

8.3.3. Micrografías electrónicas de barrido del pericarpio de frutos de litchi sometidos a los tratamientos probados

El fruto de rambután mostró una morfología muy irregular que protegió y mejoró la resistencia de *Lb. plantarum* contra el quitosano (Fig. 14 a y b). Los análisis por SEM del recubrimiento mostraron que el biopolímero se distribuyó ampliamente a través del pericarpio, incluso en aquellas zonas con morfología muy irregular, tales como los tricomas, (Fig. 14 c y d). En la figura 14 e y f, se pudo observar que las bacterias se distribuyeron por la superficie del rambután, lo que coincide con los análisis de viabilidad, esto permitió que las bacterias mantuvieran la humedad del pericarpio. A pesar del efecto antimicrobiano del quitosano, los lactobacilos fueron capaces de crecer sobre la superficie de los frutos de rambután (Fig. 14 g y h).

Estudios previos han demostrado el efecto inhibitorio del quitosano sobre *Lb. plantarum* (No *et al.*, 2002). En los análisis iniciales se pudo observar que el quitosano de 117 kDa presentó una MIC en agar de 0.5 g/L. A pesar de lo anterior los análisis de viabilidad demostraron que la cuenta microbiana de los frutos tratados con quitosano permaneció estable durante el almacenamiento a 10 °C. En este sentido, también se ha reportado la sobrevivencia de *Candida saitoana* en recubrimientos de glicol quitosano (El Ghaouth *et al.*, 2000).

Kubota *et al.*, (2008) reportaron la formación de una biopelícula por BAL. Por lo que la disminución de la pérdida de peso en los frutos tratados con lactobacilos, también podría explicarse por la secreción de exopolisacáridos por *Lb. plantarum* con la consecuente formación de una biopelícula sobre los frutos a bajas humedades relativas (75 %). De acuerdo a Tallon *et al.*, (2003), las BAL secretan exopolisacáridos para adherirse a las superficies sólidas en condiciones de desecación. Por otra parte, la disminución de la pérdida de peso podría también ser atribuida a la colonización de la superficie de los frutos con *Lb. plantarum* ya que la alta densidad celular podría reducir la permeabilidad del vapor de agua, debido a la trayectoria tortuosa que necesitarían seguir las moléculas de agua al viajar desde el pericarpio hasta la microatmósfera de la superficie del fruto.

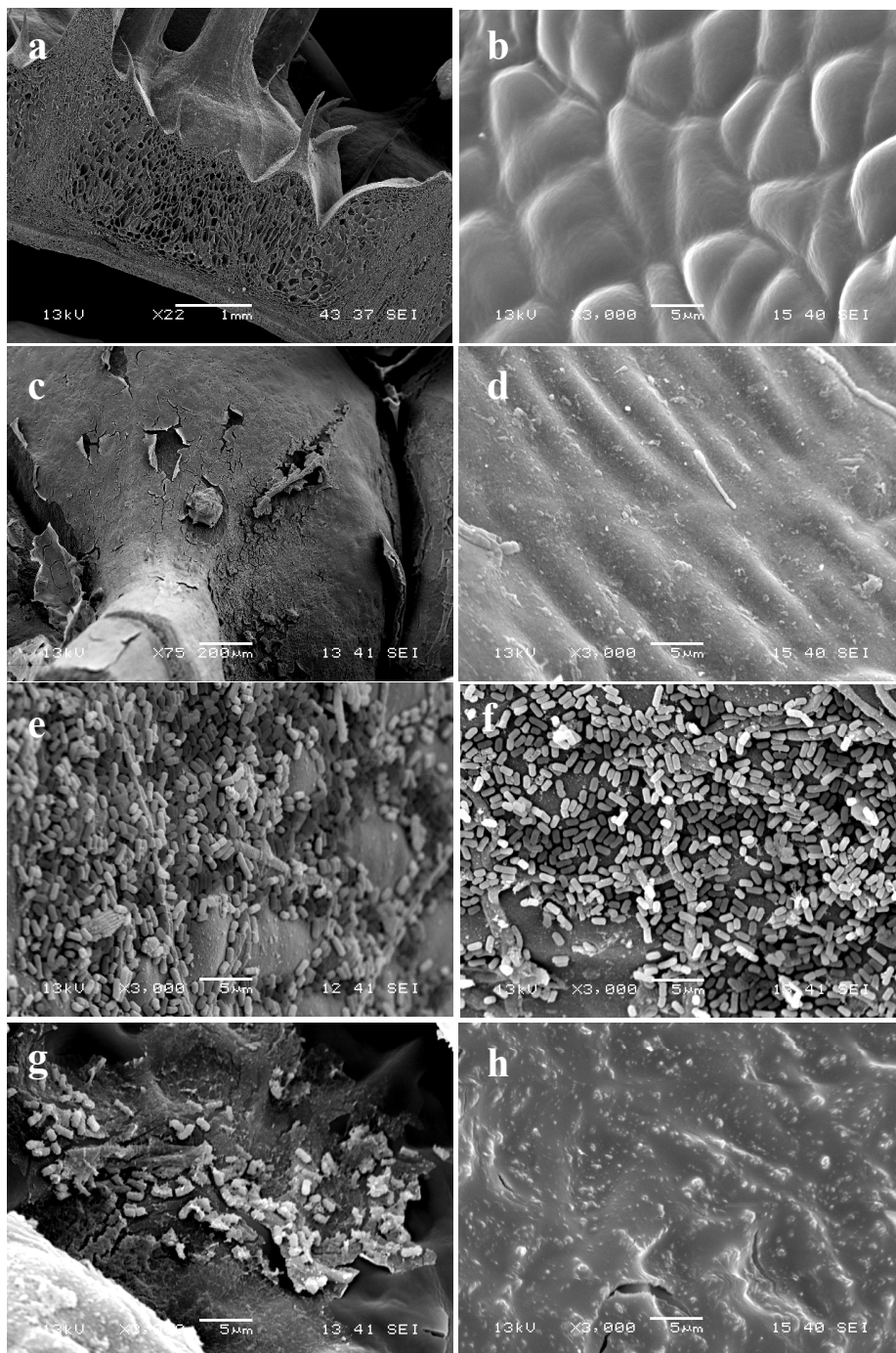


Figura 14. Micrografías electrónicas de los tratamientos de frutos de rambutan almacenados a 10 °C: a y b (C); c y d (Q); e y f (BAL) ; g y h (QBAL).

Los análisis realizados en este bioensayo mostraron que *Lb. plantarum* sobrevivió sobre la superficie del rambután bajo las condiciones de almacenamiento, encontrando condiciones favorables para la producción de ácido láctico. Por otra parte, el quitosano mantuvo la viabilidad del lactobacilo. Esto contribuyó a la conservación del color (a^* y L^*), el contenido de sólidos solubles totales y pH.

La utilización de quitosano en concentraciones de 20 g/L sobre la superficie de los frutos mostró pérdidas de peso más altas respecto al control y no tuvo un efecto inhibitorio total sobre el desarrollo y viabilidad del microorganismo. Por lo tanto, se propuso modificar químicamente el quitosano, para mejorar sus propiedades de barrera y disminuir así la pérdida de peso de los frutos en un segundo experimento.

8.4. Modificación del recubrimiento

8.4.1. Efecto de la fuente de carbono sobre la viabilidad de *Lb. plantarum*

Para mejorar la viabilidad de la BAL en la superficie del quitosano y la acidificación que produce se probó la adición de diferentes carbohidratos a medios mínimos nutritivos inoculados con *Lb. plantarum*, para proponer su inclusión como prebiótico en los recubrimientos y así mejorar la viabilidad y la acidificación producida por la BAL. Los resultados se muestran en la Figura 15, se puede observar que la fructosa tuvo el mejor efecto, aumentando significativamente el crecimiento de *Lb. plantarum* con respecto a las otras fuentes de carbono probadas. Este mismo carbohidrato mostró la mayor acidificación del medio, por lo que se decidió probarlo como prebiótico en los recubrimientos de quitosano (Figura 15).

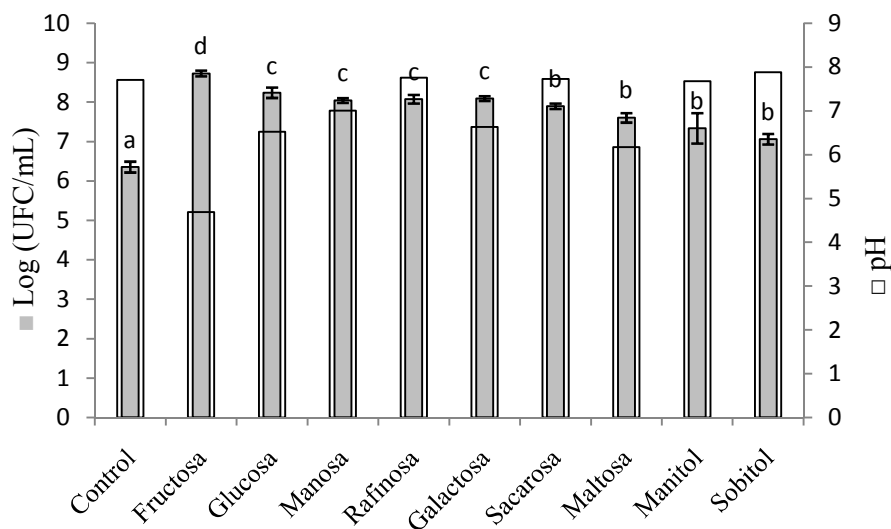


Figura 15. Crecimiento de *Lb. plantarum* en medio mínimo nutritivo adicionado con diferentes carbohidratos y acidificación del medio. Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

8.4.2. Modificación química del Quitosano

Para utilizar un proceso más limpio y amigable al medio ambiente, se decidió proponer como material estructural de los recubrimientos, un quitosano obtenido en el laboratorio de biopolímeros, a partir de un proceso biológico y observar su comportamiento con respecto al quitosano comercial.

A pesar de que el quitosano tiene muchas ventajas como material estructural para la elaboración de recubrimientos; de acuerdo a las isotermas obtenidas, a partir de humedades relativas altas ($> 73\%$) se presenta un aumento de la adsorción de agua sobre el quitosano, efecto que pudiera disminuir sus características mecánicas de resistencia a la tensión y aumentar su WVP. Las permeabilidades presentadas en el gradiente de $75 - 92\%$, fueron significativamente mayores ($\alpha < 0.05$), a las analizadas en el gradiente $0 - 75\%$, ya que la efectividad como barrera al vapor de agua depende de la estabilidad del recubrimiento a la temperatura y la humedad relativa del medio (Tabla 11). Para aumentar su resistencia a humedades mayores del 75% , se planteo la modificación química de este material estructural con glutaraldehído 0.02% p/v en una formulación líquida. Se observó que el quitosano modificado con glutaraldehído mejoró sus características como barrera al vapor de agua del recubrimiento en las condiciones de HR probadas ($75 - 92\%$). (Tabla 12).

Tabla 11. Permeabilidad al vapor de agua de quitosanos de 171.4 y 400 kDa a 20 g/L modificados con diferentes aditivos en condiciones de prueba $0 - 75$ y $75 - 92\%$ HR a $10\text{ }^\circ\text{C}$.

Quitosano (Mw)	Permeabilidad Condición de prueba (gmm/KPa dm^2)	
	0-75 %	75 - 92 %
Q 171.4 KDa	2.15 ± 0.20^a	39.33 ± 2.56^a
Q 400 KDa	2.35 ± 0.15^a	18.41 ± 1.05^b

*Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

Tabla 12. Permeabilidad al vapor de agua de quitosanos de 171.4 y 400 kDa modificados con diferentes aditivos en condiciones de prueba 75 – 92 % HR a 10 °C.

