



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

**MICROENCAPSULACIÓN DE ACEITE DE NEEM EN QUITOSANO,
CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN *IN VIVO***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

I.B.I. Carmen Guadalupe Hernández Valencia

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto

Asesoras:

Dra. Angélica Román Guerrero

Dra. María de Lourdes Yáñez López

Departamento de Biotecnología,
Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

México, D.F., 18 de julio de 2014.

“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNCP) del CONACYT, con la referencia 001465”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto 10 del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de la Secretaría de Ciencia, Innovación y Tecnología del Distrito Federal (PICSO12-152).

México D.F. a 18 de julio de 2014

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

Microencapsulación de aceite de neem en quitosano, caracterización y evaluación *in vivo*.

Que presentó:

I.B.I. Carmen Guadalupe Hernández Valencia

Comité tutorial:

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.
Laboratorio de Biopolímeros.

Asesores:

Dra. Angélica Román Guerrero.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

Dra. María de Lourdes Yáñez López

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

H. Jurado:

Presidente:

Dr. Miquel Gimeno Seco

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México.



Secretario:

Dra. Susana Patricia Miranda Castro

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional
Autónoma de México.



Vocales:

Dra. Angélica Román Guerrero.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de
Biotecnología.



M. en B. Alma Guadalupe Villa Lerma

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de
Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros.



AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por la dirección, confianza, y apoyo siempre brindado. Muchas gracias Doctora por la confianza en mí para la realización de este proyecto.

A la Dra. Angélica Román por la disposición y paciencia prestada a lo largo de todo el trabajo experimental, así como la revisión de este escrito.

Al Dr. Miquel Gimeno, a la Dra. Susana Patricia Miranda y a la M.C. Alma Guadalupe Villa, por sus valiosas observaciones y sugerencias al presente trabajo.

A la Dra. María de Lourdes Yáñez y al proyecto SINAREFI FRU-PIT-13-2, por la aportación de los frutos.

A todos los integrantes del laboratorio T-166, por la ayuda y disposición brindada.

A mis compañeros del laboratorio por el apoyo brindado, especialmente a Liz por las largas jornadas de trabajo, platicas, llantos, risas y sobre todo por tu amistad. A Rosalio, Lidia y Juan por el arduo trabajo en las salidas de campo.

DEDICATORIAS

A mis padres Juan Carlos y Guadalupe, por su cariño, dedicación y porque siempre me impulsaron a superarme como persona.

A mis hermanos Yare y Carlos, por su cariño, locuras, las largas horas de desvelo que compartieron conmigo y sobre todo por su apoyo.

A mis abuelitas Remedios y Julia, por siempre apoyarme y enseñarme que puedo valerme por mi misma.

A Luis por tu apoyo, cariño, palabras de aliento y sobre todo por tu buen humor. Gracias por compartir una etapa más en mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	v
LISTA DE TABLAS	xiv
ABREVIATURAS DE ACRÓNIMOS	xv
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. MARCO TEORICO.....	7
4.1 FRUTOS CLIMATÉRICOS.....	7
4.2 FRUTOS NO CLIMATÉRICOS.....	8
4.2.1 FAMILIA CACTACEAE	8
4.2.2 STENOCEREUS PRUINOSUS (PITAYA).....	8
4.2.2.1 PITAYA EN MÉXICO	11
4.2.2.2 PITAYA EN EL MUNDO.....	11
4.3 STENOCEREUS STELLATUS (XOCONOSTLE DULCE)	11
4.4 PROBLEMAS ASOCIADOS EN LA VIDA POSCOSECHA DE LA PITAYA Y XOCONOSTLE DULCE.....	12
4.4.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO	12
4.4.1 CAMBIO DE COLOR.....	12
4.4.1.1 ESPACIO DE COLOR CIE L*A*B*	13
4.4.1.2 ESPACIO DE COLOR L* C* H	13
4.4.2 CONTAMINACIÓN POR FITOPATÓGENOS	14
4.5 TRATAMIENTOS EMPLEADOS PARA PROLONGAR VIDA POSCOSECHA..	15
4.6 ALTERNATIVAS	15
4.7 MICROENCAPSULACIÓN	16
4.7.1 OBJETIVO DE LA MICROENCAPSULACIÓN.....	16
4.8 ACEITE DE NEEM.....	16
4.9 MICROENCAPSULADOS EN EMULSIONES	17
4.10 EMULSIÓN	18
4.10.1 CLASIFICACIÓN DE LAS EMULSIONES	18
4.10.2 LIBERACIÓN CONTROLADA	18
4.11 ESTABILIDAD DE EMULSIONES	19
4.11.1 DISTRIBUCIÓN Y TAMAÑO DE LA GOTA	21

4.11.2 POTENCIAL ZETA	21
4.12 BIOPOLÍMEROS COMO EMULSIONANTES	23
4.12.1 QUITINA	24
4.12.2 QUITOSANO.....	24
4.12.2 FUNCIONALIZACIÓN DE QUITOSANO.....	26
3.12.3 HIDROXIPROPILMETILCELULOSA (H).....	27
3.12.4 GOMA DE MEZQUITE.....	28
5. JUSTIFICACIÓN.....	29
6. HIPÓTESIS.....	31
7. OBJETIVO GENERAL	31
8. OBJETIVOS PARTICULARES	31
9. MATERIALES.....	32
9.1 DESECHO DE CAMARÓN	32
9.2 OBTENCIÓN DE QUITINA	32
9.3 OBTENCIÓN DE QUITOSANO.....	32
9.4 CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO	32
9.5 MATERIAL PARA EMULSIONES.....	32
9.6 MATERIAL PARA CARACTERIZACIÓN DE EMULSIONES.....	33
9.7 MATERIAL BIOLÓGICO.....	33
10. METODOLOGÍA.....	33
10.1 OBTENCIÓN DE QUITINA	34
10.1.1 PURIFICACIÓN DE LA QUITINA.....	34
10.2 OBTENCIÓN DE QUITOSANO.....	35
10.2.1 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DEL QUITOSANO.....	35
10.2.2 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE ACETILACIÓN DE QUITOSANO.....	36
10.2.2 DETERMINACIÓN DE SOLUBLES.....	36
10.3 BIOPOLÍMEROS	36
10.3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 1.....	37
10.3.1.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO (PFP).....	37
10.4 FASE 1: ENTRAMPAMIENTO DEL ACEITE DE NEEM EN EMULSIONES O/W.....	38
10.4.1 EMULSIONES O/W.....	38
10.4.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	38

10.4.1.1.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA.....	38
10. 4.1.1.2 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA.....	39
10.4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 2	39
10.4.2.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO (PFP)	39
10.4.2.2 ESTABILIDAD DE COLOR EN EL EPICARPIO.....	39
10.4.3 DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BIOPOLÍMEROS PARA EMULSIONES O/W.....	40
10.4.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	40
10.4.3.1.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA.....	40
10. 4.3.1.2 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA.....	40
10.4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 3	40
10.4.4.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO (PFP)	41
10.4.5 DISMINUCIÓN DE CONCENTRACIONES DE BIOPOLÍMEROS EN EMULSIONES O/W	41
10.4.5.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	41
10.4.5.1.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA.....	41
10. 4.5.1.2 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA.....	41
10.4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 4	41
10.4.6.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO (PFP)	42
10.4.6.2 ESTABILIDAD DE COLOR EN EL EPICARPIO.....	42
10.4.6.3 FIRMEZA	42
10.4.6.4 UNIDADES INFECTADAS	42
10.4.6.5 EVALUACIÓN SENSORIAL.....	42
10.5 FASE 2: SUSTITUCIÓN DEL ACEITE DE GIRASOL POR ACEITE MINERAL EN LA FASE DISPERSA DE EMULSIONES O/W	42
10.5.1 USO DE DIFERENTES FASES OLEOSAS.....	42
10.5.1.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	43
10.5.1.1.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA.....	43
10.5.1.1.2 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA.....	43
10.5.1.1.3 TIEMPO DE CREMADO.....	43
10.5.2 PVA COMO COTENSOACTIVO	43
10.5.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	43
10.5.2.1.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA.....	43
10.5.2.1.2 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA.....	43

10.5.2.1.3 TIEMPO DE CREMADO.....	43
10.5.3 USO DE DIFERENTES EMULSIONANTES	43
10.5.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	44
10.5.3.1.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA.....	44
10.5.3.1.2 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA.....	44
10.5.3.1.3 TIEMPO DE CREMADO.....	44
10.5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 5	44
10.5.4.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO (PFP)	44
10.5.4.2 UNIDADES INFECTADAS	44
10.6 FASE 3: ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES	45
10.6.1 PERFIL DE CAMBIOS DE POTENCIAL ZETA	45
10.6.2 GOMA DE MEZQUITE COMO ESTABILIZANTE	45
10.6.2.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	45
10.6.2.1.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA.....	45
10.6.2.1.2 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA.....	45
10.6.2.1.3 TIEMPO DE CREMADO.....	45
10.6.3 USO DE DOS MÉTODOS DE HOMOGENIZACIÓN	46
10.6.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	46
10.6.3.1.1 DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DE GOTA.....	46
10.6.3.1.2 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA.....	46
10.6.3.1.3 TIEMPO DE CREMADO.....	46
10.6.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES ESTABLES	46
10.6.4.1 CINÉTICA DE CREMADO.....	46
10.6.4.2 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN	47
10.6.4.3 CAMBIO DE COLOR DE LA EMULSIÓN.....	47
10.6.4.4 LIBERACIÓN DE AZADIRACTINA	47
10.6.4.5 ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO (ATR-FTIR).....	48
10.6.5 CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS.....	48
10.6.5.1 PREPARACIÓN DE PELÍCULAS	48
10.6.5.2 ACONDICIONAMIENTO	48
10.6.5.3 ESPESOR.....	48
10.6.5.4 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP).....	48
10.6.6 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 6	49

10.6.6.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO (PFP)	50
10.6.6.2 ESTABILIDAD DE COLOR EN EL EPICARPIO.....	50
10.6.6.3 FIRMEZA	50
10.6.6.4 ACIDEZ TITULABLE (ATT).....	50
10.6.6.5 SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES	51
10.6.6.6 UNIDADES INFECTADAS	51
10.6.6.7 CUENTA EN PLACA DE HONGOS	51
10.6.6.8 EVALUACIÓN SENSORIAL.....	51
10.6.6.9 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).....	52
10.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
11.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO	53
11.1.1 FUNCIONALIZACION QUITOSANO- HIDROXIPROPILMETICELULOSA.....	53
11.2 BIOENSAYO 1	54
11.2.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO	54
11.3 FASE 1 ENTRAMPAMIENTO DEL ACEITE DE NEEM EN EMULSIONES O/W.....	55
11.3.1 EMULSIONES O/W.....	55
11.3.2 BIOENSAYO 2.....	57
11.3.2.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO	57
11.3.2.2 COLOR	58
11.3.3 DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BIOPOLÍMEROS PARA EMULSIONES O/W.....	60
11.3.4 BIOENSAYO 3.....	61
11.3.4.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO	61
11. 3.5 DISMINUCIÓN DE CONCENTRACIONES DE BIOPOLÍMEROS EN EMULSIONES O/W.....	62
11.3.6 BIOENSAYO 4.....	63
11.3.6.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO	63
11.3.6.2 COLOR	65
11.3.6.3 FIRMEZA	67
11.3.6.4 UNIDADES INFECTADAS	68
11.3.6.5 EVALUACIÓN SENSORIAL.....	68

11.4 FASE 2: SUSTITUCIÓN DEL ACEITE DE GIRASOL POR ACEITE MINERAL EN LA FASE DISPERSA DE EMULSIONES O/W	71
11.4.1 USO DE DIFERENTES FASES OLEOSAS	71
11.4.2 PVA COMO COTENSOACTIVO	72
11.4.3 USO DE DIFERENTES EMULSIONANTES	73
11.4.4 BIOENSAYO 5	75
11.5 FASE 3: ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES	77
11.5.1 GOMA DE MEZQUITE COMO ESTABILIZANTE.....	78
11.5.2 USO DE DOS MÉTODOS DE HOMOGENIZACIÓN	79
11.5.2.11 HOMOGENEIZADOR ROTOR/ESTATOR	80
11.5.2.2 HOMOGENEIZADOR ULTRASONICACIÓN	80
11.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES	82
11.6.1 CINÉTICA DE CREMADO	82
11.6.2 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN	83
11.6.3. CAMBIO DE COLOR DE LA EMULSIÓN.....	83
11.6.4 LIBERACIÓN DE AZADIRACTINA	83
11.6.5 ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO FTIR-ATR.....	84
11.6.6 PERMEABILIDAD AL VAPOR DE AGUA (WVP).....	86
11.7 BIOENSAYO 6	88
11.7.1 PÉRDIDA FISIOLÓGICA DE PESO	88
11.7.2 COLOR	89
11.7.3 FIRMEZA	91
11.7.4 UNIDADES INFECTADAS.....	91
11.7.5 PH.....	92
11.7.6 SÓLIDOS SOLUBLES TOTALES (SST) Y ACIDEZ TOTAL TITULABLE (ATT)	93
11.7.7 CUENTA EN PLACA DE HONGOS	94
11.7.8 ANÁLISIS SENSORIAL.....	94
11.7.8 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO	96
12. CONCLUSIONES.....	100
13. PERSPECTIVAS	101
14. TRABAJOS PRESENTADOS.....	102
15. BIBLIOGRAFÍA.....	103

LISTA DE FIGURAS

Fig. 4. 1 Variedades de Pitaya de acuerdo a los colores de mesocarpio y epicarpio (Yáñez et al., 2009).....	10
Fig. 4. 2 Relación de CIE L*a*b* con L* C* h (Boscarol, 2007)	14
Fig. 4. 3 Estructura de Azaridactina (Schaaf et al. 2000).....	17
Fig. 4. 4 Procesos de desestabilización de emulsiones (McClements, 2004).....	20
Fig. 4. 5 Tipos de distribución de gota en una emulsión (McClements, 2004).....	21
Fig. 4. 6 La doble capa y potencial zeta (Pérez, 2009).....	22
Fig. 4. 7 Estructura de la quitina (Marmol et al., 2011).	24
Fig. 4. 8 Estructura de quitosano (Marmol et al., 2011).....	25
Fig. 4. 9 Estructura de HMPC (Sánchez et al., 2010).....	28
Fig.11.1 Espectro ¹ H RMN del quitosano.....	53
Fig. 11. 2 Reacción de funcionalización de Q, H, ácido cítrico y NaH ₂ PO ₄ . Donde R es H. CH ₃ o CH ₂ CH(OH)CH ₃ (Nicio, 2011)	54
Fig. 11. 3 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.....	55
Fig. 11. 4 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.....	57
Fig. 11. 5 Cambio de color en los frutos con los tratamientos y el control del bioensayo 2.	59
Fig. 11. 6 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.....	61
Fig. 11. 7 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.....	64
Fig. 11. 8 Cambio de color en los frutos con los tratamientos y el control del bioensayo 4.	66
Fig. 11. 9 Firmeza de los frutos control y recubiertos. Letras diferentes indican diferencia significativa (p<0.05) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.....	67






Fig. 11. 10 Evaluación sensorial a los 6 d y 11 d de <i>Stenocereus pruinosus</i> . Símbolos Control (); Q5g/L(); Q10g/L(); NGQ-g-H 5g/L(); NGQ-g-H 10g/L().	70
Fig. 11. 11 Micrográficas de la polidispersidad de las emulsiones (100x) usando PVA como cotensoactivo.	73
Fig. 11. 12 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.	75
Fig. 11. 13 Fotografías de tratamientos NMQ-g-H 5g/L al inicio y final del bioensayo.	76
Fig. 11. 14 Unidades infectadas por hongos a 12 días de la aplicación	76
Fig. 11. 15 Perfil de cambios del potencial zeta de Q, GM y Q-g-H a diferentes pH.	78
Fig. 11. 16 Micrográficas de la polidispersidad de las emulsiones (100x).	81
Fig. 11. 17 Cinética de cremado de la emulsión a lo largo del tiempo.	82
Fig. 11. 18 Cambio de tono representado por el ángulo de Hue (h) de la emulsión a lo largo de 20 d	83
Fig. 11. 19 Liberación de Azadiractina por efecto de pH a lo largo de 20 d, donde las letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.5$)	84
Fig. 11. 20 Espectros infrarrojo FTIR-ATR de N, Emulsión, Q y GM, para observar la presencia de azadiractina al inicio del bioensayo de liberación.	85
Fig. 11. 21 . Espectros infrarrojo FTIR-ATR de Emulsión, a diferentes pH para observar la presencia de azadiractina al final del bioensayo de liberación.	86
Fig. 11. 22 Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas de Q, NMQGM y GM en gradiente de humedad relativa (HR): a)HR 75/30 y b) HR 30/75. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.	87
Fig. 11. 23 . PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD	89
Fig. 11. 24 Cambio de color en los frutos con los tratamientos y el control del bioensayo 6.	90