Quitosano		Aditivos	WVP
Peso (Mw)	Conc.	(p/v)	(gmm/dm ² kPa)
171.4 kDa	20 g/L	Control	39.33 + 2.56 ^a
		GA 0.02 %	34.1 + 1.56 ^b
	10 g/L	Control	22.56 + 2.87 ^c
		GA 0.02 %	16.58 + 0.76 ^d
400 kDa	10 g/L	Control	18.41 ± 1.05 ^{dc}
		GA 0.02 %	16.73 ± 0.15 ^d
		Fructosa 1%	22.82 ± 1.62 ^c
		GA 0.02 % + Fructosa	29.89 ± 3.73 ^b

*Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

Los recubrimientos de quitosano presentaron valores más bajos de permeabilidad conforme disminuyó la concentración de quitosano de 20 a 10 g/L. Por otra parte, se puede observar que los quitosanos de ambos Mw, presentaron WVP similares en las mismas condiciones a una concentración de 10 g/L. Esto es importante debido a que se seleccionó esta concentración para optimizar la formulación y disminuir los niveles de quitosano sobre el fruto y así reducir su efecto inhibitorio sobre la bacteria.

El quitosano de 400 kDa elaborado en el laboratorio de biopolímeros se seleccionó para probarse como recubrimiento en un último experimento con frutos de litchi. Por otra parte, la aplicación de glutaraldehído en concentraciones de 0.02% p/v disminuyó significativamente la transferencia del vapor de agua con respecto a cada quitosano control ($\alpha < 0.05$). Es esencial remarcar que el quitosano de 400 kDa (nativo), presentó valores muy similares al quitosano de 171.4 kDa con la modificación con GA, bajo las mismas condiciones de prueba (Tabla 12). Por otra parte, se puede observar que la adición de fructosa aumento significativamente la WVP, efecto perjudicial para esta característica del recubrimiento.

8.4.3. Análisis de la viabilidad y sobrevivencia de *Lb. plantarum* en películas de quitosano modificadas

Los análisis de viabilidad de las películas de quitosano modificadas con GA y/o con fructosa indican que los tratamientos con estos dos compuestos presentan valores superiores de UFC en las condiciones de almacenamiento probadas (Figura 16). En el análisis inicial se puede observar que en todos los tratamientos con quitosano, hay aproximadamente 5 unidades menos de log UFC de *Lb. plantarum* que en el control con bacterias solas. Por otra parte, se puede observar que el tratamiento de quitosano modificado con glutaraldehído y con fructosa, mostró una disminución de la actividad antimicrobiana del quitosano, alcanzando las BAL hasta 15 días de viabilidad.

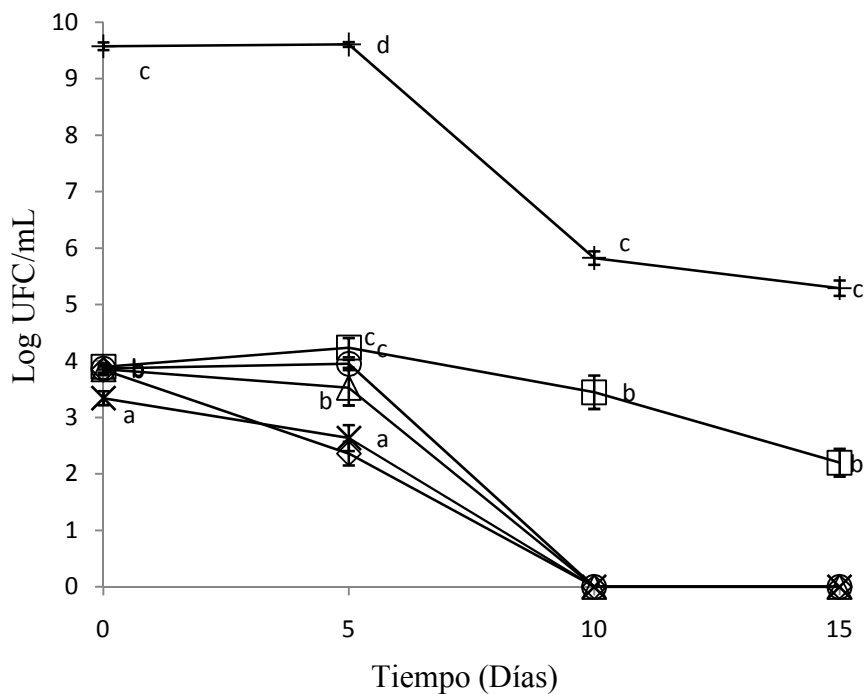


Figura 16. Viabilidad de *Lb. plantarum* en películas de quitosano de 400 kDa (10 g/L) almacenadas a 92% de HR y 10 °C. BAL (+); Q (◇); Q/GA (○); Q/F (△); Q/GA/F (□); GA (X). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

De acuerdo a estos resultados, se observó que las características antimicrobianas del GA disminuyeron mediante la combinación y el entrecruzamiento con el quitosano y viceversa, es decir que las propiedades antimicrobianas del quitosano también disminuyeron por la modificación con glutaraldehído, por lo que se puede proponer como un material estructural modificado para la elaboración de recubrimientos. La adición de fructosa también contribuyó a mejorar la sobrevivencia de *Lb. plantarum* en películas de quitosano, disminuyendo solo una unidad de log UFC con respecto a los análisis iniciales hasta los 15 días de almacenamiento. Por otra parte, los análisis de acidez titulable mostraron que la adición de GA y fructosa aumentó significativamente ($\alpha < 0.05$), la acidificación de la película de quitosano sobre los otros tratamientos (Figura 17). El pH obtenido después de la solvatación de la película se muestra en la figura 18. Puede observarse que los tratamientos con fructosa y GA presentaron pHs más bajos que el tratamiento con quitosano solo.

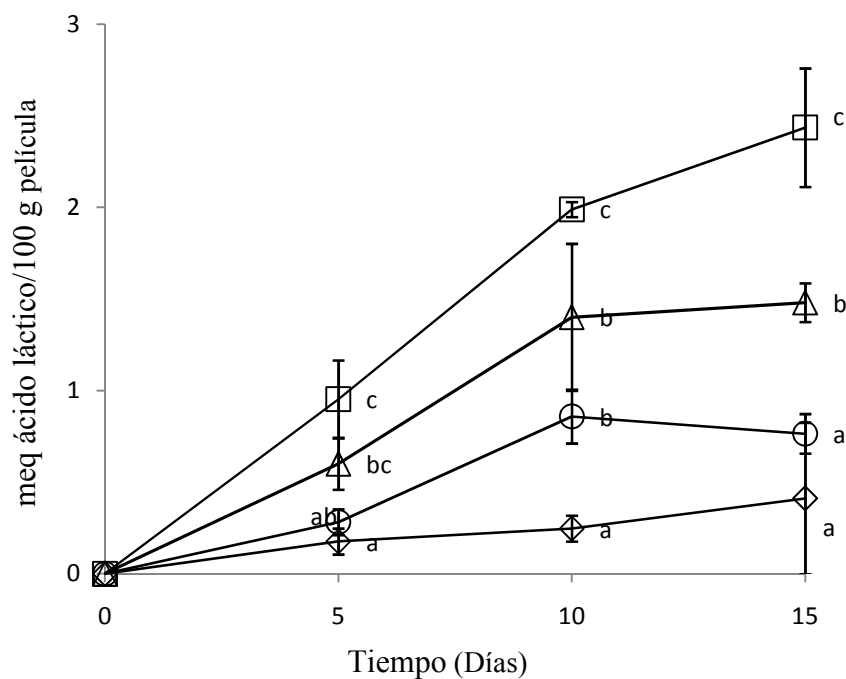


Figura 17. Acidez titulable de películas de quitosano de 400 kDa inoculadas con *Lb. plantarum* y almacenadas a 92 % HR y 10 °C. Q (\diamond); Q/GA (\circ); Q/F (\triangle); Q/GA/F (\square). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

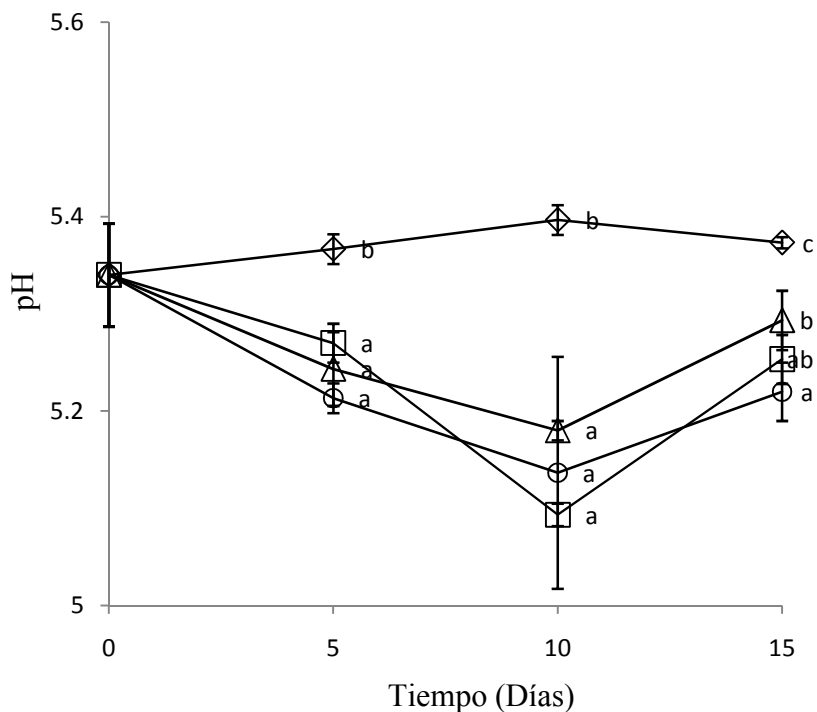


Figura 18. Cambios de pH en películas de quitosano de 400 kDa inoculadas con *Lb. plantarum* y almacenadas a 92 % HR y 10 °C. Q (◇); Q/GA (○); Q/F (△); Q/GA/F (□). Letras distintas indican diferencias significativas en el análisis estadístico Tukey ($\alpha < 0.05$).

A pesar del aumento de la viabilidad y la acidificación por la adición de fructosa, es importante remarcar que existe un efecto notable de este carbohidrato en el aumento de la WVP (Tabla 11), lo que disminuye las ventajas del quitosano como material estructural del recubrimiento. Por otra parte, el efecto positivo de la adición de GA al quitosano en mejorar las características de permeabilidad y viabilidad, deben tomarse con precaución, debido a que este compuesto es citotóxico y presenta algunas restricciones de uso (Nishi *et al.*, 1995; Sung *et al.*, 1999).

8.5. Experimento con frutos de litchi (*Litchi chinensis son cv. Brewster.*)

Una vez analizados los resultados del primer ensayo en frutos de rambután y una vez hechas las modificaciones propuestas al quitosano de 400 kDa, se procedió a analizar el efecto de estos cambios en los parámetros de calidad de frutos de litchi (*Litchi chinensis son cv. Brewster*).

8.5.1. Determinación de la viabilidad de *Lb. plantarum* durante el almacenamiento.

Los análisis de viabilidad de *Lb. plantarum* en frutos de litchi mostraron que los tratamientos C y BAL presentaron valores altos que se conservaron durante el almacenamiento (Fig. 19). Estos resultados confirman que las BAL fueron capaces de sobrevivir sobre la superficie de estos frutos. Por otra parte, cabe mencionar que en los tratamientos Q/GA y Q/GA/BAL no se observó viabilidad de bacterias gram positivas en ninguna de las diluciones efectuadas. Este efecto puede deberse a la citotoxicidad del GA o a la baja solubilidad del quitosano entrecruzado como fue reportado por Fwu-Long, *et al.*, 2006.