Fig. 11. 25 Firmeza de los frutos con el control y los tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.	91
Fig. 11. 26 pH de los frutos con el control y los tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.....	92
Fig. 11. 27 Relación SST/ATT de los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.....	93
Fig. 11. 28 Cuenta de hongos en el epicarpio de los frutos tratados y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD	94
Fig. 11. 29 Evaluación sensorial a los 0 d y 8 d de <i>Stenocereus pruinosus</i> , Símbolos Control(—◆—); Q2.5g/L(—■—); Q5g/L(—▲—); NMQ-g-H 5g/L(—✱—); NMQGM 5g/L(—✱—); GM(—●—); QC5g/l(—+—).....	96
Fig. 11. 30. Micrografías electrónicas de recubrimientos al inicio del bioensayo a) Control (200X), b)Espina (25X), c) Q2.5g/L d) Q5g/L, e)QC5g/L, f)GM5g/L (100X); g)NMQGM 5g/L, h) NMQ-g-H 5g/L (1000X)	98
Fig. 11. 31 Micrografías electrónicas de recubrimientos al inicio del bioensayo (12d); i) Q5g/L (100X), j) NMQ-g-H 5g/L (1000X).....	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 11. 1 Resumen de la estabilización de emulsiones O/W	56
Tabla 11. 2 Resumen de la estabilización de emulsiones a diferentes concentraciones de biopolímeros	60
Tabla 11. 3 Resumen de la estabilización de emulsiones con concentraciones bajas de biopolímeros	62
Tabla 11. 4 Unidades infectadas por hongos	68
Tabla 11. 5 Resumen de la estabilización de emulsiones usando diferentes fases oleosas	71
Tabla 11. 6 Resumen de la estabilización de emulsiones con PVA como cotensoactivo	72
Tabla 11. 7 Resumen de la estabilización de emulsiones usando diferentes emulsionantes	74
Tabla 11. 8 Micrografías de la polidispersidad de las emulsiones (100x) usando diferentes emulsionantes.....	74
Tabla 11. 9 Resumen de la estabilización de emulsiones usando GM como estabilizante	79
Tabla 11.10 Resumen de la estabilización de emulsiones a diferentes pH por homogeneizador rotor/estator (Ultraturrax).....	80
Tabla 11.11 Resumen de la estabilización de emulsiones a diferentes pH por Ultrasonido	81
Tabla 11. 12 Unidades infectadas por hongos a los 7 y 12d	92

ABREVIATURAS DE ACRÓNIMOS

B-Q	Biológico - Químico
Q	Quitosano
H	Hidroxipropilmetilcelulosa
N	Aceite de neem
GM	Goma de mezquite
Q-g-H	Quitosano funcionalizado
E. Neem	Emulsión de neem
NG	Aceite de neem – Aceite de girasol
NM	Aceite de neem – Aceite mineral
NGQ	Emulsión de aceite de neem-aceite de girasol-quitosano
NGH	Emulsión de aceite de neem-aceite de girasol-hidroxipropilmetilcelulosa
NGQ-g-H	Emulsión de aceite de neem-aceite de girasol-quitosano funcionalizado
NGQH	Emulsión de aceite de neem-aceite de girasol-quitosano- hidroxipropilmetilcelulosa
NMQ-g-H	Emulsión de aceite de neem-aceite mineral- quitosano funcionalizado
NMQGM	Emulsión de aceite de neem-aceite mineral- quitosano-goma de mezquite
W/O	Agua-en-aceite
O/W	Aceite-en-agua
O/W/O	Aceite-en-agua-en-aceite
W/O/W	Agua-en-aceite-en-agua
h	Horas
min	Minutos
d	Días

DA	Grado de acetilación
M _V	Peso molecular promedio viscosimétrico
ϕ	Fracción másica dispersa
PVA	Alcohol polivinílico
EE	Eficiencia de encapsulamiento
L*	Luminosidad
C*	Cromaticidad
<i>h</i>	Ángulo de Hue o tono
HR	Humedad relativa
WVP	Permeabilidad al vapor de agua
VTVA	Velocidad de transmisión de vapor de agua
PFP	Pérdida fisiológica de peso
ATT	Acidez total titulable
SST	Sólidos solubles totales
PDA	Papa agar dextrosa
SEM	Microscopia electrónica de barrido

1. RESUMEN

La pitaya (*Stenocereus pruinosus*) y el xoconostle dulce (*Stenocereus stellatus*) son frutos endémicos de México, cuya distribución es local debido a lo perecedero de los frutos, por lo que el objetivo de la siguiente investigación fue aplicar recubrimientos biopoliméricos con actividad antimicrobiana para extender la vida poscosecha de los frutos. El quitosano (Q) fue obtenido mediante desacetilación termoquímica heterogénea a partir de quitina extraída de una fermentación láctica de desperdicios de camarón. La preparación y caracterización de recubrimientos se alternaron con la aplicación *in vivo* debido a que los frutos son estacionales, por lo que no estaban disponibles todo el año.

En la primera fase, los recubrimientos biopoliméricos fueron evaluados solos o con la combinación de aceite de neem (N), este último en emulsiones tipo aceite en agua (O/W), donde la fase oleosa estuvo conformada por mezcla de aceite de neem-aceite de girasol (NG). A pesar de que los sistemas no fueron estables se aplicaron sobre pitayas. De acuerdo con los resultados obtenidos, las pitayas con epicarpio de color rojo, fueron más perecederas que las pitayas de epicarpio de color verde, así como el almacenamiento a temperatura ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) no logró perdurar la vida poscosecha. Las mejores condiciones se alcanzaron a temperatura de refrigeración ($10\pm 5^{\circ}\text{C}$) con frutas recubiertas con Q nativo y la emulsión NGQ-g-H ambos a 5g/L. Estas formulaciones fueron capaces de disminuir la PFP, porcentaje de unidades infectadas, sensorialmente conservaron su sabor, pulpa y apariencia general. Sin embargo, NGQ-g-H mostro un oscurecimiento en el epicarpio debido posiblemente al efecto prooxidante del aceite de girasol. Cabe mencionar que la aplicación de este bioensayo, se realizó en campo en huertos del municipio de Santa Gertrudis Cosoltepec en el estado de Oaxaca.

En la segunda fase de la experimentación se sustituyó el aceite de girasol por aceite mineral grado alimenticio (M), se evaluaron los recubrimientos sobre xoconostle dulce, obteniendo de manera consistente que el Q nativo y NMQ-g-H ambos a 5g/L lograron disminuir la PFP y se eliminó el efecto de prooxidación; sin embargo las emulsiones no fueron estables.

En la fase tres, se caracterizó cada componente de la formulación de las emulsiones con la finalidad de estabilizarlas. El Q-g-H produjo una baja estabilidad porque el potencial zeta fue cercano a cero, por lo que se decidió emplear el Q nativo y usar goma de mezquite (GM) como emulsionante. La reformulación permitió el obtener un sistema estable (NMQGM), por lo que se caracterizaron las condiciones de liberación de N. Se aplicaron los recubrimientos Q, quitosano comercial (QC), GM, NMQ-g-H y NMQGM sobre pitaya. Se obtuvo que el Q nativo y NMQ-g-H (5g/L) lograron disminuir la PFP, unidades infectadas y NMQ-g-H fue catalogada como la de mayor preferencia por el consumidor de acuerdo con el análisis sensorial. No obstante la estabilidad lograda con la emulsión NMQGM no se prolongó la vida poscosecha de los frutos, debido a que la GM fue susceptible a contaminaciones fúngicas. En este bioensayo se comparó QC y Q determinándose que los frutos recubiertos con Q presentaron mayor actividad antimicrobiana, menor pérdida fisiológica de peso, mayor firmeza y mayor aceptación sensorial, que aquellos frutos recubiertos con QC.

2. ABSTRACT

The pitaya (*Stenocereus pruinosus*) and sweet xoconostle (*Stenocereus stellatus*) are endemic fruits of Mexico with local distribution, due to their perishability and microbial decay. Therefore the objective of this work was the evaluation of biopolymer coatings for extending postharvest life and microbial inhibition. Chitosan (Q) was obtained by thermochemical heterogeneous deacetylation from chitin extracted by lactic acid fermentation of shrimp wastes. Coatings preparation and characterization were alternated with *in vivo* application because the fruits were not available through all the year of experimental work.

In the first stage, the biopolymer coatings were tested alone or with combination of neem oil (N), the latter in oil-water emulsions (O/W), where the oil phase consisted of mixture of neem oil-sunflower oil (NG). In spite of none of the dispersed systems were stable, the coatings were applied onto pitayas. According with the results, pitayas with red epicarp were more perishable than pitayas with green epicarp, as well the storage at room temperature ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) did not extend the postharvest life. The best conditions were achieved at low temperature ($10\pm 5^{\circ}\text{C}$) with fruits coated with Q native and NGQ-g-H emulsion both at 5g/L. These formulations were able to decrease PFP, percentage of infected units, retained sensory attributes such as flavor, pulp and overall appearance. However, pitaya treated with NGQ-g-H showed browning in the epicarp, this might be due to pro-oxidant effect of sunflower oil. It is noteworthy that the application was performed in orchards in Santa Gertrudis Cosoltepec in the state of Oaxaca.

In the second stage of experimentation sunflower oil was substituted for food grade mineral oil (M) in coatings and evaluated on sweet xoconostle, Q, NMQ-g-H were consistently able to decrease PFP and epicarp oxidation were not observed; however the emulsions were not stable.

In stage three, each component of the formulation was characterized in order to stabilize emulsions. The Q-g-H produced low stability because the zeta potential was close to zero, so it was decided to use the Q and mesquite gum (GM) as an emulsifier. The reformulation allowed obtaining a stable system (NMQGM), thus with this coating release conditions of N were determined. N, Q, commercial chitosan (QC), GM, NMQ-g-H and NMQGM were applied on pitayas. Q and NMQ-g-H (5g/L) minimized the

PFP and infected units, while NMQ-g-H was preferred by the consumer according to the sensory analysis. Notwithstanding, the stability achieved with the emulsion NMQGM, postharvest life of the fruit was not extended, because the GM was susceptible to fungal contamination. In this bioassay were compared QC and Q, in which coated fruits with Q had higher antimicrobial activity, lower physiological loss of weight, increased strength and greater sensory acceptance than that coated fruits with QC.

3. INTRODUCCIÓN

Los productos hortofrutícolas son alimentos básicos en la dieta humana, sin embargo se estima que existe pérdida en cantidad y calidad entre la cosecha y el consumo, siendo entre 5 - 25% para países desarrollados y de 20 - 50% en países de economía emergente (FAO, 2012).

México que es un país rico en vegetación por lo tanto también en productos hortofrutícolas; sin embargo muchos son altamente perecederos, tal es el caso de la pitaya (*Stenocereus pruinosus*) y el xoconostle dulce (*Stenocereus stellatus*), ya que estos aunado a su morfología y estructura, pierden fácilmente sus parámetros de calidad y son susceptibles de contaminación microbiana en un tiempo muy corto (Liou *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2004). Después de la cosecha en general, el acomodo de los frutos es en cajas de madera por lo que sus espinas perforan el epicarpio de los frutos contiguos, provocando así la exposición de sus azúcares y haciéndolos susceptibles a contaminaciones, lo que trae como consecuencia que los frutos tengan una vida poscosecha de 3 a 5 días a temperatura ambiente (Armella, 2003; Gervacio, 2005).

Por lo que su distribución comercial es a nivel local, en la actualidad no existen propuestas para la conservación de estos frutos a escala comercial, debido a que además de su alta perecibilidad, son frutos estacionales, la pitaya tiene una época de producción de abril a junio, mientras que el xoconostle dulce lo tiene septiembre a octubre.

A ambos frutos se les ha atribuido usos medicinales típicos de las cactáceas, ya que mejoran el funcionamiento del sistema digestivo, reducen las posibilidades de cáncer y ataques al corazón, además las pitayas son consideradas como alimentos neutracéuticos debido a que poseen actividad antioxidante (García *et al.*, 2013).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue proponer una alternativa para prolongar la vida poscosecha de estos frutos mediante la aplicación de recubrimientos biopoliméricos con actividad antimicrobiana.

La siguiente investigación esboza sobre la información actual de recubrimientos para prolongar la vida poscosecha de frutos, así como las características de la pitaya y

xoconostle dulce, en base a ello se propusieron recubrimientos biopoliméricos, por lo que se emplearon quitosano, hidroxipropilmetilcelulosa y goma de mezquite nativos o como matrices que permitieron entrapar aceite de neem en emulsiones O/W. Debido a la época de producción de ambos frutos, se aleatorizaron los experimentos de caracterización de emulsiones y aplicación a los frutos, descartando tratamientos en base a los resultados obtenidos en cada fase *in vivo* y se reformularon los tratamientos que permitieron evaluar el efecto antimicrobiano y la capacidad de barrera frente a factores ambientales con el objeto de determinar si los recubrimientos fueron o no capaces de conservar las características de calidad de los frutos.

4. MARCO TEORICO

Los alimentos perecederos son aquellos que inician su descomposición de manera rápida y sencilla. Este deterioro está determinado por factores como la temperatura, la presión o la humedad. Las frutas y verduras son en general los alimentos más perecederos, sin embargo su consumo en fresco según la OMS y la FAO en 2012 es benéfico, ya que los seres humanos debemos tener ingesta de un mínimo de 400 g diarios de frutas y verduras para prevenir enfermedades crónicas como las cardiopatías, el cáncer, la diabetes o la obesidad, así como para prevenir y mitigar varias carencias de micronutrientes, sobre todo en los países menos desarrollados. En México, la producción hortofrutícola es una industria competitiva a nivel mundial, debido en parte a la amplia diversidad de climas, sin embargo, existe insuficiencia de abasto de productos para la población de nuestro país (Siller, 1999), debido principalmente a problemas como la pérdida de agua y la contaminación por fitopatógenos, que influyen directamente sobre la calidad poscosecha de los mismos.

Los frutos se pueden clasificar en dos grandes grupos según su patrón de actividad respiratoria, en climatéricos y no climatéricos.

4.1 FRUTOS CLIMATÉRICOS

Los frutos climatéricos exhiben un gran incremento en la tasa respiratoria en la parte final de la maduración, este periodo es llamado climaterio respiratorio. 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 pico climatérico y posteriormente la respiración disminuye en el periodo post climatérico o de senescencia (Kays, 1991). También se caracterizan porque la síntesis de etileno se incrementa en respuesta a la exposición de bajos niveles de esta hormona (proceso denominado producción autocatalítica de etileno) (Martínez, 2009; Jordán y Casaretto, 2006).

4.2 FRUTOS NO CLIMATÉRICOS

Los frutos no climatéricos mantienen una tasa respiratoria relativamente baja, pero constante durante la maduración de consumo (Kays, 1991), evitando la presencia del climaterio respiratorio. Dentro de estos frutos, se encuentran la mayoría de los frutos de la familia *Cactaceae* como la pitaya y el xoconostle dulce, algunos de los cuales son considerados como frutos exóticos.

4.2.1 Familia *Cactaceae*

Las cactáceas son una familia vegetal originaria del continente americano, que cuenta con 110 géneros y 1500 especies aproximadamente. De esta cantidad, aproximadamente 52 géneros y 850 especies se encuentran en nuestro país, lo que coloca a México como el país con mayor variedad y riqueza de cactáceas a nivel mundial. Más aún, en México se presenta un elevado grado de endemismo, con 18 géneros (35%) y 715 especies (85%) exclusivas de nuestro país. Las cactáceas son fanerógamas y dicotiledóneas, es decir, producen flores, frutos y semillas, presentan flores bisexuadas (en algunos casos unisexuadas), y la mayoría de ellas requieren de fecundación cruzada para producir semillas aunque algunas especies son auto-fértiles, tal vez la característica predominante es que resisten condiciones de sequía (Mayen, 2012).

En México la familia *Cactaceae* se distribuye en casi toda la República Mexicana, desde la Península de Baja California, en la vertiente del Pacífico desde Sonora hasta Chiapas y en la vertiente del Golfo de México, desde Veracruz hasta Tamaulipas, siendo más abundante al sur y sureste del Eje Volcánico Transversal (Ramírez, 2007). Algunas de las cactáceas de este familia, son las que pertenecen al género *Stenocereus*, en este estudio son *Stenocereus pruinosus* y *Stenocereus stellatus*.

4.2.2 *Stenocereus pruinosus* (Pitaya)

Stenocereus pruinosus es una cactácea cuyo fruto es comúnmente conocido como pitaya, es nativo de México, y últimamente ha ganado popularidad en nuestro país y en

algunos países de Asia. Tiene una época de producción en los meses de abril a junio, con un pico de producción en el mes de mayo.

A *Stenocereus pruinosus* se le ha atribuido usos medicinales. Fracciones licuadas de tallos son utilizadas para el tratamiento de afecciones de los riñones, la eliminación de amibas, para calmar el dolor de cabeza y el cansancio de los pies, lavarse el cabello y eliminar la caspa; también se aplica como desinfectante y para el tratamiento de llagas, tumores de la piel y para disminuir los niveles de glucosa en sangre según los pobladores de Ocotlan, Jalisco. Con las flores se preparan infusiones que sirven como tónico cardíaco. Con respecto al fruto (pitaya), el consumo en ayunas de la pulpa es eficaz para el tratamiento de la gastritis y también contribuye al buen funcionamiento del sistema digestivo, pues evita los cólicos y dolor abdominal; también se ha incorporado a un nuevo sistema de tratamiento naturista basado en frutas, para tratar diversas enfermedades y problemas de belleza, al que se denomina frutoterapia (Reyes, 1995). También cuentan con una gran cantidad de pigmentos rojos del grupo de la betalainas y betaxantinas, que tienen propiedades antioxidantes y que disminuyen las probabilidades de formación de cáncer y ataques del corazón (Ramírez, 2007; Pelayo, 2010).

La pitaya es un importante recurso genético vegetal, con amplia distribución y variación; también son un nuevo cultivo con gran potencial para el desarrollo agrícola y económico de amplias áreas de México, América Central y América del Sur (Benzing, 1990; Britton y Rose, 1963; Haber, 1983; Rodríguez, 1999). La importancia y el potencial de la pitaya radican en su gran variabilidad genética, su adaptabilidad a condiciones ambientales diversas, sus múltiples usos, sus posibilidades de industrialización, productividad, rentabilidad y demanda en los mercados regionales e internacionales.

Rosales *et al.* (2008), clasifican 15 variantes de frutos evaluadas mediante 41 atributos de tallo, flor y fruto. El primer grupo se integra por las variantes productoras de frutos de mayor tamaño y peso (Negra, Agría y Cántaro), sus flores y ovarios también presentan las dimensiones mayores, lo cual puede sugerir una determinación genética; aunque sus tallos presentan menor número y mayor altura de costillas. El segundo grupo incluye al cultivar Copal, que se caracteriza por su elevado número y longitud de espinas en el tallo

y frutos con alto contenido de semillas no muy grandes, además por su fructificación temprana y rápido crecimiento vegetativo. El tercer grupo se integra por las variantes pequeñas, no muy populares (Borrega, Hormiga, Masuda, de Monte II, Amarilla-canario) y considerados de menor calidad. El cuarto grupo está integrado por la variante Señora, cuyas principales características son sus pocas y cortas espinas del tallo y fruto. El quinto grupo está conformado por las variantes que presentan pesos y tamaños intermedios (Amarilla, Acateca, Chico, Roja-largucha y de monte), así como un número bajo de areolas en el fruto.

Yáñez *et al.* (2009), clasifican a las pitayas en siete variedades de acuerdo a los colores de su mesocarpio (pulpa), y al color de su epicarpio (piel).







Variedad	Color de mesocarpio	Color de epicarpio	Fotografía
Amarilla I y II	Amarillo	Verde	
Melón	Anaranjado	Verde	
Sandía	Rosa	Verde	
Solferino	Rojo oscuro	Rojo	
Olla	Purpura	Rojo	
Roja lisa	Rojo	Rojo	

Fig. 4. 1 Variedades de Pitaya de acuerdo a los colores de mesocarpio y epicarpio (Yáñez *et al.*, 2009).

4.2.2.1 Pitaya en México

La pitaya en México crece en forma silvestre en 20 estados de la República, aunque sólo se cultiva con fines comerciales en varias regiones de Tabasco, Yucatán, Campeche, Oaxaca, Veracruz, Puebla, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Baja California (SAGARPA, 2001) para el 2010, *Stenocereus* tuvo una producción en México de 3,428 ton (SINAREFI, 2012).

4.2.2.2 Pitaya en el Mundo

Las pitayas del género *Stenocereus*, se puede decir que sólo en México se explotan, ya sea como recolección de las áreas naturales, como cultivo de huertas de traspatio o huertas comerciales. Recientemente en Israel, buscando materiales vegetales han estado investigando especies de este género con el propósito de explotarlo comercialmente. Por esto, se puede considerar que hasta el momento, México no cuenta con países competidores en el mercado de las pitayas. Sin embargo, existe un tipo de pitaya sin espinas, llamada pitahaya o fruta dragón (*Hylocereus spp.*), que podría ser competitivo con los frutos de *Stenocereus* (Haber, 1983; SAGARPA, 2001).

4.3 *Stenocereus stellatus* (Xoconostle dulce)

Stenocereus stellatus es una cactácea columnar mejor conocida como Xoconostle dulce o tunillo, nativa de las zonas áridas y semi-áridas del centro de México, principalmente en los estados de Puebla, Oaxaca, Guerrero y Morelos. Tiene una época de producción en los meses de septiembre a octubre.

Estudios etnobotánicos previos entre los Nahuas y Popolocas del Valle de Tehuacán (Casas y Valiente, 1995) y entre los Nahuas y Mixtecos de la región de la Montaña de Guerrero (Casas *et. al.*, 1994), permitieron observar que esta cactácea es utilizada como planta comestible, principalmente por sus frutos. Estos frutos son recolectados en poblaciones silvestres y cosechados en plantaciones, tanto para el autoconsumo como para su comercialización en los mercados regionales. Los frutos presentan una pulpa dulce y jugosa y tienen gran demanda como fruta fresca (Casas y Caballero, 1996), sin

embargo, estas frutas son poco conocidas debido a que enfrentan problemas de estabilidad y una corta vida de anaquel. En este rubro no existen estudios sobre la prolongación de su vida poscosecha.

4.4 PROBLEMAS ASOCIADOS EN LA VIDA POSCOSECHA DE LA PITAYA Y XOCONOSTLE DULCE

Entre los problemas asociados a la senescencia de ambos frutos son la pérdida de agua (que conlleva a la pérdida de peso), cambios de color del epicarpio, la contaminación con fitopatógenos y deterioro en la percepción sensorial de los frutos.

4.4.1 Pérdida fisiológica de peso

Al mismo tiempo que ocurre la respiración, los frutos cosechados pierden agua hacia la atmosfera, tal como lo hacía antes de la cosecha, por un proceso conocido como transpiración. La atmósfera interna de frutas está saturada con vapor de agua, pero a la misma temperatura el aire del medio circundante esta menos saturado, por lo que existe un gradiente a lo largo del cual el vapor de agua se mueve desde el fruto al medio que lo rodea. La pérdida de agua causa una disminución significativa del peso y a medida que avanza, disminuye la apariencia y elasticidad del producto perdiendo su turgencia, es decir, se vuelve blando y marchito, por lo que esto es un factor determinante en la vida de poscosecha del producto. (FAO, 2012).

4.4.1 Cambio de color

El color es uno de los parámetros más importantes para determinar la calidad de los frutos, ya que con ello podemos considerar cambios globales de color en su vida poscosecha. El color es una función de la luz que radia al producto, la reflexión diferencial de ciertas longitudes de onda y la percepción visual de aquéllas longitudes de onda. El color percibido se debe a la absorción de ciertas longitudes de onda y la reflexión de otras en la región visible del espectro electromagnético (380-760nm) (Bosquez, 1992). El color depende de la aptitud para distinguir cambios de luz

(eficiencia), del observador y de las características de la iluminación y reflectancia espectral de la sustancia problema (Lees, 1980).

*La CIE (Commission Internationale de l'Eclairage', que en Inglés es la 'Comisión Internacional de la Iluminación") es una organización científica encargada de la ciencia y el arte de la iluminación, por lo tanto toda la gama cromática la clasifica espacios de color, los más usados son CIE L*a*b* y CIE L* C* h (Boscarol, 2007).*

4.4.1.1 Espacio de color CIE L*a*b*

Este espacio de color distingue tres parámetros el primero es el brillo (L^*) que es la medida de la luminosidad; es decir, indica la claridad/oscuridad de cada color o matiz. Este valor se logra mezclando cada color con blanco o negro y la escala varía de 0 (negro puro) a 100 (blanco puro) (Boscarol, 2007).

El segundo es a^* es la gama de color de verde ($-a$) a rojo ($+a$). Mientras, que el tercero es b y es la gama de color de azul ($-b$) a amarillo ($+b$) (Boscarol, 2007) (Fig. 4.2b).

4.4.1.2 Espacio de color L* C* h

Este espacio de color, también distingue tres parámetros el primero es el brillo o luminosidad (L^*) al igual que el CIE L*a*b* pero hace una relación de las gamas a^* y b^* conocidas como h (ángulo de hue) y C^* (Croma), dicha relación se observa matemáticamente como lo muestra la Fig. 4.2a.

a)

$$C = (a^2 + b^2)^{1/2}$$

$$h = \arctan (b/a)$$

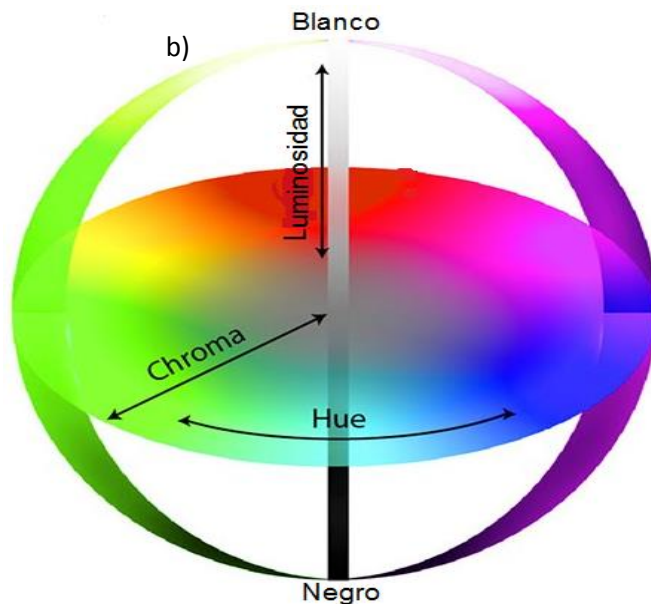


Fig. 4. 2 Relacion de CIE L*a*b* con L* C* h (Boscarol, 2007)

Por lo que el matiz o ángulo de hue (h) es el color que relaciona la longitud de onda de la radiación que produce la estimulación óptica. Por lo que h es el ángulo del tono, y se expresa en grados que van de 0° (inclusive) a 360° (excluido). La saturación, intensidad o croma (C^*) es la pureza del color respecto al gris o bien puede considerarse como el grado de dilución con el blanco (Fig. 4.2b) (Boscarol, 2007).

4.4.2 Contaminación por fitopatógenos

La pitaya y el xoconostle dulce tienen un manejo complicado, principalmente es debido a que las espinas de estos frutos pueden perforar la piel de los frutos vecinos (Yáñez, 2009), facilitando el ataque de hongos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Helminthosporium*, *Fusarium*, *penicillium*, *Botrytis cinerea*. y *Botryosphaeria dothidea* Moug (Chi, 1998; Liou *et al.*, 2001; Valencia *et al.*, 2004). Con ello se reduce la posibilidad de comercialización tanto nacional como internacional.

El deterioro de poscosecha producido por hongos en los frutos frescos causa daños físicos y aumenta la pérdida de agua. La contaminación por hongos puede provenir de cortes en la superficie o puntos de abscisión naturales o por la penetración de patógenos al producto. Durante el almacenamiento, los frutos envejecen y los tejidos se debilitan por una degradación gradual de la estructura e integridad celular. Los frutos en este

estado son menos capaces de soportar la invasión, produciéndose la infección por organismos patógenos, es decir, la infección está latente (FAO, 2012).

4.5 TRATAMIENTOS EMPLEADOS PARA PROLONGAR VIDA POSCOSECHA

En la actualidad no existen alternativas para prolongar la vida poscosecha de ambos frutos, por lo que basados en la similitud de estos frutos con otros de la misma familia *Cactácea* como la tuna o la pitahaya se ha propuesto mantenerlos a temperaturas de refrigeración en un rango entre 5 y 12°C lo que prolonga su vida poscosecha (Pinedo *et al.*, 2010; Magaña *et al.*, 2004).

4.6 ALTERNATIVAS

El desarrollo de recubrimientos comestibles aplicados a productos hortofrutícolas frescos ha generado recientes avances respecto al efecto sinérgico de los componentes sobre la vida de anaquel de dichos alimentos (Quintero *et al.*, 2010).

Un recubrimiento comestible se define como una matriz continua, ultradelgada, que se encuentra alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento (Quintero *et al.*, 2010). Estos poseen propiedades mecánicas, generan efecto barrera frente al transporte de gases y, pueden adquirir diversas propiedades funcionales dependiendo de las características de las sustancias encapsuladas y formadoras de dichas matrices (Vásquez *et al.*, 2009).

Los recubrimientos pueden estar conformados por un polisacárido, un compuesto de naturaleza proteica, lipídica o por una mezcla de los mismos (Krochta *et al.*, 1994). Tal es el caso del aceite de neem y el quitosano, este último es un derivado de la quitina, y que ha sido ampliamente usado como recubrimiento en alimentos debido a su efecto antimicrobiano, mientras que el aceite es usado ampliamente como biopesticida, sin embargo este es de difícil aplicación, aunado a que genera contaminaciones en campo debido a la complicada remoción del suelo; por otra parte, a temperaturas menores de 12°C tiende a solidificarse y mayores de 30°C tiende a oxidarse, por lo que esta investigación propone el entrapamiento de aceite de neem en

una matriz biopolimérica (fase dispersa) en una emulsión que mejorara su aplicación y en frutos prolongara su vida poscosecha y será más amigable con el medio ambiente.

4.7 MICROENCAPSULACIÓN

La microencapsulación se define como un proceso en el cual se realiza un recubrimiento de pequeñas partículas de un compuesto determinado, o su incrustación en una matriz ya sea homogénea o heterogénea (Chi *et al.* 2012). Este tipo de sistemas presenta la ventaja de permitir que el compuesto microencapsulado sea liberado por diversos mecanismos como la fricción, la presión, cambios de temperatura, pH, u otras condiciones que propicien su liberación a través de la capa de biopolímero. La microcápsula puede constar de un núcleo rodeado por una pared, de espesor uniforme o no uniforme, que puede estar formado por uno o más polímeros como material de recubrimientos (Chi *et al.* 2012), la obtención de un cierto tipo de estructura u otra dependerá de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y del material de recubrimiento, así como de la base del proceso tecnológico empleado.

4.7.1 Objetivo de la microencapsulación

Existen compuestos en la naturaleza que son altamente inestables, es decir que sufren degradaciones por efecto de diferentes condiciones ambientales como la humedad relativa, pH y temperatura (Han *et al.*, 2008). Razón por lo que en la industria alimentaria se han encapsulado compuestos como aminoácidos, vitaminas, minerales, antioxidantes, enzimas, edulcorantes, colorantes, microorganismos probióticos y algunos aceites principalmente los aceites esenciales (Deladino *et al.*, 2008). En este último rubro este trabajo propone la microencapsulación de aceite de neem ya que es un material sensible y bioactivo.

4.8 ACEITE DE NEEM

El árbol de Neem (*Azadirachta indica*) es originario de la India es uno de más estudiados en el mundo (Bolívar, *et al.*, 2009), debido a su enorme potencial como fuente de plaguicidas, insecticidas y agroquímicos orgánicos (Brahmachari, 2004). El aceite de sus semillas se usa como fungicida e insecticida (Girish y Shankara, 2008), su

4.10 EMULSIÓN

Se define una emulsión como un sistema disperso termodinámicamente inestable que contiene dos fases líquidas inmiscibles (una fase oleosa y una acuosa), una de las cuales está dispersa en la otra en forma de pequeñas gotitas, y cuya estructura es estabilizada por un agente tensoactivo llamado emulsionante y/o agentes estabilizantes, que hace a las emulsiones cinéticamente estables (McClements, 2004).

Una emulsión está constituida por tres regiones, las cuales presentan propiedades fisicoquímicas diferentes: la fase dispersa, la fase continua y la interfase (Ruiz, 2004). La fase dispersa la constituyen las partículas de una sustancia que por la fuerza de difusión se introducen en el seno de la otra, que es la fase continua y en la interfase se encuentra el emulsionante que da estabilidad cinética al sistema.

4.10.1 Clasificación de las emulsiones

Las emulsiones se clasifican de acuerdo a la distribución de las fases acuosa y oleosa; si la fase dispersa es la acuosa el sistema es conocido como emulsión agua-en-aceite (W/O), si el sistema consiste en la dispersión de gotas de aceite en una fase acuosa se conoce como emulsión aceite-en-agua (O/W) (Ruiz, 2004). Otra clasificación son las emulsiones múltiples, es decir sistemas del tipo aceite-en-agua-en-aceite (O/W/O) o agua-en-aceite-en-agua (W/O/W).

4.10.2 Liberación controlada

La estructura de las emulsiones permite la posibilidad de encapsular sustancias de diferente naturaleza en la fase interna protegiéndolas de agentes externos y a su vez pudiendo controlar su liberación mediante estímulos (temperatura, pH, dilución o cizalla entre otros). Es por este motivo que su estudio en campos como el farmacéutico y cosmético entre otros es de gran interés como el alimenticio, pudiéndose formular un sistema de encapsulación con una liberación controlada en el tiempo y localizada (Villanova, 2009).