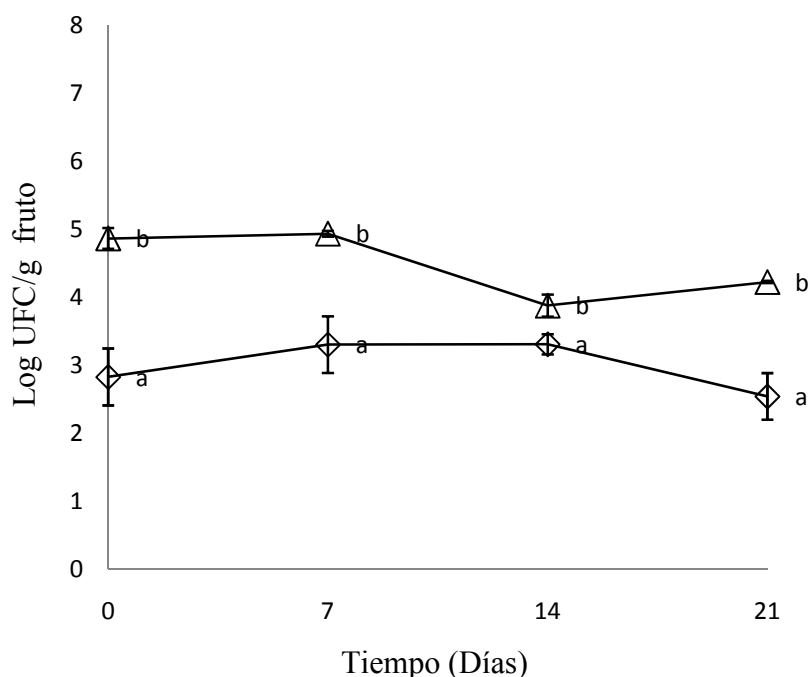


Figura 19. Crecimiento de bacterias lácticas (Log UFC/mL) en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. Siembra en placa por extensión en agar MRS. C (◇); BAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

Los análisis realizados por Shah y Nath, (2007) mostraron un incremento en la población de bacterias lácticas en el arilo de fruto de litchi mínimamente procesado, alcanzando de 3.5 a 6.5 log UFC/g cuando se almacenaron a 4 °C durante 24 días. Martínez-Castellanos *et al.*, (2009) demostraron que *Lb. plantarum* puede sobrevivir y producir ácido láctico sobre el pericarpio de frutos de rambután en condiciones de almacenamiento similares (10 °C y 75 HR), por lo que es factible proponer que *Lb. plantarum* pudiera haber tenido este mismo comportamiento en frutos de litchi, produciendo ácido láctico sobre el pericarpio y contribuyendo así a conservar las características de calidad del fruto de litchi. Los frutos de litchi tratados con quitosano modificado solo o en combinación con la BAL, no presentaron características adecuadas, por lo que estos tratamientos se omitieron en los análisis de ácido láctico, antocianinas y fenoles.

8.5.2. Determinación de ácido láctico en frutos de litchi

La determinación de ácido láctico en el pericarpio de los frutos almacenados a 10 °C, tratados con *Lb. plantarum* mostró valores más altos ($1169.68 \pm 85.74 \mu\text{g/g}$ pericarpio seco) ($\alpha < 0.05$), que los mostrados por los frutos control ($557.78 \pm 21.61 \mu\text{g/g}$ pericarpio seco) (Figura 20).

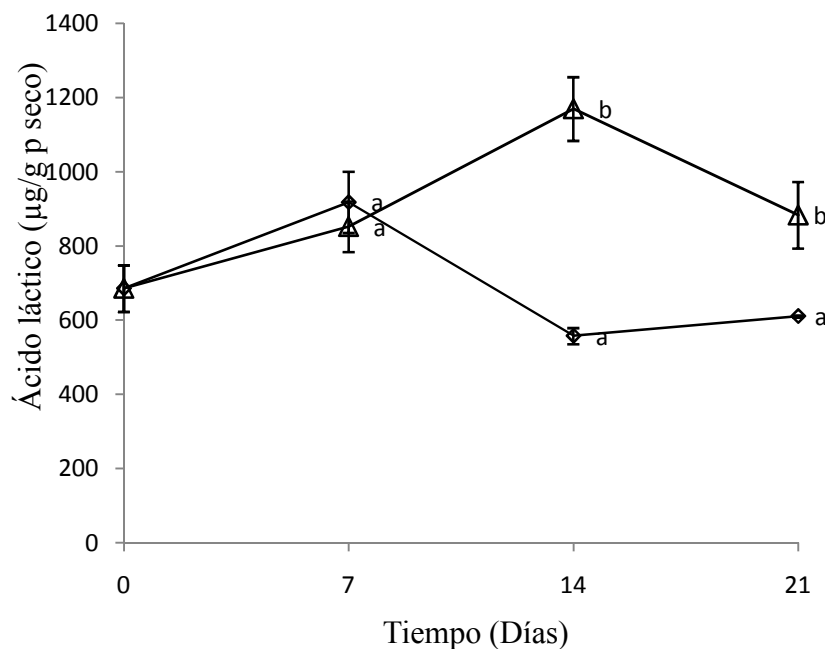


Figura 20. Determinación de ácido láctico en pericarpio de litchi. C (◇); BAL (Δ). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

A pesar de que ambos tratamientos presentaron valores similares de ácido láctico al séptimo día de almacenamiento, a tiempos mayores los frutos control presentaron niveles menores de acidez en el pericarpio por más tiempo. Este efecto es congruente con los análisis de viabilidad donde se observaron mayores unidades formadoras de colonias de bacterias gram positivas en los frutos tratados con *Lb. plantarum* y con la conservación de las características de color y la disminución del índice de daño presentadas por los frutos tratados con el microorganismo.

Es importante señalar que en ambos ensayos con frutos de rambután y de litchi se observaron resultados similares respecto al efecto de la bacteria láctica en los pericarpios de ambos tipos de frutos, que aunque poseen estructuras completamente diferentes como se verá en los estudios de microscopía electrónica, tienen problemáticas similares de oscurecimiento por deshidratación.

8.5.3. Análisis de los parámetros de calidad.

Las características de calidad observadas en los sólidos solubles, la acidez titulable, y los parámetros de color, demostraron que la bacteria láctica no afectó las características de calidad de los arilos y permitió conservar las características del pericarpio del fruto de litchi.

8.5.3.1. Pérdida de peso, sólidos solubles totales (SST), acidez titulable (AT) y cociente SST/AT

Se observaron cambios significativos en la evolución de estos parámetros durante el almacenamiento. A pesar de que la pérdida de peso durante el estudio fue alta, se atribuyó a la baja humedad relativa de la cámara en que se mantuvieron los frutos (75 ± 5 % HR). La Figura 21 muestra una disminución significativa de la pérdida de agua en frutos tratados con *Lb. plantarum* ($\alpha < 0.05$). Se considera que este efecto está relacionado con la actividad de la bacteria láctica sobre el pericarpio de litchi, ya que se obtuvieron resultados similares en frutos de rambután tratados con BAL, en los que también se observó una disminución en la pérdida de peso (Martínez-Castellanos *et al.*, 2009). Como se mencionó anteriormente este efecto puede explicarse por la secreción de exopolisacáridos por las bacterias que forman una biopelícula y/o por el crecimiento de las células bacterianas que disminuyen la permeabilidad al vapor de agua.

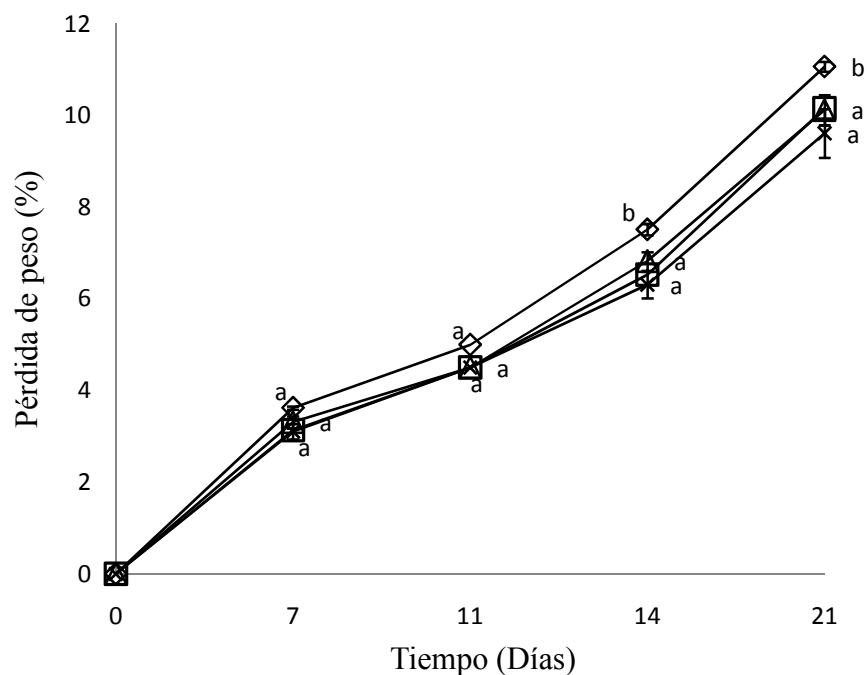


Figura 21. Pérdida de peso en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 ± 5 % HR. C (◇); Q/GA (□); BAL (△) y Q/GA/BAL (×). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

Pudo observarse también que la modificación del quitosano con GA disminuyó significativamente la pérdida de peso de los frutos con respecto al quitosano nativo, aunque estos valores son altos con respecto a los comercialmente aceptables (8 %), ambos frutos mantuvieron pérdidas de peso menores a los reportados por Jiang y Fu (1999), donde se reportaron pérdidas de peso mayores al 20 % después de 3 días de almacenamiento a humedades relativas de 70 %.

Por otra parte, los análisis de calidad mostraron que la acidez titulable, los sólidos solubles totales, y la relación SST/AT no fueron significativamente diferentes durante el almacenamiento en los frutos control y los tratados con *Lb. plantarum* (Tabla 13); sin embargo, el quitosano modificado disminuyó la AT del litchi y por lo tanto, elevó el cociente SST/AT, efecto que puede estar relacionado con la citotoxicidad del GA.

Tabla 13. Características de calidad de frutos de litchi almacenados 21 días a 10 °C y 75 ± 5 % HR

Tratamientos	AT (%)	SST	SST/AT	Vol Jugo ¹
C	0.22 ± 0.09 ^a	18.96 ± 0.20 ^a	85.78 ± 22.30 ^a	60.92 ± 2.32 ^a
BAL	0.21 ± 0.01 ^a	18.6 ± 0.30 ^a	91.85 ± 19.98 ^a	68.05 ± 1.87 ^b
Q/GA	0.15 ± 0.01 ^b	18.9 ± 0.50 ^{cb}	144.04 ± 17.32 ^b	68.09 ± 0.10 ^{ab}
Q/GA/BAL	0.13 ± 0.08 ^b	18.7 ± 0.62 ^{ab}	141.40 ± 11.32 ^b	67.79 ± 1.55 ^b

¹Volumen de jugo extraído de cada 15 frutos. *Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

Los análisis del volumen de jugo mostraron que los frutos tratados con *Lb. plantarum* presentaron valores significativamente mayores a los frutos control, efecto que correlaciona con la disminución observada en la pérdida peso ($\alpha < 0.05$) de este tratamiento.

8.5.3.2. Cambios de color del fruto

Los cambios de color del pericarpio se relacionaron directamente con los cambios en los valores L*, C* y h. Los valores iniciales de L* (luminosidad) fueron de 30.5 ± 1 y mostraron una disminución gradual pero significativa ($\alpha < 0.05$) durante al almacenamiento de los frutos control, alcanzando valores de 25 unidades (Fig. 22). El tratamiento con *Lb. plantarum* presentó los valores más altos de L* de todos los tratamientos analizados, conservando los valores de este parámetro sin diferencias significativas durante los 21 días de almacenamiento, lo que se reflejó en una apariencia más clara del fruto ($\alpha < 0.05$). Ésto es importante, debido a que los frutos control presentaron un oscurecimiento mayor. El tratamiento con quitosano modificado mostró los valores más bajos a los 14 y 21 días de almacenamiento, sin embargo cuando se le combinó con la BAL, se observó un efecto protector de *Lb. plantarum* en el pericarpio que contrarrestó el efecto negativo del GA adicionado al quitosano en solución. Se considera que este efecto esta relacionado con la

actividad del microorganismo y la acidificación que produce *in situ* durante los primeros días de almacenamiento. Por otra parte, se observó que este tratamiento mostró valores similares a los del tratamiento control.