4.11 ESTABILIDAD DE EMULSIONES

Como se mencionó en la sección anterior, debido a que las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables (Aranberri *et al.*, 2006). Existen diversos mecanismos fisicoquímicos causantes de la inestabilidad de las emulsiones (Fig. 4.4):

- La sedimentación y el cremado son dos formas de separación gravitacional. El cremado describe la migración de las gotas hacia la parte superior del sistema debido a la diferencia de densidades en las fases. En la sedimentación ocurre un proceso inverso.
- La floculación y coalescencia son dos tipos de agregación de las gotas. La inestabilidad por floculación ocurre cuando dos o más gotas se agregan, debido a las colisiones provocadas por el movimiento Browniano, conservando su individualidad. Mientras que en la coalescencia, la colisión de dos o más gotas forma una sola de mayor tamaño que a su vez sigue coalesciendo hasta alcanzar un nivel más bajo de energía llevando a la separación de las dos fases.
- Inversión de fases es el proceso mediante el cual una emulsión agua-en-aceite (W/O) se convierte en una emulsión aceite-en-agua (O/W), o viceversa. Este fenómeno ocurre cuando la fracción másica de la fase dispersa es mayor a 0.5, ya que al ser mayor que la que contiene tiene a convertirse en la fase continua por lo que ocurre esta inversión de fases.
- Maduración de Ostwald es el fenómeno por el que se produce la disolución de gotas pequeñas del medio disperso en el seno de la fase continua; a continuación se desarrolla la difusión de sus componentes a través de la fase continua; estos componentes alcanzan la superficie de gotas grandes que penetran y se unen a dichas gotas perdiendo su identidad.

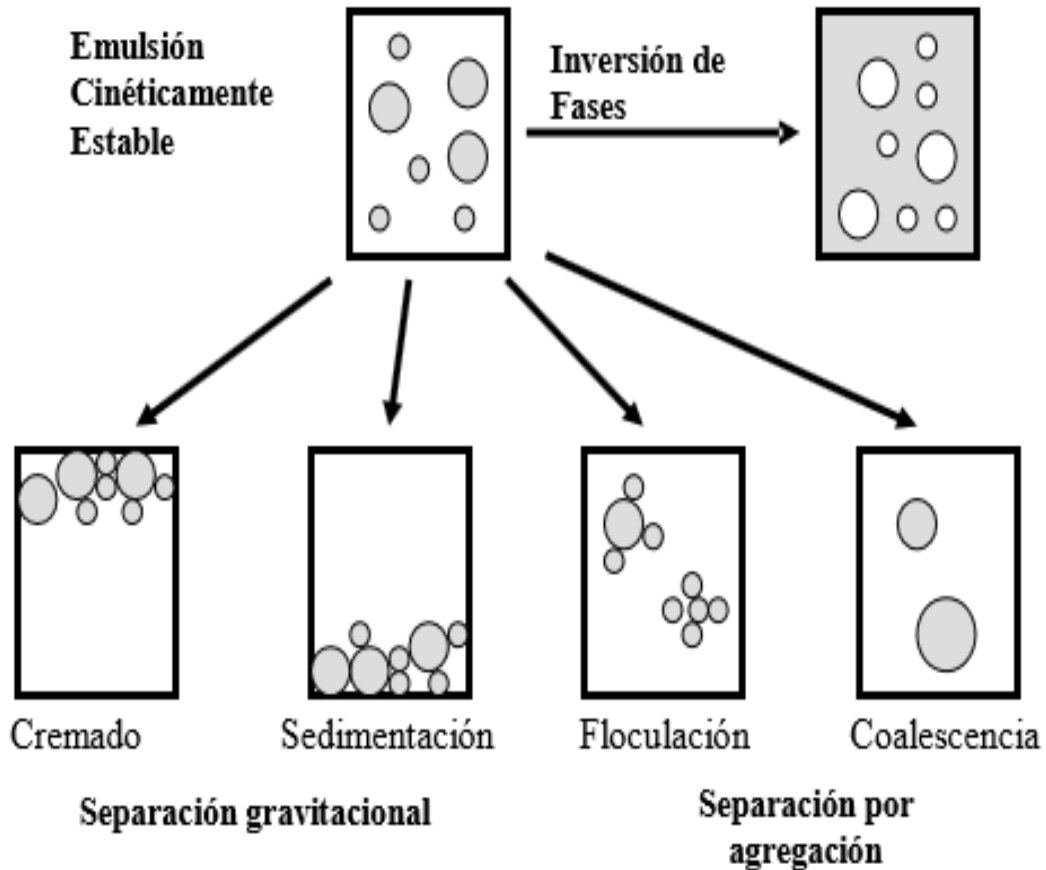


Fig. 4. 4 Procesos de desestabilización de emulsiones (McClements, 2004).

La estabilidad está sometida a varias cuestiones, como el tamaño de gota, la polidispersidad del sistema y el balance entre las fuerzas de atracción y repulsión a las que están sometidas las gotas, conocido como potencial zeta. El movimiento Browniano produce colisión entre las partículas y si las fuerzas de atracción electrostáticas predominan, las gotas se aglomeran después de la colisión y favorecen la ruptura de la emulsión. En caso contrario, si las fuerzas de repulsión predominan las gotas permanecen separadas después de la colisión y favorecen la estabilidad. Las fuerzas de atracción son las de Van der Waals, en tanto que las fuerzas de repulsión provienen de la interacción entre las dobles capas eléctricas que rodean a las gotas (Hunter, 2001). Esta doble capa eléctrica se forma en la interfase de la gota, como consecuencia de la existencia de cargas eléctricas sobre ella. Estas pueden provenir de la propia disociación iónica de grupos superficiales, lo que puede ocurrir por adsorción de iones desde el medio dispersante.

Esta doble capa puede modificarse introduciendo en la dispersión un electrolito, emulsionantes o materiales estabilizantes, donde sus iones se adsorben modificando la doble capa (Pérez, 2009).

4.11.1 Distribución y tamaño de la gota

La distribución del tamaño de gota se determina a través de un parámetro denominado span, que nos dice que tan monodisperso (gotas del mismo tamaño) o polidisperso (gotas de diferente tamaño) es un sistema (Fig. 4.5). El span relaciona los diámetros en donde se encuentran el 10 y 90% de los tamaños de las gotas, por lo que cuando el span es uno, se habla de una emulsión monodispersa y por lo tanto esta tendrá mayor estabilidad que una emulsión polidispersa (McClements, 2004).

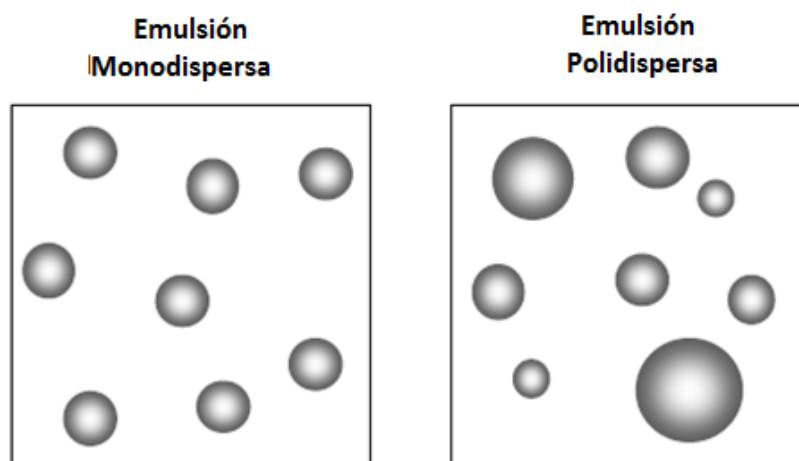


Fig. 4. 5 Tipos de distribución de gota en una emulsión (McClements, 2004).

4.11.2 Potencial Zeta

El potencial zeta es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula (Sandoval *et al.*, 2011), por lo que indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la gota para desestabilizarla. Se usa el modelo de la doble capa para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión. Inicialmente, la atracción del coloide negativo hace que algunos iones positivos formen una capa adyacente alrededor de la superficie del coloide, esta capa es conocida como la capa de Stern (Stern, 1924).

Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por la gota negativa, pero estos son ahora rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico lleva a la formación de una capa difusa de contra-iones (Pérez, 2009).

La capa difusa puede ser visualizada como una atmósfera cargada rodeando al coloide (Fig. 4.6). Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa reciben el nombre de la doble capa. El espesor de esta doble capa depende del tipo y concentración de los iones de la solución (Pérez, 2009).

La carga negativa de la gota y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la solución (Fig. 4.6). Este tiene un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia. Un punto de interés es donde se unen la capa de Stern y la capa difusa, este potencial es conocido como el Potencial Zeta (Pérez, 2009).

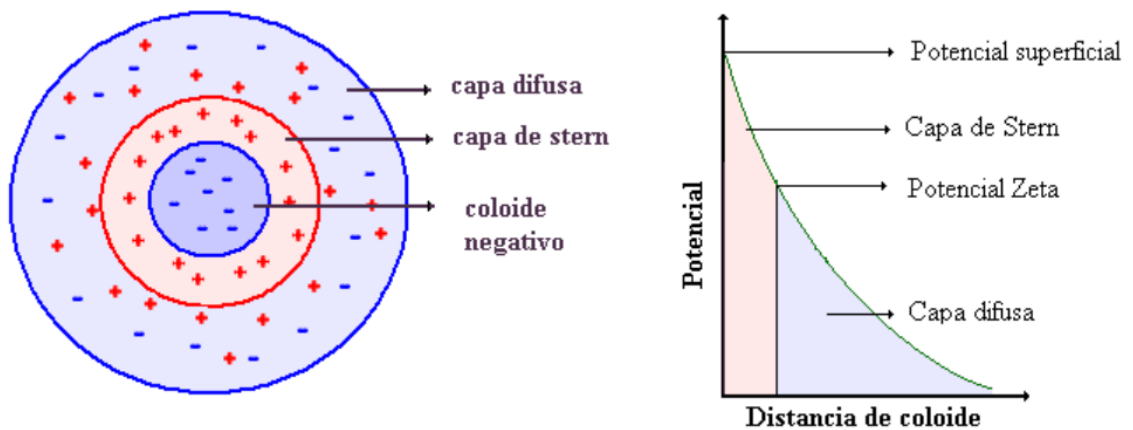


Fig. 4. 6 La doble capa y potencial zeta (Pérez, 2009).

4.12 BIOPOLÍMEROS COMO EMULSIONANTES

Los emulsionantes más utilizados en la industria alimentaria pueden variar ampliamente en su capacidad para formar y estabilizar emulsiones en función de sus características moleculares y fisicoquímicas. Dentro de ellos se encuentran los tensoactivos de molécula pequeña y polímeros anfifílicos (McClements, 2004).

Los tensoactivos también llamados surfactantes o agentes de superficie activa, son especies químicas con una naturaleza o estructura polar - no polar, con tendencia a localizarse en la interfase, formando una capa monomolecular adsorbida en la misma interfase (McClements, 2004).

Las ventajas de materiales poliméricos incluyen buena estabilidad física, química y biológica, además de que los procedimientos de preparación son sencillos y reproducibles, así como aplicabilidad en una amplia gama de productos químicos. (Sinha *et al.*, 2004; Sopeña *et al.*, 2009).

Para que un biopolímero sea un buen emulsionante debe ser superficialmente activo; es decir, debe tener un carácter anfifílico que permita que las moléculas se adhieran y distribuyan en la interfase aceite-agua, protegiendo a las gotas recién formadas contra su coalescencia debido a su capacidad para disminuir la tensión interfacial. Generalmente los agentes emulsionantes son compuestos de bajo peso molecular y con buena solubilidad en la fase continua (Loeza, 2007).

La mayoría de los polisacáridos poseen baja actividad superficial o en ocasiones carecen de ella pero se emplean ampliamente como agentes espesantes, con capacidad de retención de agua y estabilizantes (Loeza, 2007). Cuando no existe evidencia de grupos hidrofóbicos, la función estabilizadora se debe a que modifican las propiedades reológicas de la fase continua de un sistema disperso., cuyo mecanismo de estabilización se debe a efectos de viscosidad y esteréricos.

4.12.1 Quitina

La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes después de la celulosa, que se encuentra en los exoesqueletos, las membranas peritróficas, y los capullos de insectos y crustáceos. En las paredes fúngicas, la quitina varía en la cristalinidad, el grado de unión covalente a otros componentes de la pared, y el grado de acetilación (Muzzarelli, 1985; Muzzarelli *et al.*, 1986). En los crustáceos, la síntesis y secreción de quitina se realiza directamente en el aparato de Golgi (Horst y Walker., 1993). Todos los organismos capaces de sintetizar quitina (Fig. 4.7) siguen un camino en común que termina con la polimerización de *N*-acetilglucosamina a partir del precursor activado *UDP-GlcNAc*. La regulación, la bioquímica y genética de las síntesis de quitina son bien conocidas (Kumar *et al.*, 2004).

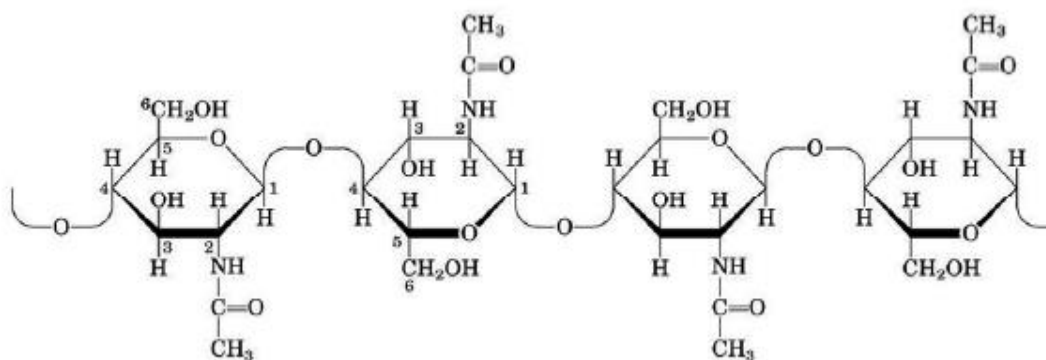


Fig. 4. 7 Estructura de la quitina (Marmol *et al.*, 2011).

4.12.2 Quitosano

El producto de la N-desacetilación de la quitina es el quitosano es un heteropolisacárido lineal (Fig. 4.8), que ha recibido gran debido a sus propiedades antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antialérgico, estimulante del sistema inmunitario, anti-hipertensivo y para bajar niveles de colesterol, además de ser de origen natural, reproduciblemente biológico, biocompatible y biodegradable (El Ghaouth *et al.*, 1991; Wang, 1992; Darmadji e Izumimoto, 1994; Jongrittiporn *et al.*, 2001; Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003).

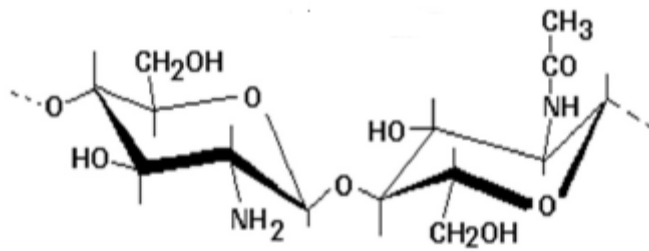


Fig. 4. 8 Estructura de quitosano (Marmol *et al.*, 2011).

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 menores de 6.0 debido a la protonación de la mayoría de sus grupos aminos (Rabea *et al.*, 2003).

El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana del quitosano aún no está totalmente definido, sin embargo se ha atribuido una relación directa con su peso molecular (Hirano y Nagano, 1995; Bautista *et al.*, 2004) y a su carácter catiónico. Debido principalmente a la interacción de los grupos amino libres, cargados positivamente en medio ácido, con los residuos negativos de las macromoléculas expuestas en la pared de los microorganismos, provocando cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática, y alterando las funciones celulares; además se ha relacionado con la inhibición de sus principales funciones (Benhamou, 1992; Larez, 2008).

Cabe mencionar que esta actividad fungicida se ha estudiado, tanto *in vitro* (El Ghaouth *et al.*, 1992) como *in vivo* (Wei *et al.*, 2008) y se ha encontrado que su efectividad depende de la presencia de este biopolímero en las paredes celulares de los hongos (Roller y Covill, 1999).

Debido a estas propiedades funcionales, el quitosano ha encontrado una amplia gama de aplicaciones que van desde la rama farmacéutica, alimentaria, tratamiento de agua residual como floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites, así como en la agricultura para el control de enfermedades y plagas en plantas (Cho *et al.*,

2006; Hwang y Shin, 2000; Boonsongrit *et al.*, 2007; Mármol *et al.*, 2011). Siendo la primera, el área en la que se ha empleado ampliamente ya sea como recubrimiento para la liberación controlada de fármacos administrados vía oral, ocular, nasal y ótica (Goycoolea *et al.* 2007), o bien como nano o microencapsulados en los que el quitosano se emplea como matriz polimérica (Kumar *et al.*, 2004 y 2007).

Recientemente se ha propuesto la microencapsulación en quitosano de algunos compuestos que actúan como plaguicidas de microorganismos fitopatógenos, como los hongos, ya que el quitosano actúa como estabilizante de emulsiones mediante el aumento de la viscosidad de la fase continua disminuyendo el movimiento de las gotas de la emulsión (Rodríguez *et al.*, 1999). En este sentido, en 2010 Pérez *et al.* reportaron la liberación controlada de brasinoesteroides con actividad agroquímica en microesferas de quitosano y en 2011, Ling *et al.*, utilizaron microesferas de quitosano para la liberación controlada de agroquímicos como las auxinas.

En la actualidad, el quitosano ha comenzado a aplicarse en el área de poscosecha, ya que se ha demostrado que permite prolongar la vida de anaquel de frutas que son susceptibles a la pérdida de su calidad en un corto tiempo. Ya que el recubrimiento con quitosano actúa como barrera entre el fruto y el ambiente, evitando así la evaporación de agua y alteraciones en el color del epicarpio (Martínez, 2009); en este sentido el quitosano ha logrado un amplio uso porque la permeabilidad al vapor de agua de los recubrimientos a base de este biopolímero pueden ser controlada mediante una modificación química con un agente de entrecruzamiento, este proceso es conocido como funcionalización del quitosano y se realiza a través de soluciones de glutaraldehído y compuestos diepóxidos, sin embargo estos son altamente citotóxicos (Fwu-Long *et al.*, 2006).

4.12.2 Funcionalización de quitosano

Dado la toxicidad de algunos de los agentes de entrecruzamiento, se ha propuesto la funcionalización de quitosano con compuestos que brindan propiedades físico-químicas y biológicas, amigables con el medio ambiente y el ser humano (Alonso, 2009; Alonso *et al.* 2010).

Se han desarrollado recubrimientos bioactivos a base de celulosa o sus derivados y quitosano, este último como agente antimicrobiano. Alonso *et al.* (2010) propone la

funcionalización de celulosa y quitosano esto para conferir la capacidad antimicrobiana del quitosano logrando, así una matriz polimérica biofuncional para el encapsulamiento de aceites esenciales. Mientras que Nicio (2011) propone la funcionalización de hidroxipropilmetilcelulosa (H) y quitosano, incorporando ácido cítrico, este último posee afinidad natural por la H que le confiere propiedades contra la permeabilidad al vapor de agua (Moller, 2004).

La asociación de recubrimientos a base de quitosano con celulosas y sus derivados conducen a la reducción de costos de los materiales ya que la H no es un polímero costoso como lo podría llegar a ser el quitosano (Moller, 2004).

3.12.3 Hidroxipropilmetilcelulosa (H)

La H (Fig. 4.9) es un polímero no iónico, derivado semisintético de la celulosa, que se obtiene por la reacción de la celulosa alquílica con una mezcla de cloruro de metilo e óxido de propileno (Kumar y Banker, 1993). Es un éter de celulosa con grupos metilo e hidroxipropilo, donde las proporciones de los grupos metoxilo (16.5 – 30%) y grupos hidroxipropilo (4 -32%), determinan las características propias de los diferentes tipos de H (Sánchez *et al.*, 2010). Es insoluble en disolventes como el cloroformo, etanol, éter, agua caliente, acetona y tolueno, mientras que es dispersable en agua fría, mezclas hidroalcohólicas y diclorometano (Sánchez *et al.*, 2010).

En alimentos, se emplea como agente gelificante y estabilizante (Moller, 2004). También se emplea como agente estabilizador (espesante o potencializador de la viscosidad) de suspensiones y emulsiones (Ansel *et al.*, 2004). También se utiliza para evitar la coalescencia y la formación de sedimentos, ya que actúa como protector de coloides. Es importante señalar, que por ser un polímero no iónico, sus dispersiones son por lo general estables en un intervalo de pH entre 3 y 11 (Dow Chemical Company, 1988).

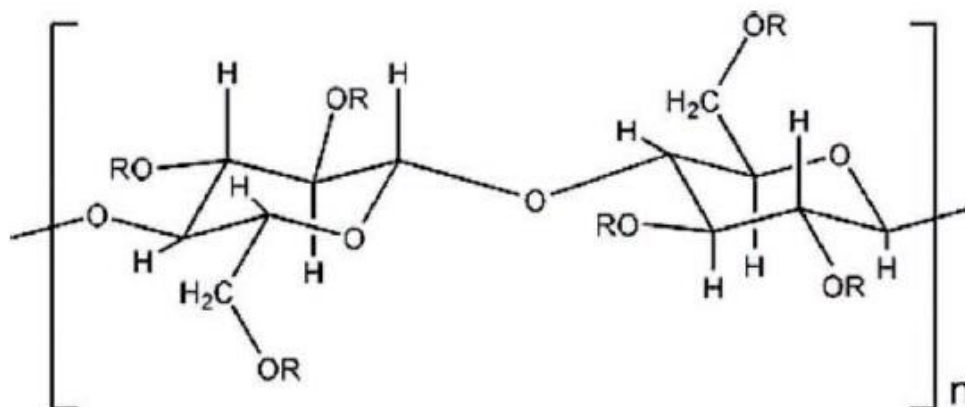


Fig. 4. 9 Estructura de HMPC (Sánchez et al., 2010).

3.12.4 Goma de mezquite

La goma de mezquite es un biopolímero exudado en forma de lágrima de color ámbar producida por árboles de *Prosopis spp.*, químicamente es una sal neutra de un polisacárido ramificado de naturaleza ácida formado por un núcleo de residuos de β -D-galactosa, constituyendo un esqueleto de uniones (1-3) y ramificaciones (1-6) conteniendo L-arabinosa (formas cíclicas de piranosa y furanosa), L-ramnosa, β -D-glucuronato y 4-o-metil- β -D-glucuronato como azúcares simples y cadenas laterales de oligosacáridos. La goma de mezquite obtenida de *Prosopis laevigata* contiene una pequeña fracción de proteína ($2.7 \pm 0.06\%$) ligada a la parte central de la estructura primaria de carbohidratos, la cual es la responsable de sus propiedades como agente estabilizante en sistemas dispersos (Román-Guerrero et al., 2009).

La goma de mezquite ha sido reportada como agente emulsificante, como un eficiente microencapsulante de aceites esenciales y de oleorresinas utilizadas como colorantes naturales, entre otras aplicaciones (Bósquez y Vernon, 2005; Beristain y Vernon, 1994; Vernon et. al., 2000; Beristain et. al., 2001). Se cree que los residuos hidrófobos de los aminoácidos se adsorben en la interfase aceite-agua y que los bloques de los carbohidratos hidrofílicos se extienden dentro de la solución acuosa, previniendo la floculación y coalescencia de las gotas a través de fuerzas de repulsión estérica (Garti y Reichman, 1993).

5. JUSTIFICACIÓN

La causa principal de pérdidas poscosecha de frutos, que es limitante de la comercialización de los mismos es la pérdida de la calidad de los frutos altamente perecederos. Éstos inician rápidamente su descomposición, la cual se puede ver acelerada por diversos factores como lo es temperatura, presión y humedad.

México es el principal productor de frutos del género *Stenocereus*, como la pitaya y el xoconostle dulce, por lo que existen grandes posibilidades de exportación. Sin embargo, solo tienen una distribución comercial que abarca principalmente mercados locales debido a lo perecedero de los frutos ya que solo soportan recorridos cortos. Una práctica común es que después de la recolecta son acomodados en cajas y sus espinas perforan a otros frutos lo que exponen sus azúcares y esto lo hace más propenso a microorganismos fitopatógenos acortando su vida poscosecha drásticamente. También tienen la desventaja de ser frutos estacionales, disponibles solo unos meses al año de abril a junio para la pitaya y de agosto a octubre para el xoconostle dulce.

Hoy en día se está promoviendo el procesamiento de estos frutos de tal forma que puedan ser aprovechados y disfrutados durante más tiempo (Ramírez, 2007); sin embargo este proceso no garantiza la aceptación de los frutos por el mercado nacional e internacional.

Por lo que el desarrollo y uso de productos bioactivos provenientes de fuentes naturales, se ha convertido en uno de los principales retos del sector agroindustrial moderno. En este sentido el quitosano representa una alternativa muy promisoriosa debido a su carácter natural, significativa actividad biológica y facilidad de obtención. Ya que este se obtiene de desechos de camarón generados por la industria procesadora de mariscos, donde son considerados como contaminantes del medio ambiente y se convierten en una carga porque su eliminación es problemática y costosa (Gildberg y Stenberh, 2001). Otros biopolímeros ampliamente usados son la goma de mezquite la cual se obtiene de los exudados de árboles del mismo nombre y la hidroxipropimetilcelulosa, que es un derivado de la celulosa; ambos biopolímeros en combinación con el quitosano pueden conseguir recubrimientos con tamaño de poro menor por lo que la pérdida de peso se disminuirá. Por último el aceite de neem es otro

producto bioactivo usado principalmente como pesticida biológico para cultivos orgánicos (GIM, 2013).

El presente trabajo experimental plantea una nueva alternativa, la aplicación de recubrimientos a base de quitosano y de una matriz biopolimérica que permita entrapar los compuestos bioactivos (aceite de neem). Con el fin de lograr una mayor estabilidad en los frutos y que estos conserven la calidad poscosecha para poder exportarlos ya que los dos son considerados frutos exóticos, por lo tanto esto se verá reflejado en las utilidades para los productores agrícolas en México.

6. HIPÓTESIS

Los biopolímeros como el Q, H y GM, son materiales estructurales utilizados como recubrimientos, los cuales combinados con aceites (neem) permitirán el diseño de matrices biopoliméricas para obtener productos de liberación controlada para prolongar la vida poscosecha de frutos no climatéricos del género *Stenocereus*.

7. OBJETIVO GENERAL

Preparar y caracterizar matrices biopoliméricas con compuestos antimicrobianos para mejorar la conservación poscosecha de frutos.

8. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener y caracterizar quitosano a partir de desechos de camarón, mediante un proceso biológico-químico
- Caracterizar y evaluar emulsiones como recubrimientos para la conservación poscosecha de frutos no climatéricos.
- Establecer las condiciones del entrapamiento de aceite de neem en quitosano.
- Determinar la estabilidad del compuesto antimicrobiano y condiciones de liberación del mismo.

9. MATERIALES

9.1 Desecho de Camarón

Se utilizó desecho de camarón obtenido de la Nueva Viga en Iztapalapa. Este material fue molido en un molino industrial (Thomas-Scientific EUA) con criba de 3cm de diámetro.

9.2 Obtención de quitina

Azúcar de mesa (Zulka), cepa *Lactobacillus* sp (aislada en el laboratorio de biopolímeros, UAMI).

9.3 Obtención de quitosano

Ácido clorhídrico (HCl) A.C.S. (Reactivos Química Meyer). Hidróxido de sodio (NaOH) grado industrial (Casa Miyako, México).

Para el último bioensayo se aplicó quitosano comercial, peso medio marca Sigma-Aldrich, México.

9.4 Caracterización de quitosano

Ácido acético glacial (CH_3COOH), acetato de sodio anhidro (CH_3COONa), ácido cítrico monohidratado granular ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), sorbitol ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$) y fosfato de sodio Monobásico (NaH_2PO_4) marca J.T. Baker. Hidroxipropilmetilcelulosa (H) marca DEMACSA, Lote: 438/05 (Derivados macroquímicos S.A. de C.V.). Alcohol Etilico Absoluto A.C.S. ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), marca Meyer. Polietilenglicol-600 diácido marca Fluka.

9.5 Material para emulsiones

El aceite de neem fue comprado en Biotecnología Agroindustrial S. A. de C.V. en Morelia, Michoacan. Se utilizó aceite de girasol, marca 1,2,3 (Corona S.A. de C.V.) y aceite mineral grado alimenticio (Marca Shell). Goma de mezquite se recolectó

manualmente en forma de lágrimas en el estado de San Luis Potosí y se purificó siguiendo el método reportado por Vernon-Carter *et al.* (1996).

9.6 Material para caracterización de emulsiones

Azadiractina obtenida en Sigma-Aldrich, México. Cloruro de sodio (NaCl) y acetato de sodio (CH₃COONa) ambos marca J.T. Baker.

9.7 Material biológico

Se utilizaron pitayas (*Stenocereus pruinosus*) provenientes de Cosoltepec en el Estado de Oaxaca cosechados en el mes de mayo 2013, mayo 2014 y xoconostles dulces (*Stenocereus stellatus*) de la cosecha de octubre del 2013 del mismo municipio.

10. METODOLOGÍA

El desarrollo experimental de la investigación fue dividido en diferentes etapas que se indican en el diagrama de flujo adjunto (Fig. 10.1).

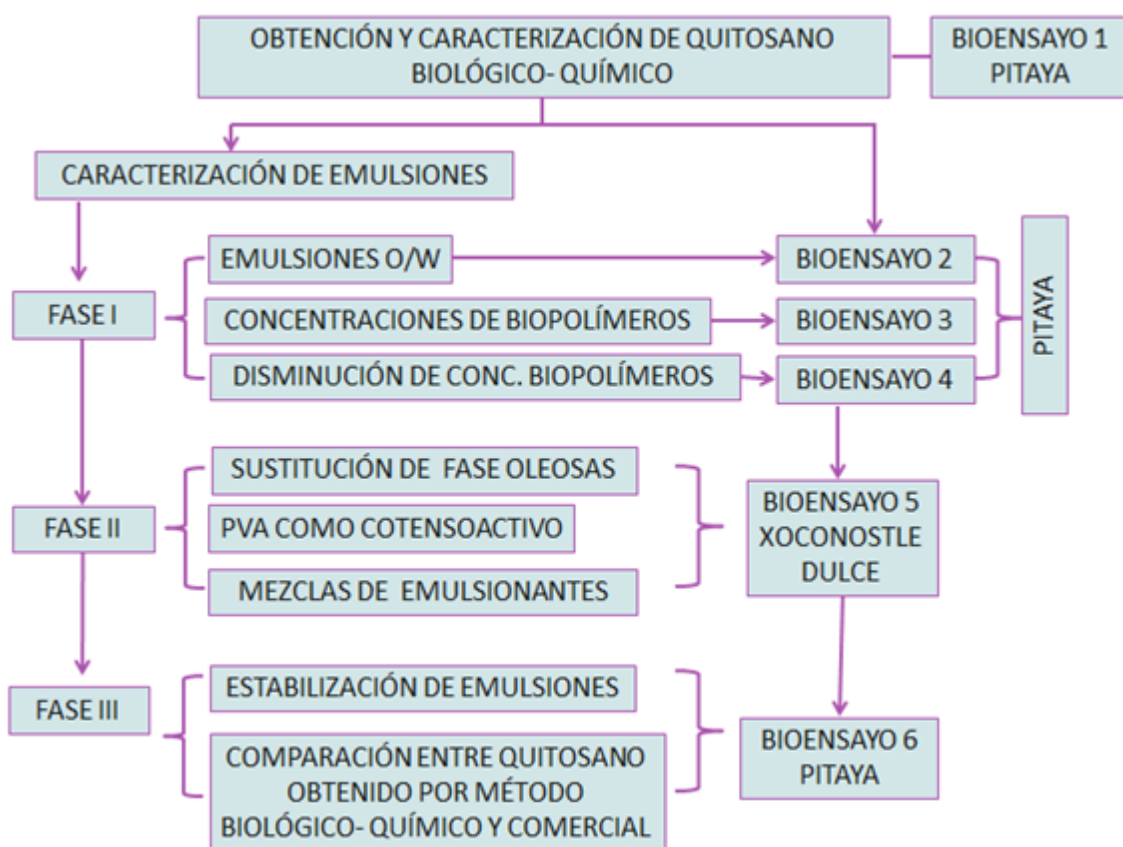


Fig. 10. 1 Diagrama de flujo con diferentes etapas experimentales

10.1 OBTENCIÓN DE QUITINA

La quitina se obtuvo a partir de un proceso biológico-químico (B-Q) mediante una fermentación ácido láctica donde 30 kg de desechos de camarón previamente triturados (tamaño de partícula de 0.3cm) fueron colocados en un reactor tipo columna, se adicionó 5% (v/p) de inóculo de *Lactobacillus* sp. y 10% (p/p) de azúcar de caña, durante 120 h a 30°C. En este proceso, las proteasas de los microorganismos provocaron la hidrólisis de las proteínas (desproteínización) mientras que la producción de ácido láctico de los microorganismos durante la fermentación, contribuyó a la desmineralización por remoción del CaCO₃. El resultado de la fermentación fue una fracción sólida que contenía la quitina cruda y una fracción líquida (licor) rica en proteína, minerales y pigmentos. (Shirai et al., 2001; Cira et al. 2002; Pacheco *et al.* 2009, 2011).

10.1.1 Purificación de la quitina

Los pigmentos presentes en el exoesqueleto del camarón son carotenoides (astaxantina, cantaxantina, astaceno, luteína y β-caroteno), que se extrajeron colocando la fracción sólida (quitina cruda) de la fermentación en acetona grado industrial a una concentración de 1g quitina cruda/15mL_{acetona} durante 1 h, bajo agitación magnética constante a temperatura ambiente (25°C), se evitó la incidencia de luz directa sobre la muestra con la finalidad de evitar la degradación de los carotenoides extraídos (Gimeno *et al.*, 2007).