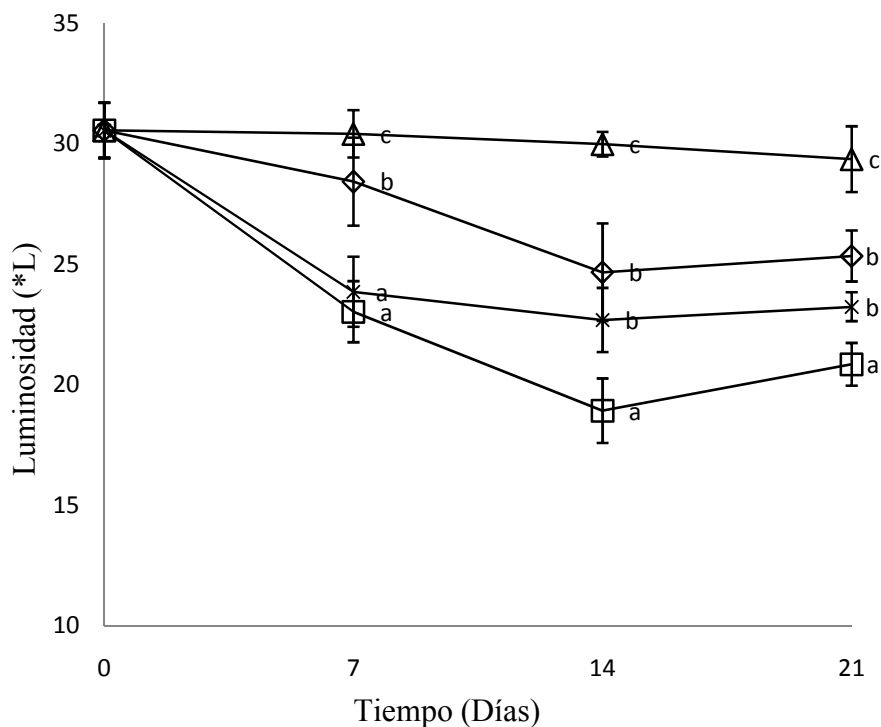


Figura 22. Valores de luminosidad (L^*) en frutos de litchi almacenados a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 75% HR. C (◇); Q/GA (□); BAL (△) y Q/GA/BAL (×). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

El valor C^* (saturación, cromaticidad), mostró que el color rojo de los frutos control se tornó más opaco a partir del día 7 de almacenamiento, alcanzando valores de 25 (Fig. 23). Los frutos tratados con la bacteria láctica mostraron un color más vívido del pericarpio ya que los dos últimos días de análisis mantuvieron valores significativamente mayores de saturación en relación a los demás tratamientos ($\alpha < 0.05$). Por otra parte, la aplicación del quitosano modificado aceleró la disminución de C^* , aumentando rápidamente la opacidad del color del pericarpio.

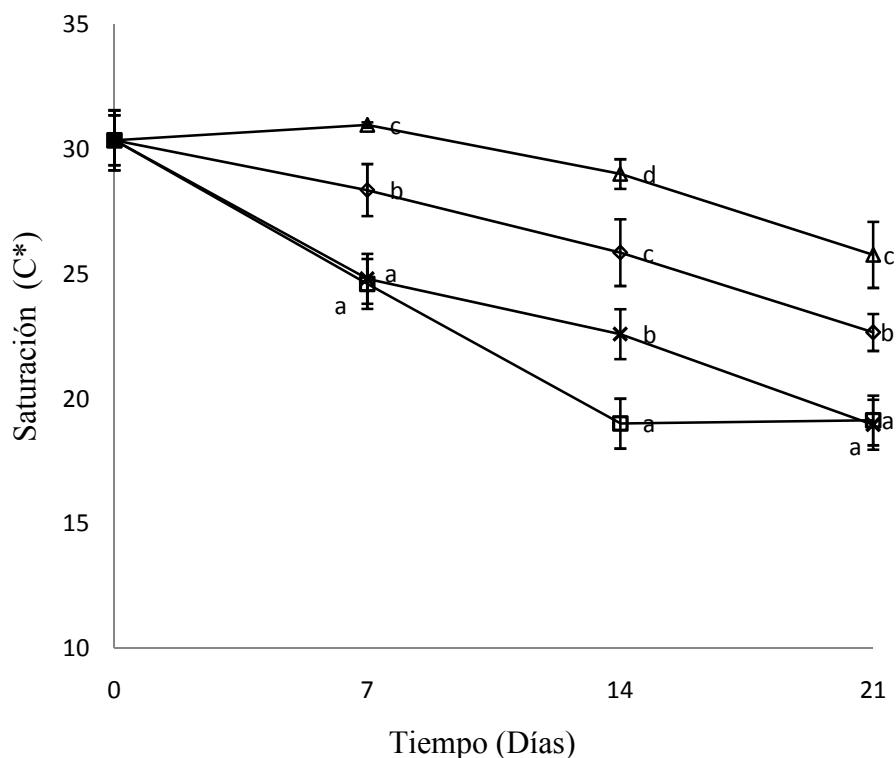


Figura 23. Cromo o saturación (C*) en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (◇); Q/GA (□); BAL (△) y Q/GA/BAL (×). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

En la figura 24 se puede observar que los valores de matiz h (tinte, matiz o color), para los frutos control y los tratados con BAL no presentaron diferencias significativas durante todo el almacenamiento, presentando después del día 14 de almacenamiento ($\alpha < 0.05$), valores cercanos a 35, que es el valor máximo de h permitido para la comercialización del fruto. Los frutos tratados con GA mostraron un oscurecimiento rápido de la cáscara que correlaciona con los valores de los parámetros cromáticos CIE (L*, C* y h). Es importante hacer notar que la medida de los parámetros se realizó en las regiones no afectadas por el oscurecimiento del fruto, ya que lo que se pretendía analizar era el efecto de los tratamientos en el color rojo original de los frutos o en la degradación de antocianinas.

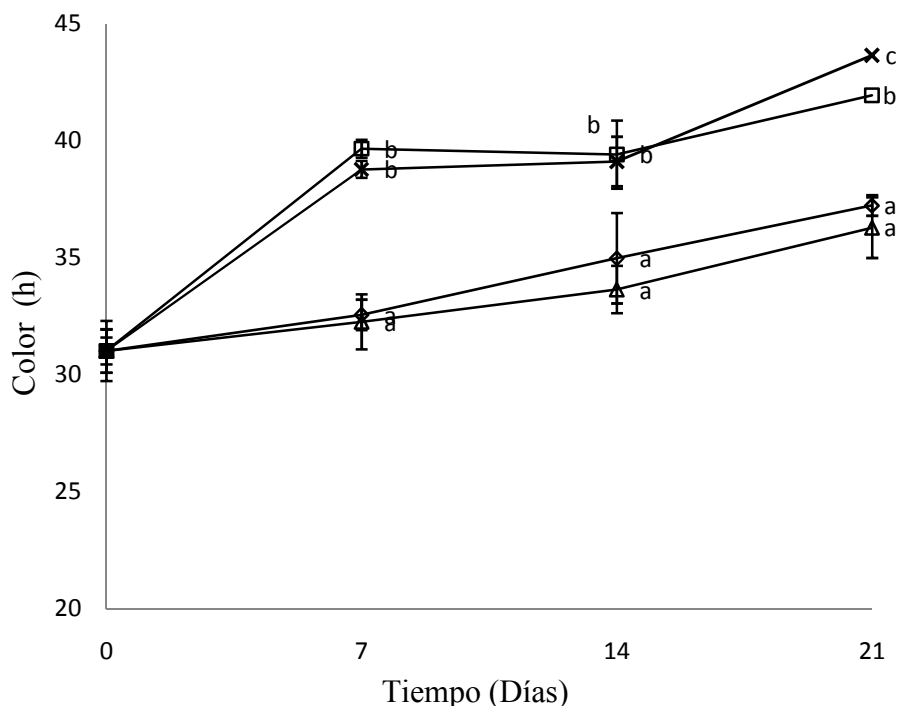


Figura 24. Valores h en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (◇); Q/GA (□); BAL (△) y Q/GA/BAL (×). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

8.5.3.3. Índice de daño

El índice de daño mostró una perspectiva más amplia de la degradación del pericarpio y la pérdida de la coloración de la superficie de los frutos ya que está directamente relacionado con la calidad visual de los litchis. Los frutos control aumentaron gradualmente el daño en la escala elegida, alcanzando niveles entre 5 y 6 lo que corresponde a daños severos en más del 50 % de la superficie del pericarpio (Fig. 25), mientras que los frutos tratados con *Lb. plantarum* mostraron valores significativamente menores a los encontrados en los frutos control a los 21 días de almacenamiento ($\alpha < 0.05$).

A pesar de que los frutos control y los tratados con BAL presentaron valores de índice de daño de 4 (41- 50 % de daño) al día 14 de almacenamiento, los frutos tratados con *Lb. plantarum* mostraron claramente una mejor condición y coloración e incluso se alcanzaron a

diferenciar significativamente por una unidad menos de daño con respecto al índice de daño de los demás tratamientos al día 21 del almacenamiento ($\alpha < 0.05$).

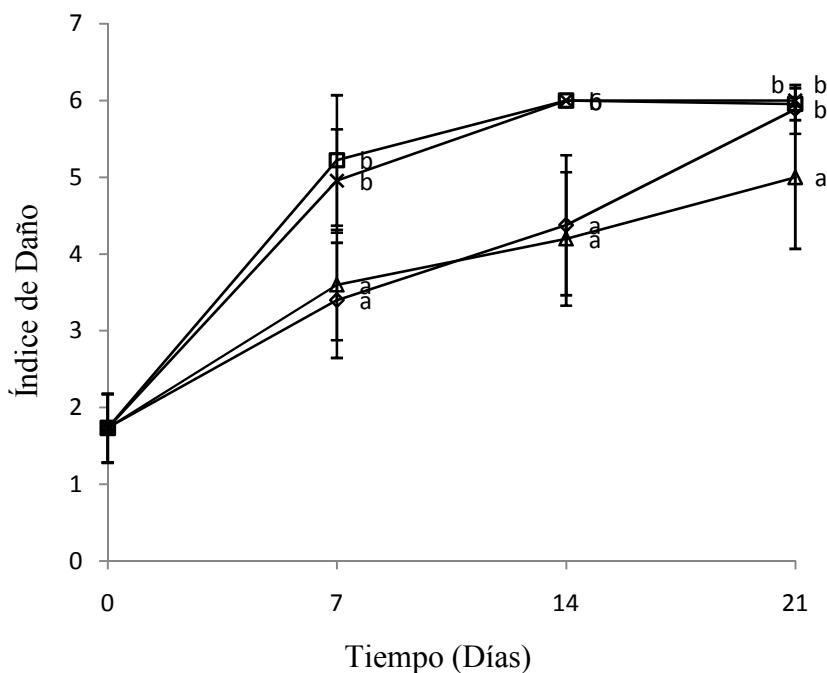


Figura 25. Índice de daño en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (◇); Q/GA (□); BAL (△) y Q/GA/BAL (×). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

Efectos similares se han demostrado en tiempos más cortos con la aplicación directa de ácidos (clorhídrico y cítrico) sobre la superficie del fruto. Jiang *et al.*, (2004) encontraron que se puede disminuir significativamente el oscurecimiento del fruto con respecto a la concentración de ácido clorhídrico (0.5, 1 y 2 %) y del tiempo de inmersión de los frutos de litchi cv. Huaizhi en dichas soluciones ácidas.

También se ha probado la adición de algunas sustancias antioxidantes para tratar de disminuir el oscurecimiento del pericarpio. Duan *et al.*, (2007) encontraron que la adición de antioxidantes extraídos de litchi (antocianinas) a pericarpios de frutos de litchi, pueden reducir la peroxidación lipídica de las membranas, preservando la integridad celular y disminuyendo con ello el oscurecimiento. El efecto de *Lb. plantarum* observado en la conservación del color es consistente con los resultados del primer ensayo realizado con frutos de rambután, en el que se encontró que las bacterias lácticas están directamente relacionadas con la disminución del

oscurecimiento, debido a la acidificación que provocan *in situ* por la producción de ácido láctico en el pericarpio.

8.5.3.4. Determinación de antocianinas

En la figura 26 se presenta la evolución de Cianidina-3-rutinósido, antocianina más abundante (≥ 75 %) en frutos de litchi cv. Brewster (Lee y Wiker, 1991; Riviera-López *et al.*, 1999). Se puede observar que la aplicación de *Lb. plantarum* logró disminuir la degradación de esta antocianina a partir de los siete días de almacenamiento, encontrándose diferencias significativas con respecto a los frutos control ($\alpha < 0.05$). Este efecto se atribuyó a la producción de ácido láctico por las BAL y es consistente con los datos de índice de daño y valores CIE-LAB (L^* , C^* y h) obtenidos.