La quitina cruda también presentó minerales por lo que se desmineralizó totalmente empleando HCl (0.4 M) en relación 1g quitina/15mL_{ácido} durante 1 h, bajo agitación magnética a temperatura ambiente (25°C). El producto obtenido se lavó hasta la neutralidad (corroborando esto con un potenciómetro) con agua corriente y se secó a 40°C durante 24 h. (Cira *et al.*, 2002). Por último se desproteínizó la quitina cruda para lo que se utilizó una solución NaOH (0.4M), con agitación magnética constante durante 1h, a temperatura ambiente (25°C), a una concentración de 1 g quitina/15mL_{NaOH}. Una vez concluida la reacción, se realizaron lavados con agua corriente hasta neutralidad (corroborando esto con un potenciómetro) y el producto fue secado a 40°C durante 24 h, obteniendo así quitina pura (Cira *et al.*, 2002).

10.2 OBTENCIÓN DE QUITOSANO

Para la obtención del quitosano, se llevó a cabo por un proceso de desacetilación de la quitina, por hidrólisis alcalina de los grupos acetamida en C-2 (Fig. 10.2). La quitina obtenida se desacetiló con solución de NaOH al 50% (p/v) en una relación 1g quitina/15mL NaOH en un reactor agitado enchaquetado a 100°C por 2 h. El quitosano obtenido fue enjuagado con agua corriente hasta la neutralidad (corroborado con un potenciómetro), fue secado a 40°C para su análisis y caracterización (Rocha- Pino *et al.*, 2008).

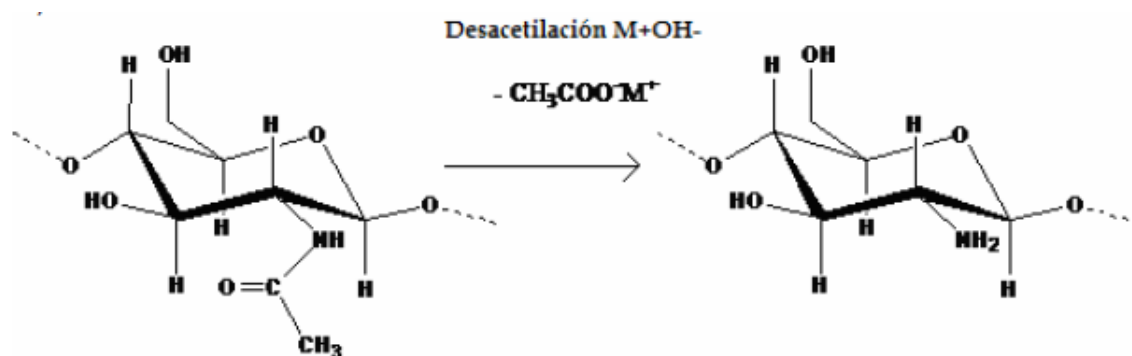


Fig. 10. 2 Reacción de desacetilación de la quitina para la obtención de quitosano (Alonso, 2009).

10.2.1 Determinación del peso molecular del quitosano.

El peso molecular promedio del Q se determinó por medio de su viscosidad intrínseca (M_v). Diferentes concentraciones de Q 0.5, 1, 1.5, 2, 4 g/L se disolvieron en ácido acético 2% (p/v), acetato de sodio 0.2M utilizado como solvente. La viscosidad intrínseca de las soluciones fue determinada mediante un viscosímetro tipo Oswald, se realizó a temperatura ambiente (25°C), el peso molecular se determinó mediante la ecuación de Mark – Houwink-Sakurada (Ecuación 1) donde $k = 1.38 \times 10^{-5}$ L/g y $a = 0.85$ (Kjoniksen *et al.*, 1997).

$$[\eta] = k(M_v)^a \quad (1)$$

Donde η es la viscosidad intrínseca, M_v fue el peso molecular y los parámetros de k y a dependen de la naturaleza del disolvente y del polímero (Kumar, 2007).

10.2.2 Determinación del grado de acetilación de quitosano.

El grado de acetilación (DA) del quitosano se obtuvo disolviendo en solución DCI/D₂O (20% p/p) mediante agitación magnética durante 12 h, los espectros de RMN¹H fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker AC 200 a 200Mhz para ¹H a 298K, el DA se calculó de acuerdo a Hirai *et al.*, (1991), por la integración de las áreas de la señal del protón metilo del residuo de (1-4)-2-acetamido-2-desoxy beta-D-glucano y de los protones H-2 al H-6 de la estructura completa (Pacheco *et al.*, 2011).

10.2.2 Determinación de solubles

Se disolvió 0.1g de muestra en 25mL de una solución de ácido acético 0.1M durante 72h, con agitación constante a temperatura ambiente. Se determinó por gravimetría la cantidad de solubles en dicha solución (Shrinivas y Stevens, 2005).

10.3 BIOPOLÍMEROS

El Q obtenido se dispersó en una solución de ácido acético al 0.1M (Montes, 2011), a diferentes concentraciones (20, 10, 5 y 2.5g/L) y se mantuvo bajo agitación magnética durante 72h previo a su uso para permitir su completa hidratación.

Se preparó una solución de H (15g/L concentración final), se pesaron 7.5g de H, los cuales fueron agregados en 332 mL de agua a 25° C y se dejó en agitación magnética durante 24 h. Posteriormente se adicionaron 166 mL de etanol y 1.6 mL polietilenglicol-600 diácido bajo agitación magnética constante a 25° C durante 2 h (Nicio, 2011).

Para la obtención del quitosano funcionalizado mediante su entrecruzamiento con H, las soluciones de Q y H fueron mezcladas en partes iguales, adicionando 50 g de ácido cítrico/ L, y 3.7g de fosfato de sodio monobásico/L y 10 g de sorbitol/L. La mezcla resultante se trató térmicamente a 100±10°C durante 3 min (Nicio, 2011).

10.3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 1

Previo a la aplicación de tratamientos en los frutos en todos los bioensayos (excepto el 6), se lavaron con cloro a una concentración de 200ppm (Pelayo *et al.*, 2010). El lavado consistió de la inmersión del fruto durante 1 min en la solución de cloro para su posterior enjuague con agua, los frutos se secaron utilizando sistemas de convección forzado hasta su sequedad y se seleccionaron los frutos cuyo estado de madurez era la de consumo u organoléptica, descartando aquellos que presentaron menor tamaño, daños mecánicos, fisuras o manchado del epicarpio, se aplicaron los tratamientos por inmersión y se secaron por convección forzada. Las unidades experimentales constaron de aproximadamente 500g de muestra (2 frutos).

Para este bioensayo las unidades experimentales incluyeron las variedades de pitayas cuyo color en epicarpio fue verde (Amarilla I y II, Melón y Sandía). Se almacenaron los frutos a una temperatura de $10\pm 5^{\circ}\text{C}$ y $75\pm 5\%$ HR.

- I. Control
- II. Q 5g/L
- III. Q 10g/L
- IV. Q 20g/L
- V. Q-g-H 5g/L
- VI. Q-g-H 10g/L
- VII. Q-g-H 20g/L

FUENTES DE VARIACIÓN: Tratamiento y Concentración de Q

VARIABLE RESPUESTA: %PFP

10.3.1.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP)

La pérdida de peso en los tratamientos fue determinada por triplicado, mediante el registro del cambio en el peso de cada una las unidades experimentales cada 24 h durante el almacenamiento. Los datos fueron expresados como porcentaje, calculado con la ecuación 2.

$$\%PFP = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (2)$$

Dónde: P_i = peso inicial y P_f = peso final

10.4 FASE 1: ENTRAMPAMIENTO DEL ACEITE DE NEEM EN EMULSIONES O/W

10.4.1 EMULSIONES O/W

Se prepararon diferentes emulsiones tipo O/W cuyas fases consistieron en mezclas de aceite de neem-aceite de girasol como fase dispersa y diferentes mezclas de biopolímeros en la fase continua. Se empleó una fracción másica dispersa (ϕ) de 0.3 con una concentración total de aceite de neem de 16g/L. La fracción másica de la fase dispersa para emulsiones O/W se calculó con la ecuación 3.

$$\phi = \frac{W_{oil}}{W_{oil} + W_{water}} \quad (3)$$

Donde ϕ es la concentración de la fase oleosa, W_{oil} es el peso de la fase oleosa y W_{water} es el peso de la fase acuosa.

La fase oleosa consistió en aceite de neem - aceite de girasol ($\phi= 0.3$), la fase continua fue agua, Q, H, Q-g-H ó QH y como emulsionante se usó Tween 80 (100g/L). La fase oleosa fue agregada por goteo hasta su completa homogenización realizada mediante un Ultraturrax T-25 a 10000 rpm, durante 10 min utilizando un baño de hielo para mantener la temperatura constante.

10.4.1.1 Caracterización de las emulsiones

10.4.1.1.1 Determinación del tamaño de gota

El tamaño de gota ($D_{3,0}$) y la distribución de tamaño de gota se determinaron por difracción de rayo láser empleando el analizador de tamaño de gota Malvern serie 2000 (Malvern Instruments, Malvern, R.U.). Las emulsiones (IR de 1.333) se dispersaron en agua destilada a 200 rpm (Pérez, 2011).

10. 4.1.1.2 Determinación de potencial zeta

El potencial zeta de las emulsiones se determinó mediante un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). Donde estas se diluyeron 1:100mL.

10.4.2 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 2

Para este bioensayo las unidades experimentales incluyeron todas las variedades de pitayas, aleatorizadas en cada una de las unidades experimentales. Se realizó a una temperatura de $10\pm 5^{\circ}\text{C}$ y $75\pm 5\%$ HR.

- I. Control
- II. Q 20g/L
- III. E. Neem 300g/L
- IV. N
- V. H 30g/L
- VI. NGQ 20 g/L
- VII. NGH 30g/L
- VIII. Q-g-H 20g/L
- IX. NGQ-g-H 20g/L
- X. NGQH 20g/L

FUENTE DE VARIACIÓN: Tratamiento

VARIABLES RESPUESTAS: %PFP y color.

10.4.2.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP)

Se realizó como en el apartado 10.3.1.1.

10.4.2.2 Estabilidad de color en el epicarpio

Para el análisis de los cambios de color del epicarpio de los frutos se utilizó un colorímetro El color del epicarpio se midió cada 72 h en tres partes equidistantes ecuatoriales y longitudinales de cada fruto por tratamiento con un Chromameter CR200 (Minolta, Osaka Japón) y se expresó como luminosidad (L^*), cromaticidad (C^*) y el

ángulo de Hue (*h*). Un patrón de referencia de color blanco se utilizó para calibrar el instrumento.

10.4.3 DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BIOPOLÍMEROS PARA EMULSIONES O/W

El procedimiento fue el mismo que en 10.4.1, solo que se usaron diferentes concentraciones de biopolímeros.

10.4.3.1 Caracterización de las emulsiones

10.4.3.1.1 Determinación del tamaño de gota

Se determinó como la sección 10.4.1.1.1.

10.4.3.1.2 Determinación de potencial zeta

Se determinó como la sección 10.4.1.1.2.

10.4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 3

Para este bioensayo se trabajaron con pitayas cuyo color en el epicarpio fue rojo (solferino, olla y roja lisa). Todos los tratamientos estuvieron a condiciones de refrigeración $10\pm 5^{\circ}\text{C}$ y a $75\pm 5\%$ HR.

- I. Control
- II. Q 10g/L
- III. Q 20g/L
- IV. H 10g/L
- V. H 20g/L
- VI. E. Neem
- VII. NGH 10g/L
- VIII. NGH 20g/L
- IX. NGQ-g-H 10g/L
- X. NGQ-g-H 20g/L

FUENTES DE VARIACIÓN: Tratamiento, Concentración y Emulsión

VARIABLE RESPUESTA: %PFP

10.4.4.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP)

Se realizó como en el apartado 10.3.1.1.

10.4.5 DISMINUCIÓN DE CONCENTRACIONES DE BIOPOLÍMEROS EN EMULSIONES O/W

El procedimiento fue el mismo que en 10.4.1, solo que se usaron disminuyeron las concentraciones de biopolímeros.

10.4.5.1 Caracterización de las emulsiones

10.4.5.1.1 Determinación del tamaño de gota

Se determinó como la sección 10.4.1.1.1.

10. 4.5.1.2 Determinación de potencial zeta

Se determinó como la sección 10.4.1.1.2.

10.4.6 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 4

Para este bioensayo las unidades experimentales incluyeron las variedades de pitayas olla, solferino y roja lisa (cuyo color en epicarpio es el rojo). Se realizó la aplicación en campo, en Santa Gertrudis Cosoltepec en el estado de Oaxaca. Y se trabajaron a dos temperaturas la ambiente ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) a $30\pm 2\%$ HR y la de refrigeración ($10\pm 5^{\circ}\text{C}$) a $75\pm 5\%$ HR.

- I. Control
- II. Q 5g/L
- III. Q 10g/L
- IV. NGQ-g-H 5g/L
- V. NGQ-g-H 10g/L

FUENTES DE VARIACIÓN: Tratamiento, concentración de Q y temperatura.

VARIABLE RESPUESTA: %PFP, color, firmeza, unidades contaminadas y análisis sensorial.

10.4.6.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP)

Se realizó como en el apartado 10.3.1.1.

10.4.6.2 Estabilidad de color en el epicarpio

Se realizó como en el apartado 10.4.2.2.

10.4.6.3 Firmeza

Para determinar la firmeza se retiró el epicarpio del fruto y con un penetrómetro Effegi se perforaron tres veces cada fruto y se anotó la presión ejercida.

10.4.6.4 Unidades Infechadas

Para determinar las unidades infechadas se contabilizaron las pitayas totales de cada recubrimiento y cada 24 h se monitorearon las unidades experimentales retirando las que presentaban contaminación por hongos, con lo que se pudo obtener el porcentaje de unidades infechadas (%UI).

10.4.6.5 Evaluación sensorial

Se realizaron evaluaciones sensoriales para las pitayas, con 22 consumidores los cuales fungieron como un jurado no entrenado, con el fin de establecer las principales características del fruto (percepción de la apariencia general, aroma, sabor y consistencia de la pulpa) a los 7 y 13 días de aplicación de los tratamientos.

10.5 FASE 2: SUSTITUCIÓN DEL ACEITE DE GIRASOL POR ACEITE MINERAL EN LA FASE DISPERSA DE EMULSIONES O/W

10.5.1 USO DE DIFERENTES FASES OLEOSAS

La fase oleosa consistió en aceite de neem - aceite de girasol o aceite mineral grado alimenticio ($\phi= 0.3$), la fase continua fue Q-g-H y como emulsionante se usó Tween20 (100g/L). La fase oleosa fue agregada por goteo hasta su completa homogenización realizada mediante un Ultraturrax T-25 a 10000 rpm, durante 10 min utilizando un baño de hielo para mantener la temperatura constante.

10.5.1.1 Caracterización de las emulsiones

10.5.1.1.1 Determinación del tamaño de gota

Se determinó como la sección 10.4.1.1.1.

10.5.1.1.2 Determinación de potencial zeta

Se determinó como la sección 10.4.1.1.2.

10.5.1.1.3 Tiempo de cremado

Se determinó el tiempo de cremado de las emulsiones, cuando la separación de fases alcanza la mitad del volumen total de la emulsión.

10.5.2 PVA COMO COTENSOACTIVO

La metodología fue la misma que en la sección 10.5.1, solo que se añadió PVA como cotensoactivo para mejorar la formulación.

10.5.2.1 Caracterización de las emulsiones

10.5.2.1.1 Determinación del tamaño de gota

Se determinó como la sección 10.4.1.1.1.

10.5.2.1.2 Determinación de potencial zeta

Se determinó como la sección 10.4.1.1.2.

10.5.2.1.3 Tiempo de cremado

Se determinó como la sección 10.5.1.1.3.

10.5.3 USO DE DIFERENTES EMULSIONANTES

La metodología fue la misma que en la sección 10.5.1, solo que se añadieron mezclas de emulsionantes (Tween20 y Tween80) a diferentes concentraciones para mejorar la formulación.

10.5.3.1 Caracterización de las emulsiones

10.5.3.1.1 Determinación del tamaño de gota

Se determinó como la sección 10.4.1.1.1.

10.5.3.1.2 Determinación de potencial zeta

Se determinó como la sección 10.4.1.1.2.

10.5.3.1.3 Tiempo de cremado

Se determinó como la sección 10.5.1.1.3

10.5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 5

Este bioensayo se realizó en xoconostle dulce. La fruta se mantuvo a temperatura de refrigeración ($10\pm 5^{\circ}\text{C}$) y una HR de $75\pm 5\%$.

- I. Control
- II. Q 5g/L
- III. H 10g/L
- IV. Q-g-H 5g/L
- V. NMQ-g-H 5g/L

FUENTE DE VARIACIÓN: Tratamiento

VARIABLES RESPUESTAS: %PFP y unidades contaminadas

10.5.4.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP)

Se realizó como en el apartado 10.3.1.1.

10.5.4.2 Unidades infectadas

Se realizó como en el apartado 10.4.6.4

10.6 FASE 3: ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES

10.6.1 PERFIL DE CAMBIOS DE POTENCIAL ZETA

Se determinó el potencial zeta de las soluciones acuosas de los biopolímeros se determinó a diferentes valores de pH usando un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). El pH de las soluciones acuosas de los biopolímeros fue ajustado con ácido acético y acetato de sodio. Se construyeron gráficas de potencial zeta contra pH y a partir de éstas se determinó el valor de pH donde existe la máxima diferencia estequiométrica de cargas electrostáticas entre los compuestos (Jiménez, 2010).

10.6.2 GOMA DE MEZQUITE COMO ESTABILIZANTE

La fase dispersa fue aceite de neem - aceite mineral grado alimenticio ($\phi=0.1$ y 0.3); la fase continua consistió en Q (5g/L) y GM (100g/L) la fase oleosa fue agregada por goteo hasta su completa homogenización realizada mediante un Ultraturrax T-25 a 10000 rpm, durante 10 min utilizando un baño de hielo para mantener la temperatura constante. Se ajustó el pH a 4.5 al final de la preparación.

10.6.2.1 Caracterización de las emulsiones

10.6.2.1.1 Determinación del tamaño de gota

Se determinó como la sección 10.4.1.1.1.

10.6.2.1.2 Determinación de potencial zeta

Se determinó como la sección 10.4.1.1.2.

10.6.2.1.3 Tiempo de cremado

Se determinó como la sección 10.5.1.1.3

10.6.3 USO DE DOS MÉTODOS DE HOMOGENIZACIÓN

La fase dispersa fue aceite de neem - aceite mineral grado alimenticio ($\phi=0.1$ y 0.3); la fase continua consistió en GM (100g/L) una vez integradas se agregó por goteo el Q (5g/L). Se usaron dos métodos de homogenización:

- a) La homogenización se realizó en un equipo (rotor/estator) Ultraturax T-25 a 10000 rpm, durante 10 min utilizando un baño de hielo para mantener la temperatura constante.
- b) La homogenización se realizó en un equipo (ultrasonicación) Helscher up 400S a una frecuencia de 1Hz a una amplitud 80% durante 10 min utilizando un baño de hielo para mantener la temperatura constante.

Para ambos casos se ajustaron a un rango de pH en a 3, 3.5, 4 y 4.5.

10.6.3.1 Caracterización de las emulsiones

10.6.3.1.1 Determinación del tamaño de gota

Se determinó como la sección 10.4.1.1.1.

10.6.3.1.2 Determinación de potencial zeta

Se determinó como la sección 10.4.1.1.2.

10.6.3.1.3 Tiempo de cremado

Se determinó como la sección 10.5.1.1.3

10.6.4 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES ESTABLES

10.6.4.1 Cinética de cremado

Cada 24 horas se determinó el tamaño de gota de las emulsiones. Obteniendo así el incremento de la gota. Se graficó el cambio del tamaño con respecto a los días y con ello se calculó el tiempo de cremado a través de la ecuación 3:

$$V = \frac{d^2(\rho - \rho_o)g}{18 \eta_o} \quad (3)$$

Donde V es la velocidad de cremado, d es el diámetro promedio, ρ es la densidad de la fase dispersa. ρ_o es la densidad de la fase continua, η es la viscosidad de la fase continua y g es la gravedad (McClements, 2004).

10.6.4.2 Eficiencia de encapsulación

Se colocaron 10g de la emulsión en 10g de etanol, se dejaron en posición estática por 1 hora, después se tomó el aceite de neem superficial con una pipeta pasteur, se colocó en un vaso a peso constante y se esperó a que se evaporara el metanol a 25°C durante 24h. Y se pesó el aceite en el vaso. Las mediciones se realizaron por triplicado. La eficiencia de encapsulado se calculó con la ecuación 4 (Guida *et al.*, 2010).

$$\%EE = \frac{(AT - AS)}{AT} * 100 \quad (4)$$

Dónde: %EE es el porcentaje de la eficiencia de encapsulación; AT es el aceite total (g) y AS es el aceite superficial (g)

10.6.4.3 Cambio de color de la emulsión

El color del epicarpio se midió cada 72 h en tres partes equidistantes ecuatoriales y longitudinales de cada fruto por tratamiento con un Chromameter CR200 (Minolta, Osaka Japón) y se expresó como luminosidad (L^*), cromaticidad (C^*) y el ángulo de Hue o tono (h). Un patrón de referencia de color blanco se utilizó para calibrar el instrumento (Martínez, 2009).

10.6.4.4 Liberación de azadiractina

La liberación del aceite de neem de las emulsiones O/W se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Jerobin *et al.* (2012), a través de la determinación de la concentración de azadiractina por medio de espectrofotometría a una absorbancia de 214 nm. La cantidad necesaria de emulsión se colocó en un tubo de ensayo y se diluyó con solución buffer (pH: 2, 2.5, 3, 3.5, 4 y 4.5) en una relación 1:4, se dejaron en reposo a $10 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 21 d. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro modelo (Genesys, 10S) cada 2h durante 12 h y posteriormente cada 24 h durante 20 d. Todas las muestras se realizaron por duplicado.

10.6.4.5 Espectrometría de infrarrojo (ATR-FTIR)

Se utilizó un espectrómetro de infrarrojo Perkin Elmer ATR-FTIR 100, Inglaterra. Para corroborar la presencia del aceite en la emulsión y se realizaron los espectros correspondientes a un intervalo de longitudes de onda entre 650cm^{-1} y 4000cm^{-1} . Se identificaron las señales características del aceite, para ello se analizó cada ingrediente de la formulación.

10.6.5 CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS

10.6.5.1 Preparación de películas

Las películas se obtuvieron vaciando 25g de cada solución (emulsión, quitosano y goma de mezquite) en cajas Petri de poliestireno y fueron secadas en estufa a 35°C durante 48h y se sacaron de la caja cortando círculo de 2cm de diámetro.

10.6.5.2 Acondicionamiento

Las películas fueron acondicionados en una cámara ambiental con una HR de $40 \pm 2\%$ alcanzada con una solución saturada de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante tres días (Martínez, 2009).

10.6.5.3 Espesor

Una vez acondicionados las películas se midió el espesor empleando un micrómetro digital (Mitutoyo 1D-C112E, Japón), realizándose cinco mediciones en distintas áreas de los círculos. Los valores determinados fueron promediados para obtener el espesor de cada película.

10.6.5.4 Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La WVP fue medida según una modificación de la técnica gravimétrica ASTM E96-80 (Miranda *et al.*, 2003). Se utilizó una celda de prueba de vidrio con una altura de 5cm y un diámetro de 2cm, en la cual se generó una HR de 30% empleando una

solución saturada de KCH_3CO_2 . Las películas previamente cortadas, se colocaron en la parte superior de la celda de prueba y se sellaron con parafilm. Se registró el peso inicial de las celdas de prueba y fueron transferidas a una cámara ambiental, correspondiente a un desecador de tapa esmerilada que contenía una solución saturada de NaCl para generar una HR de 75% previamente acondicionada. De esta forma se obtuvo el gradiente de humedad 30/75. Se empleó la misma metodología para generar un gradiente 75/30, en donde la celda de prueba contenía una solución saturada de NaCl y la cámara ambiental una solución saturada de KCH_3CO_2

Las cámaras ambientales se mantuvieron a $10\pm 5^\circ\text{C}$. La pérdida o incremento de peso de las celdas de prueba fueron monitoreadas a través del tiempo cada 24h y se registraron un mínimo de siete valores a partir del estado de equilibrio. La prueba se realizó por triplicado para cada película. Se graficó la pérdida o ganancia de peso contra el tiempo, obteniéndose la pendiente (J). A partir de este valor, se determinó la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA), así como la permeabilidad al vapor de agua (WVP) con las ecuaciones 5 y 6:

$$VTVA = \frac{J}{t * A} \quad (5)$$

Donde VTVA es velocidad de transmisión de vapor de agua, t es tiempo y A es área expuesta de la película.

$$WVP = \frac{VTVA}{P_{W1} - P_{W2}} \cdot L \quad (6)$$

Donde WVP es la permeabilidad al vapor de agua, L es el espesor de la película, P_{W1} es la presión parcial de vapor en la celda de prueba y P_{W2} es la presión parcial vapor en la cámara ambiental (Nicio, 2011).

10.6.6 DISEÑO EXPERIMENTAL BIOENSAYO 6

Este bioensayo se realizó en pitayas. Los tratamientos se mantuvieron a temperatura de refrigeración ($10\pm 5^\circ\text{C}$) y una HR de $75\pm 5\%$. Cabe mencionar que para este bioensayo, se omitió el proceso de lavado para corroborar el efecto antimicrobiano de los compuestos bioactivos presentes en las formulaciones.

- I. Control
- II. Q 2.5g/L
- III. Q 5g/L
- IV. GM 5g/L
- V. NMQ-g-H 5g/L
- VI. NMQGM 5g/L

FUENTES DE VARIACIÓN: Tratamiento

VARIABLE RESPUESTA: %PFP, color, firmeza, unidades contaminadas, conteo de hongos, acidez titulable, pH, Sólidos solubles totales y análisis sensorial.

10.6.6.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP)

Se realizó como en el apartado 10.3.1.1.

10.6.6.2 Estabilidad de color en el epicarpio

Se realizó como en el apartado 10.4.2.2.

10.6.6.3 Firmeza

Se realizó como en el apartado 10.4.6.3.

10.6.6.4 Acidez titulable (ATT)

Se cuantificó el porcentaje de ácido málico presente en el jugo de la pitaya (García *et al.*, 2013; González, 2006) mediante una titulación volumétrica ácido-base (AOAC, 2000). Se tomó 1mL de cada tratamiento y se aforo a 10mL, se tituló con NaOH 0.01 N hasta un pH de 8.2 (pH al que vira la fenoftaleina que por el color de la pulpa no es posible observar el cambio de coloración (Bosquez, 1992)). La acidez titulable fue calculada como % de ácido mediante la fórmula (7):

$$\% \text{ Ácidez} = \frac{V_{NaOH} \times N_{NaOH} \times Meq_{\text{ác.málico}}}{Vol. muestra} \times 100 \quad (7)$$

Donde, V es Volumen; N es Normalidad; Meq son miliequivalentes de ácido málico (0.06705) (Bosquez, 1992).

10.6.6.5 Sólidos solubles totales

Esta determinación se realizó mediante un refractómetro (Seedmech BPA) a 25°C. Para ello, se exprimió completamente la pulpa de cada fruto 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 triplicado (Martínez, 2009).

Los datos se expresaron como la relación entre sólidos solubles totales y acidez titulable, como un grado de madurez de las frutas, reflejado en el dulzor o acidez de los frutos (De Souza *et al.*, 1984; Ramírez *et al.*, 2010).

10.6.6.6 Unidades Infeccionadas

Se realizó como en el apartado 10.4.6.4.

10.6.6.7 Cuenta en placa de hongos

Se pesaron 10 g de cáscara de pitaya de cada tratamiento y se agregó en un matraz Erlenmeyer que contenía 90 mL de una solución salina isotónica 0.9% (p/v). Se homogenizó en una licuadora estéril durante 15 segundos a velocidad mínima. De la suspensión anterior, se tomó 1mL y se transfirieron a un tubo de ensayo que contenía 9 mL de solución salina isotónica 0.9%, se agitó y repitió esta operación dilución hasta 10^{-6} . De cada una de las diluciones se inocularon (0.1mL) siguiendo la técnica de inoculación por superficie en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA) acidificado a un pH de 3.5 con ácido tartárico (NOM-111-SSA1-1994). Se contaron las colonias a las 96 horas de la inoculación.

10.6.6.8 Evaluación sensorial

Se realizó como en el apartado 10.4.6.5, con la diferencia que fueron 30 consumidores que fungieron como jurado y se realizó a los 0 y 8 días.

10.6.6.9 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se cortaron trozos de epicarpio (0.5x0.5cm), primero se fijaron con gluteraldehído 5% (v/v) en buffer de fosfatos 0.1 M a pH 7, las muestras se lavaron con el buffer, se tiñeron con tetra óxido de osmio y se deshidrataron gradualmente con etanol. Finalmente se fijaron con carbón y fueron cubiertas con oro antes de su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-5900LV).

10.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los ensayos se aplicó análisis de varianza (ANOVA) con prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer para las emulsiones y con una prueba de comparación múltiple de medias LSD para los frutos. Las pruebas sensoriales se compararon por las medianas, a través de la prueba de Friedman. Para todos los análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico NCSS (2007) para evaluar los efectos significativos ($p < 0.05$).

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE QUITOSANO

Los métodos de obtención del Q son determinantes en las características de los mismos, afectando su actividad antimicrobiana de acuerdo al grado de acetilación y peso molecular, la desacetilación homogénea (temperaturas baja o temperatura ambiente) lleva a la obtención de Q con grados de acetilación menores, mientras la desacetilación heterogénea (temperaturas altas entre 100-140°C) puede resultar en grados de acetilación mucho menores sin grandes disminuciones en el peso molecular (Pacheco *et al.*, 2011). Para este estudio se realizó la desacetilación heterogénea.

A partir del proceso B-Q para la obtención de Q, el producto obtenido presentó un M_V de 278.32 kDa, con un porcentaje de acetilación (%DA) de 12.78% (Fig. 11.1) y una solubilidad en ácido acético de 99.45 ± 0.15 %.

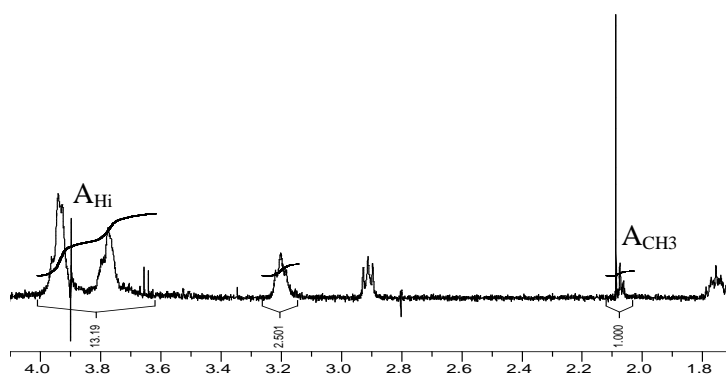


Fig. 11.1 Espectro $^1\text{HRMN}$ del quitosano.

11.1.1 FUNCIONALIZACION QUITOSANO- HIDROXIPROPILMETICELULOSA

El Q fue funcionalizado con el objetivo de mejorar sus propiedades tal como lo reporto Alonso *et al.* (2010), ya que el funcionamiento con el H logro una matriz polimérica biofuncional disminuyendo la permeabilidad al vapor de agua (Nicio, 2011). El esquema de reacción se presenta en la Fig. 11.2, en dicha reacción el ácido cítrico funciona como agente entrecruzante y el fosfato de sodio como catalizador.

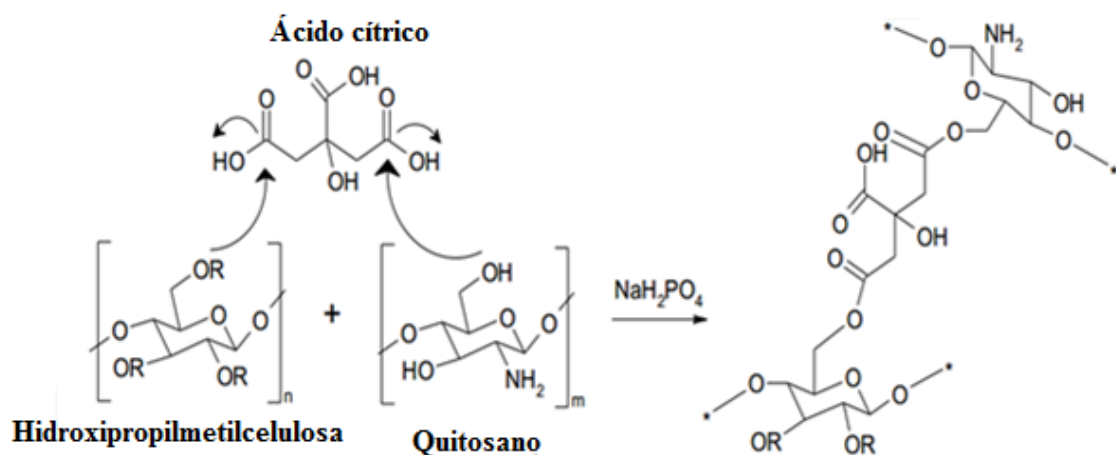


Fig. 11. 2 Reacción de funcionalización de Q, H, ácido cítrico y NaH_2PO_4 . Donde R es H. CH_3 o $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ (Nicio, 2011)

11.2 BIOENSAYO 1

Una vez preparados y caracterizados Q y Q-g-H, éstos fueron disueltos en ácido acético 0.1M a concentraciones de 5, 10 y 20 g/L y aplicados como recubrimientos de pitayas.