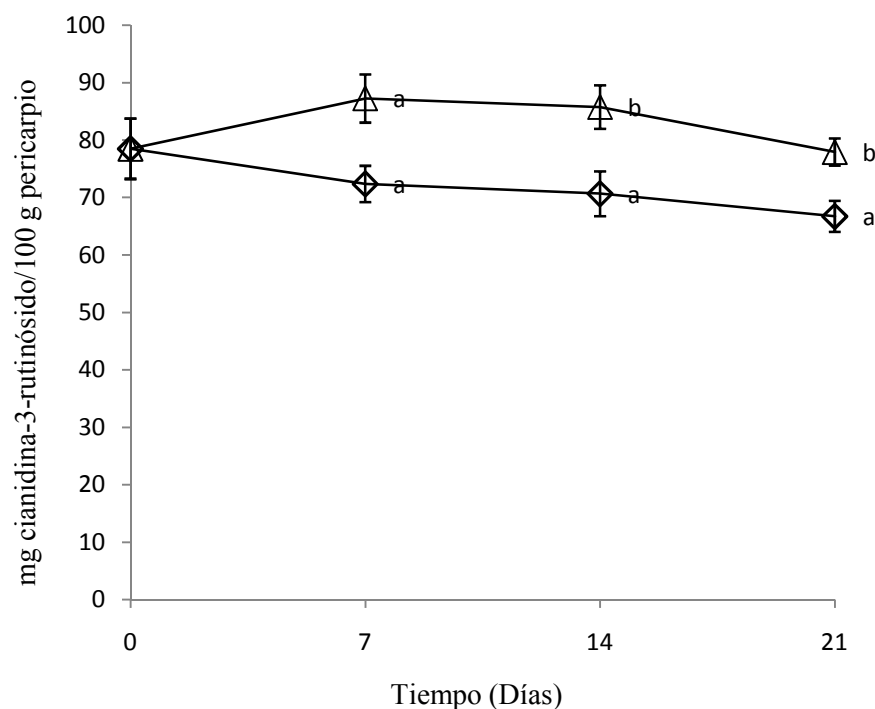


Figura 26. Evolución de cianidina-3-rutinósido en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (\diamond); BAL (Δ). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

La disminución de la cianidina-3-rutinósido durante el periodo poscosecha en litchi es consistente en diferentes estudios, disminuyendo alrededor del 19 % a los 25 días de almacenamiento a 4 °C (Lee y Wiker, 1991). Por otra parte, los resultados encontrados son equiparables a los reportados por Shi-Ping *et al.*, (2005) donde la concentración de antocianidinas se mantuvo estable durante los primeros 14 días con atmósferas modificadas de oxígeno y dióxido de carbono, favoreciéndose la conservación de los frutos de litchi.

La medida de la absorbancia por espectrofotometría (*A/g pericarpio*) también mostró una disminución significativa ($\alpha < 0.05$) de la pérdida de antocianinas totales en el pericarpio de los frutos de litchi tratados con BAL a los 14 y 21 días de tratamiento (Fig. 27) y fue congruente y se correlacionó bien con la concentración de cianidina-3-rutinósido obtenida por HPLC ($R^2 = 0.9334$).

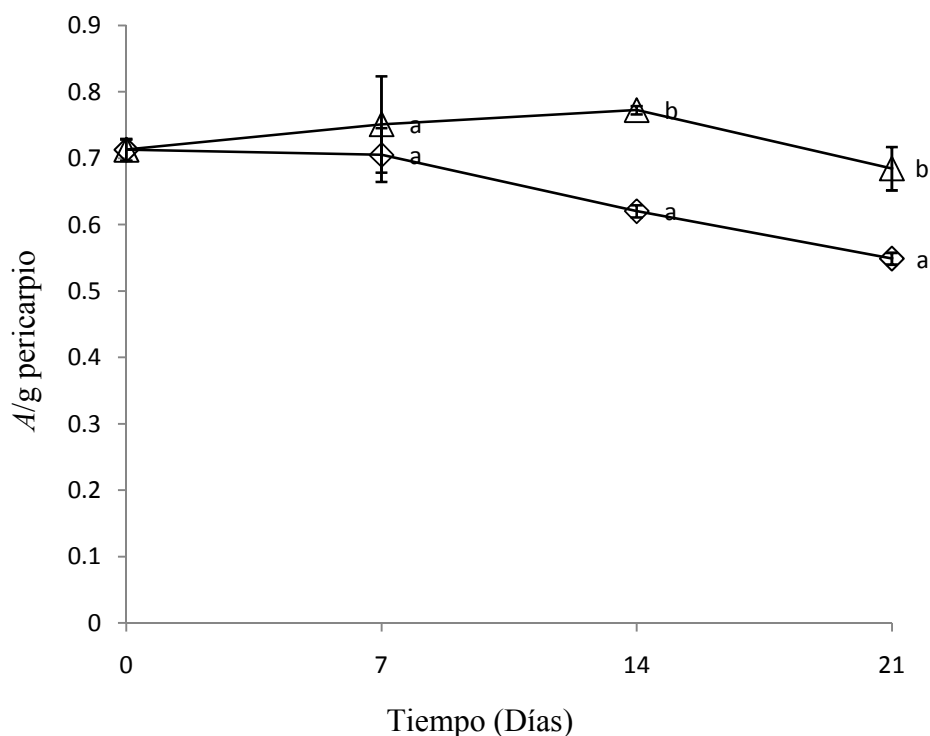


Figura 27. Antocianinas totales medidas por absorbancia (*A/g pericarpio*) en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (\diamond); BAL (\triangle). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

8.5.3.5. Determinación de fenoles

Los niveles de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu se presentan expresados como mg de catequina en la figura 28. Puede observarse que hubo mayor concentración de fenoles en los frutos tratados con *Lb. plantarum* que en los frutos control a los 7 y 21 días de almacenamiento. En general este comportamiento coincide con el reportado en la literatura por Shah y Nath, (2007) quienes encontraron que el contenido total de fenoles disminuyó alrededor del 30 % después de 24 días de almacenamiento para distintos tratamientos. Cabe mencionar que los frutos tratados con la bacteria láctica mostraron una disminución del 50 % de la pérdida de fenoles con respecto a los frutos control, es decir que presentan mayores niveles de fenoles. Esto podría disminuir la oxidación de antocianinas y consecuentemente el oscurecimiento del pericarpio de acuerdo al mecanismo propuesto por Jiang, *et al.*, (2004) que sugieren que la acción de algunas enzimas (PDO y la PPO) sobre los fenoles produce productos de oxidación que aceleran la degradación de antocianidinas con el subsecuente aumento en la concentración de compuestos de color café.

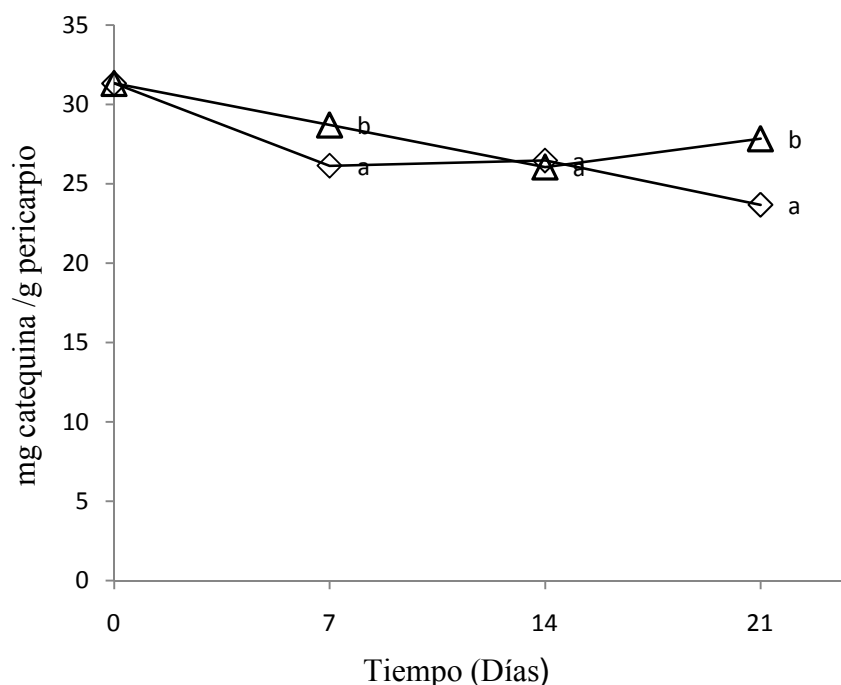


Figura 28. Concentración de fenoles (mg catequina/g pericarpio) en frutos de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR. C (◇); BAL (△). Letras distintas indican diferencias significativas de acuerdo a un análisis estadístico LSD ($\alpha < 0.05$).

Un mayor número de fenoles totales en el pericarpio indica de acuerdo al mecanismo propuesto, menor formación de compuestos poliméricos de color café, y una menor actividad de enzimas sobre las antocianinas. Esta interpretación se justifica por los valores obtenidos en índice de daño, parámetros de color (L^* , C^* y h) y los análisis de cianidina-3-rutinósido y antocianinas totales.

8.5.4. Microscopía electrónica de barrido del litchi (SEM)

Las micrografías electrónicas de los frutos mostraron una estructura bastante compleja del pericarpio del fruto de litchi (Fig. 29). Las estructuras observadas se atribuyeron a formaciones parecidas a placas alisadas y ornamentadas de cera, de acuerdo con lo reportado por Sivakumar y Korsten, (2006). El tratamiento con *Lb. plantarum* mostró una mayor densidad bacteriana sobre la superficie de los frutos de litchi en comparación a los frutos control (Figuras 29 a y b). Estos resultados corresponden con las viabilidades encontradas en este tratamiento. A los 14 días de almacenamiento la estructura de los frutos control se encontró inalterada con respecto al análisis inicial (Fig. 29c), mientras que los frutos tratados con *Lb. plantarum* presentaron algunas estructuras sobre la superficie, presumiblemente polisacáridos secretados por las BAL (Figura 29d). Estas estructuras, aunque aleatoriamente distribuidas, podrían contribuir a mantener la microatmósfera de la superficie del fruto, disminuyendo la pérdida de agua y ayudando a conservar las características de calidad del fruto de litchi tal y como se observó en los análisis anteriores. Esto constituye también una evidencia de que las bacterias lácticas se encontraron metabólicamente activas sobre la superficie del litchi, y contribuye a explicar el efecto del lactobacilo sobre la disminución de la pérdida de peso observada en los ensayos con ambos frutos, ya que la presencia de este polisacárido disminuye el área expuesta del pericarpio con respecto a la microatmósfera que rodea al fruto.

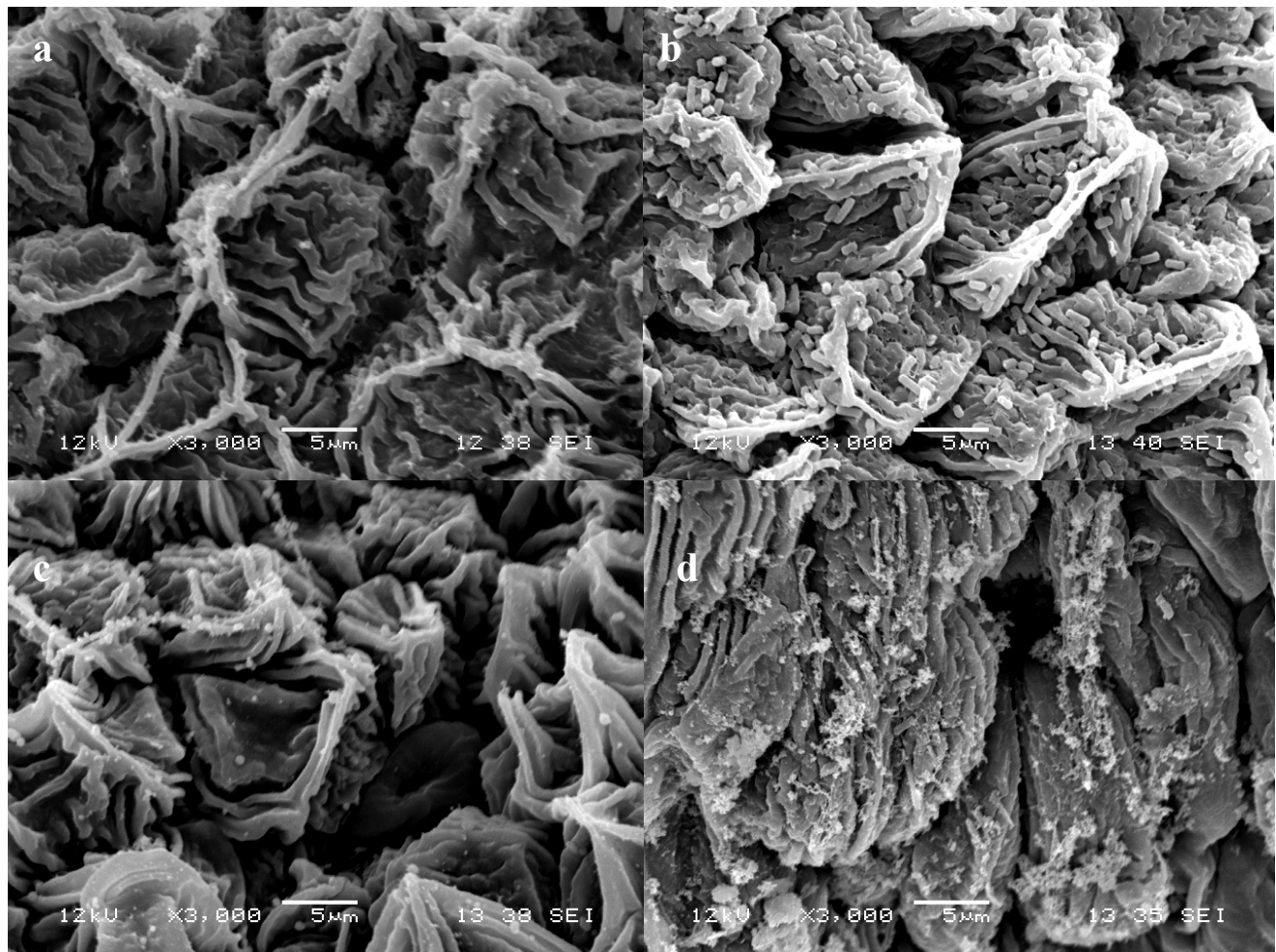


Figura 29. Micrografías electrónicas de la superficie de litchi almacenados a 10 °C y 75 % HR al inicio del experimento (3000X): a) C; b) BAL; y a los 14 días: c) C; d) BAL.

9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró que la combinación de quitosano y bacterias lácticas en un recubrimiento bioactivo, tuvo la propiedad de producir ácido láctico y limitar la pérdida de la calidad de frutos de litchi y rambután debido a la acidificación *in situ* del pericarpio, la estabilización de pigmentos antocianinas y la conservación del color.

Las BAL fueron capaces de sobrevivir en concentraciones de quitosano de 10 y 20 g/L, aplicadas sobre películas preformadas para análisis *in vitro* o en recubrimientos para ensayos *in vivo* en frutos de rambután y litchi, concentraciones que son mayores a las MIC obtenidas en placa.

El desarrollo y actividad de *Lb. plantarum* fue evidente en frutos y películas por la determinación de UFC y por la producción de ácido láctico. Esto contribuyó a la conservación del color, así como al mantenimiento de las características de calidad de los frutos evaluados. En el segundo ensayo con frutos de litchi, se realizó un análisis más profundo del efecto del microorganismo sobre la coloración del fruto, observándose que la producción de lactico *in situ*, ayudo a mantener las concentraciones de antocianinas totales y cianidina-3-rutinósido en los pericarpios del litchi.

Por lo que la inclusión de *Lb. plantarum* mejoró la conservación poscosecha de ambos frutos a temperaturas de 10 °C y a una humedad relativa baja (75 ± 5 %), lo cual es importante para aumentar el tiempo de vida útil y disminuir los costos de transportación y almacenamiento.

Los resultados obtenidos demuestran la importancia de la inclusión de *Lb. plantarum* como alternativa a otros tratamientos químicos, para disminuir el oscurecimiento poscosecha de los frutos de rambután y litchi.

10. PERSPECTIVAS

- Este trabajo de investigación se basó en la utilización del quitosano como soporte de una BAL, para aprovechar las propiedades conjuntas de estos dos componentes, tanto las del recubrimiento como las de la acidificación *in situ* por el microorganismo. Esta aportación abre la posibilidad de realizar diversos estudios para mejorar y aplicar los resultados obtenidos en la conservación de alimentos.
- Además, los resultados obtenidos permiten ampliar la perspectiva del uso del quitosano como compuesto antimicrobiano y sientan las bases para poder combinarlo con otros microorganismos. Sin embargo, se deben realizar más estudios para aclarar las interacciones que pueden ocurrir entre estos dos elementos.
- A pesar de que las películas modificadas con GA, no presentaron resultados positivos en los análisis *in vivo*, si mostraron buenas características *in vitro*, con lo que se abre una ventana de oportunidad para mejorar la formulación y obtener mejores resultados con otros compuestos.
- Es esencial determinar el mecanismo de sobrevivencia de los microorganismos sobre los soportes del quitosano.
- Por otra parte también debe profundizarse el estudio del efecto del microorganismo sobre la superficie de los frutos disminuyendo su deshidratación.

11. TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICACIONES

11.1. Publicaciones

- Gustavo Martínez-Castellanos, Keiko Shirai, Clara Pelayo-Zaldívar, Laura J. Pérez-Flores, José D. Sepúlveda-Sánchez. 2009. Effect of *Lb. plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan (*Nephelium lappaceum*). Food Microbiology 26:444–449.

11.2. Congresos

- Gustavo Martínez-Castellanos, Keiko Shirai, Clara Pelayo-Zaldívar y Laura J. Pérez-Flores. 2009. “Efecto de *Lactobacillus plantarum* y quitosano en la reducción del oscurecimiento del pericarpio de rambután (*Nephelium lappaceum*)” Trabajo libre y presentación Oral en el área de Biotecnología alimentaria en el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco, Guerrero, México. Junio de 2009.
- Gustavo Martínez-Castellanos y Keiko Shirai, 2009. “Viabilidad de *Lb. plantarum* en películas de quitosano entrecruzadas con glutaraldehído” Trabajo libre y presentación Oral en el área de Biotecnología alimentaria en el XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería y VII Simposio Internacional de Producción de Alcoholes y Levaduras. Acapulco, Guerrero, México. Junio de 2009.
- Presentación del cartel denominado: “Efecto de Recubrimientos Bioactivos de Quitosano y Lactobacilos para la Conservación Poscosecha de Rambután (*Nephelium lappaceum*)” en el VI Congreso del Noreste y II Nacional en Ciencias Alimentarias y Biotecnología, realizado en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México, desarrollado de 12 al 17 de Noviembre de 2007.
- Presentación del cartel denominado: “Viabilidad de Bacterias Lácticas en Películas de Quitosano para su Aplicación en Alimentos” en el IV Simposio Ibero-americano de Quitina, realizado en la ciudad de Natal, Brasil, 12/Mayo/2007.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Amnon L., Orit Dvir, Ilana Rot, Miryam Akerman, Rafi Regev, Aharon Wiesblum, Elazar Fallik, Giora Zauberman, Yoram Fuchs. 2000. Hot water brushing: an alternative method to SO₂ fumigation for color retention of litchi fruits. *Postharvest Biology and Technology*, 18, 235-244.
- AOAC, 2000. Official Methods of Analysis (Horwitz, W. ed.). Gaithersburg, Maryland, EUA.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. En: *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. (Salminen, S. y Wright, A. von, eds.), 2nd edition.. Marcel Dekker Inc. New York, USA. pp. 1-72
- Audet. P., Paquin, C. y Lacroix C. 1989. Sugar utilization and acid production by free and entrapped cells of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in a whey permeate medium. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:185–189.
- Audet, P., Paquin, A. y Lacroix, C. 1998. Immobilized growing lactic acid bacteria with κ-carrageenan-locust bean gum gel. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 29:11-18.
- Batten, D. J. 1989. Maturity criteria for litchis (Lychees). *Fruit quality and preference*. 1:149-155.
- Bódalo, A., Bastida, J., Gómez, J. L., Gómez, E., Alcaraz, I. y Asanza, M. L. 1997. Stabilization studies of L-aminoacylaseproducing *Pseudomonas* sp. BA2 immobilized in calcium alginate gel. *Enzyme and Microbial Technology*. 21:64–69.
- Bosquez, M. E., Vernon, J. J., Pérez, L. y Guerrero, L. 2000. Películas y cubiertas comestibles para conservación en fresco de frutas y hortalizas. *Industria Alimentaria*. 22: 14-36.
- Bosquez-Molina, E. 2004. Desarrollo de recubrimientos comestibles formulados con goma de mesquite y cera de candelilla para la conservación de frutas. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana. México, pp. 6-15.
- Breidt, F. y Fleming, H.P. 1997. Using lactic acid bacteria to improve the safety of minimally processed fruits and vegetables. *Food Technology*. 51:44–51.
- Cachon, R., Catté, M., Nommé, R., Prévost, H. y Diviè, C. 1995. Kinetic behaviour of *Lactococcus lactis* ssp. *Lactis* bv. *Diacetyllactis* immobilized in calcium alginate gel beads. *Proceedings of Biochemistry*. 30:503-510.

- Caner, C., Vergano, P.J. y Wiles, J.L. 1998. Chitosan film mechanical and permeation properties as affected by acid, plasticizer, and storage. *Journal of Food Science* 63:1049-1053.
- Caro, Y. y Joas, J., 2005. Postharvest control of litchi pericarp browning (cv. Kwai Mi) by combined treatments of chitosan and organic acids: II. Effect of the initial water content of pericarp. *Postharvest Biology and Technology*. 38:137–144.
- Carr, F.J., Chill, D. y Maida, N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*. 28:281-370.
- Cataloluk, O. 2001. Molecular characterization of the gene encoding for Salivaricin B activity and its flanking sequences. *Turkish Journal of Biology*. 25:379-386.
- Champagne, C. P., Gaudy, C., Poncelet, D. y Neufeld, R. J. 1992. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:1429–1434.
- Coates, L., Johnson, G. I., Sardud, U. y Cooke, A.W. 1994. Postharvest diseases of lychee in Australia, and their control. Australian Centre for International Agricultural Research. ACIAR Proceedings. 58:68–69.
- Cooke, R.J., 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 31:53–80.
- Crapisi, A., Lante, A., Pasini, G. y Spettolo, P. 1993. Enhanced microbial cell lysis by the use of lysozyme immobilized on different carriers. *Process Biochemistry*. 28:17–21.
- Datta, R., Armingier, W. y Ollis, SF. 1973. Lysis of *Micrococcus lysodeikicus* by lysozyme covalently immobilized on cellulose and polyacrylamide. *Biotechnology and Bioengineering*. 15:993–1006.
- Darmadji, P. e Izumimoto, M. 1994. Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*. 38:243–254.
- Debeaufort, F., Martin-Polo, M. y Voilley, A. 1993. Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *Journal of Food Science*. 58:426-429.
- Díaz-Sobac, R. 2003. Evaluación de la morfología y permeabilidad al vapor de agua de recubrimientos formulados con polisacáridos para ser aplicados como tratamiento fitosanitario en mango (*Mangifera indica* cv. *Manila*). Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana, México. 81 p.
- Donhowe, I. G. y Fennema, O. 1994. Edible films and coatings: characteristics, formation,

- definitions y testing methods. In: Edible coatings and films to improve food quality. Krochta J. M., E. A. Baldwin., and Nisperos-Carriedo M. O.. (comps). Ed. Technomic Publishing, Lancaster, P. A, pp 1-24.
- Duvenhage, J. A. 1994. Control of postharvest decay and browning of litchi fruit by sodium metabisulphite and low pH dips – an update. Yearbook South African Litchi Growers Association. 6:36–38.
- Duan X., Jiang Y., Su X., Zhang Z. y Shi J. 2007. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit pericarp tissues in relation to their role in the pericarp browning. Food Chemistry. 101:1365–1371.
- Du, J. M., Gemma, H. e Iwahori, S. 1997. Effects of chitosan coating on the storage of peach, Japanese pear, and kiwifruit. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science. 66:15–22.
- Du, Y., Wang, X. y Sun. L. 2004. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. International Journal of Food Microbiology. 95:147– 155.
- Elezi, O., Kourkoutas, Y., Koutinas, A., Kanellaki, M., Bezirtzoglou, E. Barnett, Y. A. y Nigam, P. 2003. Food additive lactic acid production by immobilized cells of *Lactobacillus brevis* on delignified cellulosic material. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51:5285-5289.
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R. y Boulet, M. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. Journal of Food Science. 56:1618–1620.
- El Ghaouth, A., Smilanick, J. y Wilson, C. 2000. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay on apple and citrus fruit. Postharvest Biology and Technology. 19:103-110.
- El Ghaouth, A. y Wilson, C. L. 1997. Bioactive coating for harvested commodities. Patent number 5,633,025.
- El Ghaouth, A., Wilson, C. L., Wisniewski, M., Droby, S., Smilanick, J. L. y Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of citrus fruit. In: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), Biological Control of Crop Diseases. Marcel Dekker Inc., New York, pp. 289–312.
- Enan, G., El-Essawy, A.A., Uyttendaele, M. y Debevere, J. 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. International Journal of Food Microbiology.

30:189–215.

- Fan, Q. y Tian, S. P. 2001. Postharvest biological control of grey mold and blue mold on apple by *Cryptococcus albidus* (Saito) Skinner. *Postharvest Biology and Technology*. 21:341–350.
- FIRA. 2009. Rambután, buena opción de negocio.
http://www.fira.gob.mx/SAS/Docs/Expertos_Opinan/Colaboraciones_2009/23-07-2009%20Rambutan,%20Buena%20Opcion%20de%20Negocio.pdf
- Follet, P. A., Sanxter, S. y Lower, B. 2002. Quarantine treatments for *Cryptophlebia* in Hawaiian lychee and logan. *USDA_ARIS Tropical Fruit*.
- Fu, W. y Mathews, A.P. 1999. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*. 3:163–170.
- Fwu-Long M., Chin-Tsung H., Hsiang-Fa L. y Hsing-Wen S. 2006. Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by a naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:3290-3296.
- Goksungur, Y., M Gunduz, M. y Harsa, S. 2005. Optimization of lactic acid production from whey by *L. casei* NRRL B-441 immobilized in chitosan stabilized Ca-alginate beads. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 80:1282–1290.
- Gontard, N., Duchez, C., Jean-Luis, C. y Guilbert, S. 1994. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*. 29: 39-50.
- Goosen, M. F. A., 1997. Applications and properties of chitosan. In *Applications of chitin and chitosan*. United States of America, Ed. Technomic, pp. 3-21.
- Govender, V., Korsten, L. y Sivakumar, D. 2005. Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases. *South Africa Postharvest Biology and Technology*. 38:57–65.
- Hall, G.M. 2002. Lactic acid bacteria in fish preservation. En: *Safety and quality issues in fish processing*. (H.A. Bremner, edit.). 1st edition. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. England. pp. 330-347,
- Holcroft, D.M. y Mitcham, E.J. 1996. Postharvest physiology of litchi: a review. *Postharvest*

- Biology and Technology. 9:265-281.
- Holmes, G. J. y Eckert, J. W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to postharvest citrus fungicides in California. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*. 89:716-721.
- Falta cita Hong-Kyoon ...Meyers 2002
- Hintze, J. 2007. NCSS and GESS. NCSS, LLC. Kaysville, Utah. www.ncss.com
- Hosseinian F., Li W y Beta T. 2008. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry*. 109:916-924.
- Iyer, C. y Kailasapathy, K. 2005. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. *Journal of Food Science*. 70:18-23.
- Iyer, C., Phillips, M. y Kailasapathy, K. 2005. Release studies of *Lactobacillus casei* strain Shiota from chitosan-coated alginate-starch microcapsules in *ex vivo* porcine gastrointestinal contents *Letters in Applied Microbiology*. 41:493-497.
- Jaramillo-Flores M. E., González-Cruz L., Cornejo-Mazón M., Dorantes-Álvarez G. F., Gutiérrez-López y Hernández-Sánchez. H. 2003. Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia Ficus-Indica*). *Food Science and Technology International*. 9:271-278.
- Janisiewicz, W. J. y Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits *Annual Review of Phytopathology*. 40:411-41.
- Jiang, Y. M. y Li, Y. B. 2000. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*. 73:139-143.
- Jiang, Y., Yao, L., Lichter, A. y Li, J. 2003. Postharvest biology and technology of litchi fruit. *Food, Agriculture and Environment*. 1:76-81.
- Jiang, Y. M., Su, X., Duan, X., Lin, W. y Li, Y. 2004. Anoxia treatment for delaying skin browning inhibiting disease development and maintaining the quality of litchi fruit. *Food Technology and Biotechnology*. 42:131-134.
- Jiang, Y., Jianrong, J. y Jiang, W. 2005. Effects of chitosan coating on shelf life of cold-stored litchi fruit at ambient temperature. *LWT - Food Science and Technology*. 38:757-761.
- Jiang y Fu. 1999. Postharvest browning of litchi fruit by water loss and its prevention by

- controlled atmosphere storage at high relative humidity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*. 32:278-283.
- Jonhson, G. I., Cooke, A. W. y Sardud, U. 2002. Postharvest disease control in lychee. *Acta Horticulturae*. (ISHS) 575:705-715.
- Jongrittiporn, S., Kungsuwan, A. y Rakshit, S. K. 2001. A study on the preservation of fishballs using chitosan. *European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods—EUROCAFT*; 5–7 December 2001; Berlin.
- Kadam, S. y Deshpande, S. S. 1995. Lychee. In: Salunkhe D. K., Kadam S. S. (Eds) *Handbook of fruit science and technology, production, composition, storage and processing*, Dekker, New York, pp. 435-443.
- Kader, A.A. 1993. Modified and controlled atmosphere storage of tropical fruits. In: B.R. Champ, E. Highley and G.I. Johnson (eds) *Postharvest handling of tropical fruits. Proceedings of an International Conference*. Chiang Mai, Thailand, July 1993, ACIAR Pub. No. 50, pp 239-249.
- Kader, A. A. 2006. Rambután (Mamón Chino). *Postharvest Technology Research & Information Center*. University of California, Davis. Disponible en línea en: <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Espanol/rambutan.pdf>
- Kaiser C., Levine J., Wolstenholme B. N. 1995. Vapour heat and low pH dips improve litchi (*Litchi chinensis Sonn.*) pericarp colour retention. *The Journal of the Southern African Society for Horticultural Sciences*. 5: 7-10.
- Knaul, J. Z., Hudson, S. M. y Creber, K. A. M. 1999. Crosslinking of chitosan fibers with dialdehydes: Proposal of a new reaction mechanism. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. 37:1079–1094.
- Kays, J. S. 1991. *Postharvest physiology of perishable plant products*. New York. USA. Editor Kays, J. S. Ed. Van Nostrand Reinhold. West port CT. pp 532.
- Ke, D. y Kader, A. 1992. Potential of controlled atmospheres for postharvest insect disinfestation of fruits and vegetables. *Postharvest News and Information*. 3:31-37.
- Kester, J. J. y Fennema, O. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology*. 48: 47-59.
- Ketsa, S. y Leelawatana, K. 1992. Effect of pre and poststorage acid dipping on browning of lychee fruits. *Acta Horticulturae*. 321:726-731

- Ketsa, S. y Leelawatana, K. 1992. Effect of precooling and polyethylene film liners in corrugated boxes on quality of lychee fruits. *Acta Horticulturae*. 321:742-746.
- Ketsa, S. y Klaewkasetkorn, O. 1995. Effect of modified atmosphere on chilling injury and storage-life of rambutan. *Acta Horticulturae*. 321:726-731.
- Ketsa, S. y Paull, R. E., 2004. The Commercial Storage of Fruits, Vegetables, and Florist and Nursery Stocks., Cap.Rambutan. USDA, ARS. Agriculture Handbook. Number 66. 3 p.
- Kremer-Kohne, S. y Lonsdale, J.H. 1991. Maintaining market quality of fresh litchis during storage. Part 1: Control of browning. *Yearbook South African Litchi Growers' Association*. 3:16–17.
- Krishnan, S., Gowthaman, M. K., Misra, M. C. y Karanth, N. G. 2001. Chitosan-treated polypropylene matrix as immobilization support for lactic acid production using *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 76:461-468.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., Uchiyama, H., 2008. Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 106:381–386.
- Laitila, A., Alakomi, H-L., Raaska, L., Mattila-Sandholm T y Haikar, A. 2002. Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* moulds in vitro and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*. 93:566–576.
- Landrigan, M., Morris, S.C. Eamus, D. y McGlasson,. W.B. 1996. Postharvest water relationships and tissue browning of rambutan fruits. *Scientia Horticulturae*. 66:201-208.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. y Gobbetti M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:4084–4090.
- Lee, J. S., Cha, D. S. y Park, H. J. 2004. Survival of freeze-dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in chitosan-coated calcium alginate microparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:7300-7305.
- Lee H. S. y Wicker L. 1991. Quantitative changes in anthocyanin pigments of lychee fruit during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 40:263-270.
- Li, X. 1996. The use of chitosan to increase the stability of calcium alginate beads with

- entrapped yeast cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 23:269–271.
- Martin-Polo, M., Voilley, A., Blond, G., Colas, B., Mesnier, M. y Floquet, N. 1992. Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 2. Influence of physical state. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 413-418.
- Martínez-Castellanos G., Shirai K., Pelayo-Zaldívar, C., Pérez-Flores, L. J. y Sepúlveda-Sánchez, J. D. 2009. Effect of *Lactobacillus plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Food Microbiology*. 26:444–449.
- McHugh T. H., Avena-Bustillos R. y Krochta J. M. 1993. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*. 58:889-903.
- Mendoza, D.B., Pantastico, E.B. y Javier, F.B.. 1972. Storage and handling of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). *The Philippines Agriculturist* 55:322-332.
- Mohamed, S. y Othman, E. 1988. Effect of packaging and modified atmosphere on the shelf-life of rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Pertanika*. 11:217-228.
- Myong, K., Jeong Hwa, S., Sung-Koo, K., Curtis, L. y Milford, A. 2006. Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *Journal of Food Science*. 71:E119-E124.
- Muy Rangel Ma. D. S/año. Manejo integral poscosecha para incrementar vida de anaquel en litchi: producto fresco y procesado. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Culiacán. Carr. El Dorado, km 5.5 Campo El Diez, Culiacán, Sinaloa.
- Nishi, C., Nakajima, N. y Ikada, Y. 1995. In vitro evaluation of cytotoxicity of diepoxy compounds used for biomaterial modification. *Journal of Biomedical Materials Research*. 29:829-834.
- Nisperos-Carriedo, M. O. 1994. Edible coatings and films based on polysaccharides. In: *Edible coatings and films to improve food quality*. Krochta J. M., E. A. Baldwin and M. O. Nisperos-Carriedo. (eds). Ed. Technomic Publishing, Lancaster, P. A, pp 314-317, 318, 320-322.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. y Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied*

- Microbiology. 86:29-35.
- No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H. y Meyers, S. P. 2002. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International Journal of Food Microbiology*. 74:65– 72.
- O'Hare, T.J. 1992. Rambutan: Postharvest physiology and storage. *Tropical Fruit News*. 26:4-6.
- Olivas, G.I y Barbosa-Cánovas, G. V.; 2005. Edible coatings for fresh-cut fruits. *Critical Reviews in Food Sciences and Nutrition*. 45:657-670.
- Ouattara, B., Simard, R.E, Piette, G., Begin, A. y Holley, R. 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*. 62:139-148.
- Ouwehand, A. C. 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria Microbiology and Functional Aspects* ed. Salminen, S. and von Wright, A. New York: Marcel Dekker. pp. 139–159.
- Owens, J.D. y Mendoza, L.S. 1985. Enzymatically hydrolysed and bacterially fermented fishery products. *Journal of Food Technology*. 20:273-293.
- Pacheco N., Larralde-Corona, C. P., Sepulveda, J., Trombotto, S., Domard, A. y Shirai, K. 2007. Evaluation of chitosans and *Pichia guilliermondii* as growth inhibitors of *penicillium digitatum*, *International Journal of Biological Macromolecules*. 43:20-26.
- Park, S. Y., Marsh, K. S. y Rhim, J. W. 2002. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science*. 67:194-197.
- Park, S. I. y Zhao, Y. 2004. Incorporation of high concentration of mineral or vitamin into chitosan-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 12:1933-1937.
- Park, S. I., Daeschel, M. A. y Zhao, Y. 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films. *Journal of Food Science*. 69:215-221.
- Plascencia-Jatomea M, Viniegra G, Olayo R, Castillo-Ortega MM, y Shirai K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus Niger*. *Macromolecular Bioscience*. 3:582-586.
- Plascencia-Jatomea. 2004. Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana,

México, pp. 7-14.

- Paull, E. P., Chen, N. J. y Deputy, J. 1984. Litchi (*Litchi chinensis*) growth and compositional changes during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 109: 817-821.
- Paull, R.E., Reyes, M.E.Q. y Reyes, M.U. 1995. Litchi and rambutan insect disinfestation: treatments to minimize induced pericarp browning. *Postharvest Biology and Technology*. 6:139–148.
- Pesis, E., Marinansky, R., Zauberman, G. y Fuchs, Y. 1993. Prestorage low oxygen atmosphere treatment reduces chilling injuries in avocado fruit. *HortScience*. 29:1042-1046.
- Petersen, K., Per Vaeggenose, B. N., Lawther, G. M., Olsen, M. B., Nilson, N. H. y Martensen, G. 1999. Potential of biobased materials for food packing. *Trends in Food Science Technology*. 10:52-68.
- Pérez G. F. y Laborde, J. B. M. 1994. Introducción a la fisiología vegetal. Madrid. Ediciones Mundi-prensa pp. 183-186.
- Prasad, S.S. y Bilgrami, R.S. 1973. Investigation on diseases of litchi. III. Fruit rots and their control by postharvest treatments. *Indian Phytopathology*. 26:523–527.
- Prusky, D., Bazak, M. y Ben-Arie, R. 1985. Development, persistence, survival and strategies for control of thiabendazoleresistant strains of *Penicillium expansum* on pome fruits. *Phytopathology*. 75:877–882.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G. y Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 4:1457-1465.
- Rahman, S. 1995. Food properties handbook. Ed. CRC Press LLC. Boca Raton, FL. pp 1-83.
- Reina, L. D., Breidt, F. Jr., Fleming, H. P., y Kathariou, S. 2005. Isolation and selection of lactic acid bacteria as biocontrol agents for nonacidified, refrigerated pickles. *Journal of Food Science*. 70:7-11.
- Rivera-López J., Ordorica-Falomir C. y Wesche-Ebeling P. 1999. Changes in anthocyanin concentration in lychee (*Litchi chinensis Sonn.*) pericarp during maturation. *Food Chemistry*. 65:195-200.
- Rodríguez, H., Trujillo, G R., Rutiaga, Q. O. y Arévalo, K. N. 2004. Optimización de

propiedades fisicomécanicas y de barrera de películas biodegradables. Revista Salud Pública y Nutrición. Disponible en línea en:

http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/especiales/ee-6-2004/resumenes_juany

- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., Di Venere, D., y Salerno, M. 2002. Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science* 67:1862–1867.
- Roth, G. 1963. Postharvest decay of litchi fruit. Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, Department of Agriculture, South Africa, Technical Communications, 11: 1–16.
- Scott, K. J., Brown, B. L., Chaplin, G. R., Wilcox, M. E. y Bain, J. M. 1982. The control of rotting and browning of litchi fruit by hot benomyl and plastic films. *Scientia Horticulturae*. 16:253-262.
- Shah, N. S., y Nath, N. 2007. Changes in qualities of minimally processed litchis: Effect of antibrowning agents, osmo-vacuum drying and moderate vacuum packaging. *LWT - Food Science and Technology*. 41:660-668.
- Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. y Jeon, Y. J. 1999. Food application of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*. 10:37–51.
- Shirai, K., Guerrero, I. y Lara, P. 1996. Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*. 47:125-137.
- Shi-Ping T., Bo-Qiang L., Yong X. 2005. Effects of O₂ and CO₂ concentrations on physiology and quality of litchi fruit in storage. *Food Chemistry*. 91:659–663.
- SIAP SAGARPA. 2009. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consultado en línea: <http://www.siap.gob.mx/ventana.php?idLiga=1043&tipo=1>.
- Sivakumar y Korsten. 2006. Evaluation of the integrated application of two types of modified atmosphere packaging and hot water treatments on quality retention in the litchi cultivar ‘McLean’s Red’. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*. 81:639–644.
- Sivakumar, D., Wijeratnam, W., Wijesundera, R.L.C., Marikar F.M.T y Abeyesekere M. 2000. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Phytoparasitica*. 28:1-8.
- Singh, A., Abidi, A. B. y Srivasta, S. 1987. Variation in quality traits of litchi (*Litchi chinensis sonn.*) cultivars. *Journal of Food Science and Technology*. 24:264-266.

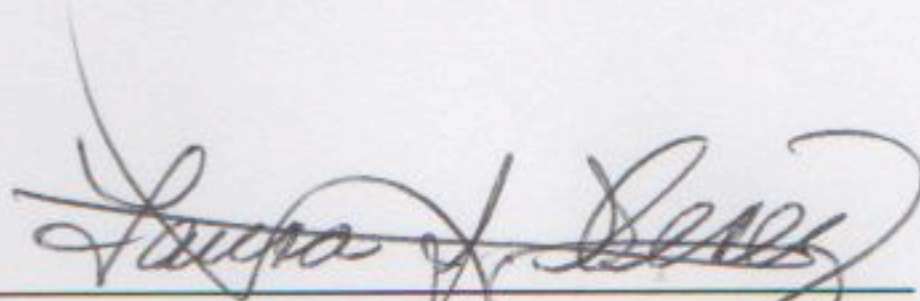
- Smidsrod, O. y Skjak-Braek, G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*. 8:71-78.
- Song, S. H., Cho, Y. H., y Park, J. 2003. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* YIT 9018 using a microporous glass membrane emulsification system. *Journal of Food Science*. 68:95-200.
- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. L. H. y Tasi, C. C. 1999. In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring crosslinking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 10:63-78.
- Suma, K., Misra, M.C. y Varadaraj, M.C. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *International Journal of Food Microbiology*. 40:17-25.
- Swarts, D.H. y Anderson, T. 1980. Chemical control of mould growth on litchis during storage and sea shipment. *Subtropica*. 1:13-15.
- Swarts, D.H. 1983. Post-harvest handling of litchis. *Tech. Bull. L1.1. Citrus Subtrop. Fruit Res. Inst., Nelspruit, South Africa*.
- Swarts, D.H. 1985. Sulfur content of fumigated South Africa litchi fruit. *Citrus and Subtropical Fruit Research Institute, Information Bulletin*, 157, 22-24.
- Tallon, R., Bressollier, P. y Urdaci, M.C. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Research in Microbiology*. 154: 705-712.
- Tanaka, H., Irie, S. y Ochi H. 1989. A novel immobilization method for prevention of cell leakage from the gel matrix. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 68:216-219.
- Thitilertdecha N., Teerawutgulrag A. y Rakariyatham N. 2008. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *LWT - Food Science and Technology*. 20:1-7.
- Tindall, H.D. 1994. Rambutan cultivation. *FAO Plant Production and Protection Paper 121. Food and Agriculture Organisation of the United Nation*.
- Tongdee Sing Ching. s/año. Sulfur dioxide fumigation in postharvest handling of fresh longan and lychee for export. *Postharvest Technology Laboratory, Thailand Institute of Scientific and Technological Research*. 196. Phahonyothin Road, Chatuchak, Bangkok, Thailand.

- Underhill, S. J. R., Bagshaw, J., Prasad, A., Zauberman, G., Ronen, R. y Fuchs, Y. 1992. The control of lychee (*Litchi chinensis sonn.*) Postharvest skin browning using sulphur dioxide and low pH. *Acta Horticulturae*. 321:732-741.
- Underhill S.J.R. 1989. Technology for the manipulation of lychee skin colour. *Proceedings of the Second National Lychee Seminar, Cairns*, 87-88.
- Underhill S. J. R., Gardiner S. y Prasad. A. (s/año). The use of sulfur dioxide and low pH treatment to control lychee (*Litchi sinensis Sonn.*) pericarp browning. *Horticulture Postharvest Group, Queensland Department of Primary Industries, 19 Hercules St, Hamilton, Queensland 4007, Australia*.
- Underhill, S. y C. Critchley. 1994. Anthocyanin decolorisation and its role in lychee pericarp browning. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 34:115-122.
- Underhill, S. y Critchley, C. 1995. Cellular localisation of polyphenol oxidase and peroxidase activity in *Litchi chinensis Sonn.* pericarp. *Australian Journal of Plant Physiology* 22:627-632.
- Vander, P., Varum, K.M., Domand, A., El Gueddari, N.E. y Moerschbacher, B.M. 1998. Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chito oligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. *Plant Physiology*. 118:1353-1359.
- Vescovo. M., Torriani. S., Orsi, C., Macchiarlol, F. and Scolari, G. 1996. Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetables. *Journal of Applied Bacteriology*. 81:113–119.
- Viñas, I., Usall, J. y Sanchis, V. 1991. Tolerance of *Penicillium expansum* to postharvest fungicide treatments in apple packinghouses in Lerida (Spain). *Mycopathologia* 113:15–18.
- Wang, G. H. 1992. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, 55:916–919.
- Watson, B.J. 1988. Rambután cultivars in north Queensland. *Queensland Agricultural Journal*, Jan-Feb. 37-41.
- Wiles, J.L., Vergano, P.J., Barron, F.H., Bunn, J.M. y Testin, R.F. 2000. Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *Journal of Food Science*. 65:1175-1179.
- Willis, R.B.H., Glasson W. B., Graham D., Lee T.H. y Hall E.G. 1989. *Postharvest: An*

- introduction to the physiology and Handling of Fruits and Vegetables. Ed. Van nostrand Reinhold. 163 p.
- Wunwisa, K. K., Bhesh, B. y Hilt, D. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14:737-743.
- Zauberman G., Ronen R., Akerman M. y Fuchs Y. 1989. Low pH treatment protects litchi fruit colour. *Acta. Horticulturae* 269: 309-314.
- Zauberman, G., Ronen, R., Akerman, M., Weksler, A., Rot, I. y Fuchs, Y. 1991. Postharvest retention of the red colour of litchi fruit pericarp. *Scientia Horticulturae*. 47: 89–97.
- Zhang, D. L. y Quantick, P. C. 1997. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 12:195–202.
- Zheng X. y Tian S. 2006. Effect of oxalic acid on control of postharvest browning of litchi fruit. *Food Chemistry*. 96:519–523.
- Zhou, Y., Martins, E., Groboillot, A., Champagne, C.P. y Neufeld, R.J. 1998. Spectrophotometric quantification of lactic acid bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. *Journal of Applied Microbiology*. 84:342-348.

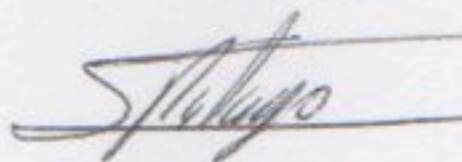
Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, aprobaron la presente tesis denominada: "Uso de bacterias lácticas en recubrimientos de quitosano para la conservación poscosecha de litchi y rambutan" el día 17 de diciembre de 2009.

DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA



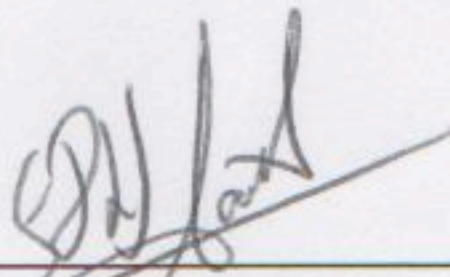
Dra. Laura J. Pérez Flores.

Presidente



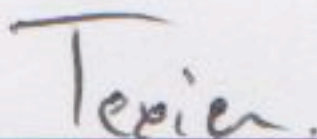
Dra. Clara Pelayo Zaldívar.

Secretario



Dr. Fernando Díaz de León Sánchez.

Sinodal



Dra. Anne-Claire Texier

Sinodal

México. D. F. a 17 de Diciembre de 2009