11.2.1 Pérdida fisiológica de peso

Hubo diferencia significativa ($p < 0.5$) de PFP entre los tratamientos aplicados a pitayas de color en epicarpio verde, sin embargo el control fue el que perdió menor peso, seguido de todos los frutos recubiertos con los demás tratamientos con excepción de Q 10 g/L que perdió mayor peso. La duración de este bioensayo fue de 8 días desde la aplicación del tratamiento y 11 días desde la cosecha. Para los tratamientos de Q funcionalizado no redujo la PFP de los frutos y estadísticamente se encontraron en el mismo grupo de los Q nativos (20 y 5 g/L), sin embargo, el uso de Q funcionalizado podría lograr reducir los costos de los materiales (Moller, 2004) conservándose las características antimicrobianas del Q al dejar el grupo amino libre, es decir, sin reaccionar durante la reacción de funcionalización. Por tal razón se continuó trabajando con Q-g-H para otros ensayos *in vivo*.

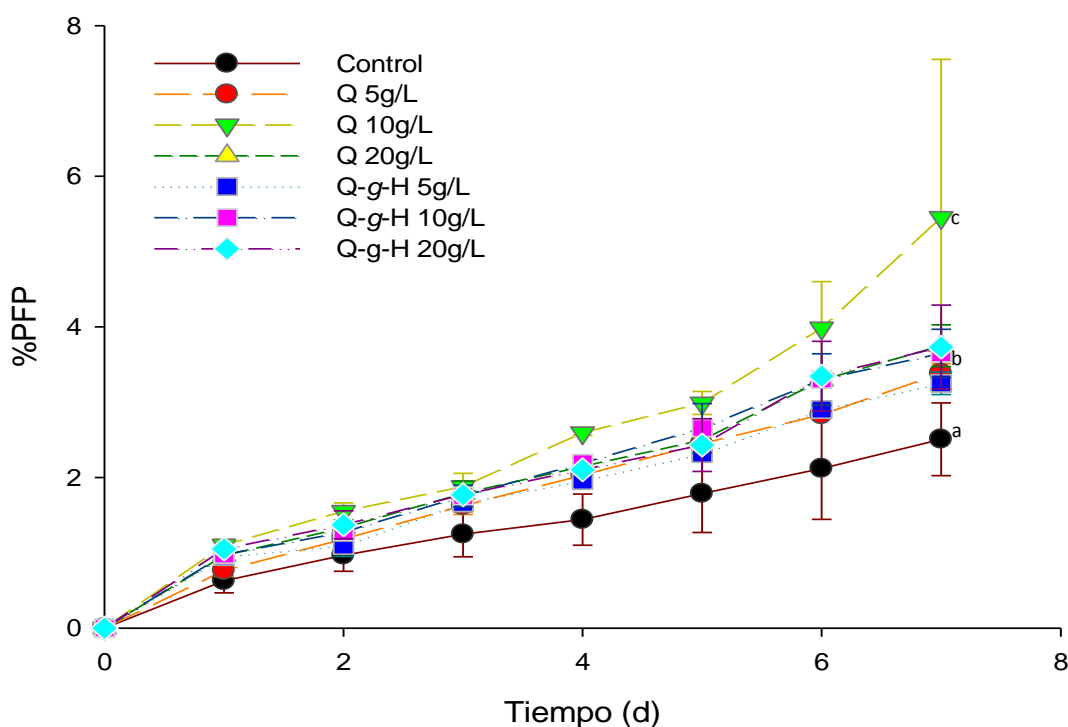


Fig. 11.3 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD

Se emplearon diferentes concentraciones de Q en los recubrimientos, en las cuales no hubo diferencia significativa ($p > 0.5$) entre ellas, por lo que se decidió continuar la preparación de las emulsiones con la concentración de 20 g/L ya que con ello era posible lograr un incremento en la viscosidad del medio que podría favorecer una mayor estabilidad al sistema con aceite de neem atrapado en la emulsión O/W.

11.3 FASE 1 ENTRAMPAMIENTO DEL ACEITE DE NEEM EN EMULSIONES O/W

11.3.1 Emulsiones O/W

Se obtuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) en el tamaño de gota y por la prueba de Tukey-Kramer se diferenciaron 4 grupos, el primero de ellos y con menor tamaño de gota fue NGH, seguido del grupo conformado por las emulsiones NGQ-g-H y NGQH, el tercer grupo formado por la E. neem y por último NGQ quien obtuvo el mayor tamaño, la mayor estabilidad en el sistema fue en los tratamientos con menor tamaño de gota (Valdés, 2010) porque las gotas más grandes tienden a atraer a gotas más pequeñas

y agregarse (Tabla 11.1). De la misma manera, se obtuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos para la distribución de las gotas (polidispersidad o span) de las emulsiones, donde la prueba de Tukey-Kramer diferenció dos grupos, el primero de ellos (grupo “a” en la Tabla 1) y con mayor estabilidad al presentar un valor cercano a la unidad (McClements, 2004) debido a que entre más homogénea fuera la distribución de los tamaños de gota se evita la agregación entre gotas.

Los dos parámetros anteriores (tamaño y distribución de las gotas) tuvieron influencia en las propiedades de las emulsiones, tales como la velocidad de degradación del compuesto atrapado y sobre la resistencia al cremado (Fernández *et al.*, 2004; Mason *et al.*, 1996).

Debido a la naturaleza química de los agentes estabilizantes, uno de los mecanismos de estabilidad es el de repulsión electrostática, por lo que el potencial zeta es una herramienta útil para poder evaluar este efecto y predecir si un sistema es más estable o no. En este parámetro de estabilidad se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos por lo que la emulsión NGH tuvo mayor carga negativa comparado con los demás sistemas, por lo que hubo una mayor fuerza de repulsión electrostática que retardo la separación de las fases (Tabla 11.1).

Tabla 11. 1 Resumen de la estabilización de emulsiones O/W

Tratamiento	D (3,0) (μm)	Span	Potencial zeta (mV)
E. Neem 300g/L	1.660 \pm 0.004 c	4.500 \pm 0.019 b	-11.700 \pm 1.311 b
NGQ 20g/L	1.740 \pm 0.023 d	1.740 \pm 0.050 a	12.800 \pm 0.101 d
NGH 30g/L	0.310 \pm 0.003 a	4.591 \pm 1.670 b	-20.300 \pm 0.624 a
NGQ-g-H 20g/L	0.991 \pm 0.017 b	1.691 \pm 0.149 a	11.401 \pm 1.657 d
NGQH 20g/L	0.990 \pm 0.025 b	1.233 \pm 0.051 a	2.340 \pm 1.095 c

Letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.5$).

Para esta primera fase, la emulsión más estable fue la NGH ya que tuvo menor tamaño de gota y un potencial zeta alejado de cero (Malvern, 2011). Sin embargo, fue un sistema polidisperso, mientras que las emulsiones más monodispersas fueron NGQ-g-H, NGQ y NGQH.

11.3.2 BIOENSAYO 2

11.3.2.1 Pérdida fisiológica de peso

El mejor tratamiento en términos de estabilidad de la emulsión y menor PFP en los frutos fue el tratamiento NGH (Fig. 11.4). Los frutos duraron 9 días (12 días desde la cosecha), todos ellos a excepción de lo recubiertos con NGH, no cumplieron las características de consumo en fresco (FAO, 2012).

El recubrimiento NGH a pesar de no ser un sistema estable, de acuerdo a lo reportado por Pinedo *et al.* (2010) y López (2001), a la temperatura de refrigeración fungieron como una microatmósfera alrededor de los frutos que impidió diferencias presión de vapor de agua entre los frutos y su entorno lo que evitó el proceso de senescencia de los frutos, por lo tanto estos frutos conservaron sus características de calidad.

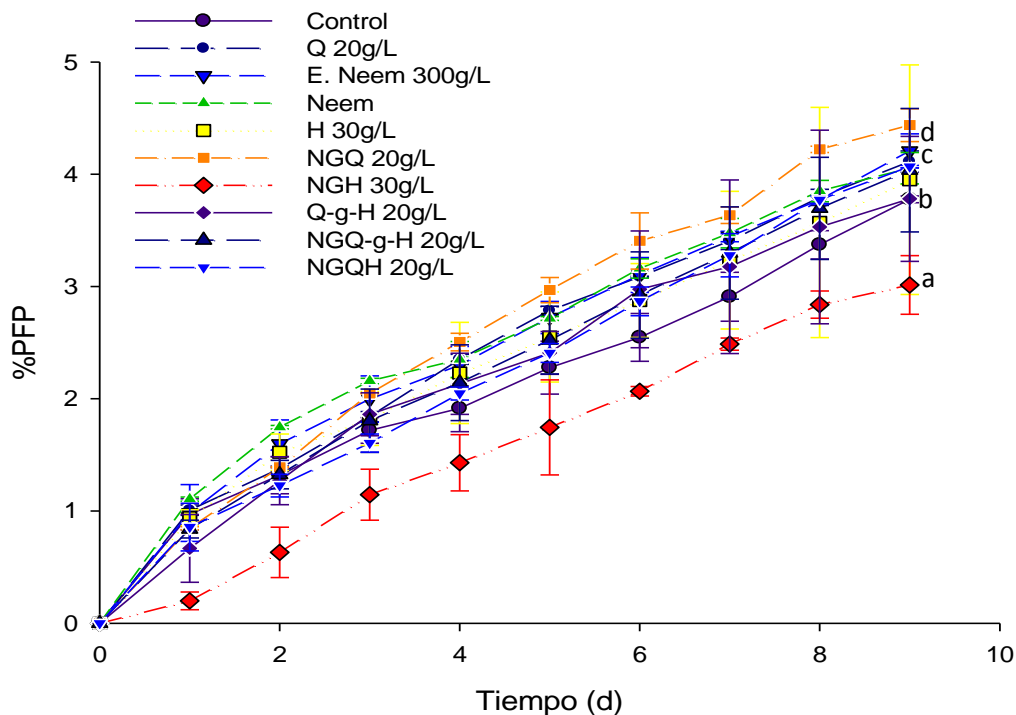


Fig. 11. 4 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD

11.3.2.2 Color

Para el parámetro de luminosidad (L^*), se obtuvo diferencia significativa ($p < 0.5$) (Fig. 11.5). Donde la prueba de medias LSD dividió a los tratamientos en 9 grupos donde los frutos recubiertos con H, NGQH y NGH fueron los que presentaron la mayor luminosidad en el epicarpio de los frutos. Lo que concuerda con Villalobos *et al.* (2005); Vargas (2008); Sánchez *et al.* (2009) quienes reportaron que el H es ampliamente usado como recubrimiento dado que confiere mayor luminosidad a los frutos por lo que aunado a los aceites empleados fueron los recubrimientos con mayor luminosidad.

Para la cromaticidad o saturación (C^*), se obtuvo diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tratamientos (Fig. 11.5), siendo los frutos recubiertos con NGQH los que obtuvieron menor pureza de color, es decir que este tratamiento tenía un matiz más intenso. Mientras que los tratamientos de control, Q, E, Neem, H y NGQ fueron los tratamientos de mayor saturación (Boscarol, 2007).

Para el ángulo de Hue (h), se obtuvo diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tratamientos (Fig. 11.5), cabe mencionar que para este bioensayo las unidades experimentales estuvieron formadas aleatoriamente por las variedades cuyo color en epicarpio eran rojos y verdes por lo que según el análisis estadístico predominaron los tonos amarillo y rojo, siendo el tratamiento NGH que al final del bioensayo se encontraron en un tono rojo oscuro. Por lo que debido a la gran dispersión de los colores de los epicarpios de los frutos a los 3 y 9 d, no fue posible establecer si estas mediciones se debieron a la cantidad de frutos rojos que conformaron las unidades experimentales o bien a la senescencia de los mismos (FAO, 2012).

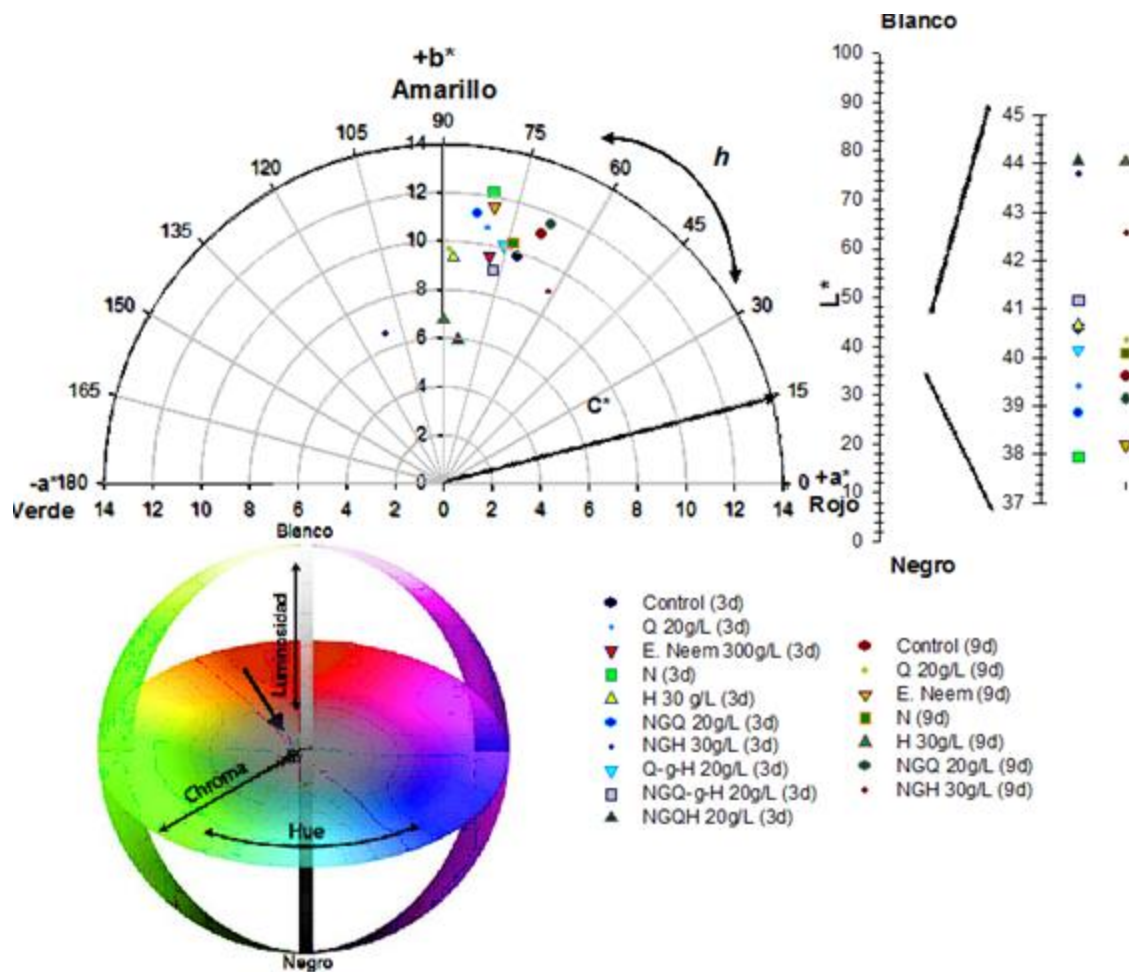


Fig. 11. 5 Cambio de color en los frutos con los tratamientos y el control del bioensayo 2.

Para este bioensayo se observó la morfología de los frutos y se concluyó que los epicarpios de pitayas rojas son más delgados que las de las pitayas de epicarpio verde, y dado que no se logró mejorar la PFP de las pitayas verdes (bioensayo 1), se decidió continuar los siguientes bioensayos con pitayas rojas, ya que los recubrimientos pueden prolongar la vida poscosecha de los frutos, además que según lo reportado por García *et al.* (2013) las pitayas rojas fueron considerados como alimentos neutracéuticos debido a que poseen mayor actividad antioxidante que las pitayas verdes.

Por lo tanto, los frutos recubiertos con NGH tuvieron menor %PFP, en cuanto a los parámetros de color para L^* los tratamientos de H, NGQH y NGH resultaron ser los de mayor luminosidad en los epicarpios, también se consideró la E. Neem para corroborar el efecto antimicrobiano del aceite, considerando su entrapamiento, por lo que estos tratamientos se consideraron para el bioensayo 3 con solo pitayas de color en epicarpio rojo.

11.3.3 Diferentes concentraciones de biopolímeros para emulsiones O/W

El tamaño de partícula fue significativamente diferente ($p < 0.05$) obteniéndose tres grupos, el primero y con menor tamaño de gota conformado por NGH a ambas concentraciones, seguido de NGQ-g-H también a las dos concentraciones y, el último grupo formado por la E. Neem, como se observó en el experimento anterior (11.3.1), fue el sistema más inestable al tener mayores tamaños de gota (Valdés, 2010) y un sistema polidisperso (Tabla 11.2).

Existió diferencia significativa para el potencial zeta ($p < 0.05$), y al igual que el experimento anterior (11.3.1) la emulsión NGH 20g/L fue que presentó el potencial zeta más alejado del cero (-21.13 mV) (Tabla 11.2).

Tabla 11. 2 Resumen de la estabilización de emulsiones a diferentes concentraciones de biopolímeros

Tratamiento	D (3,0) μm	Span	Potencial zeta (mV)
E. Neem	0.970 \pm 0.094 c	1.870 \pm 0.186 b	-11.700 \pm 1.311 c
NGH 10g/L	0.651 \pm 0.006 a	0.650 \pm 0.012 a	-14.270 \pm 0.709 b
NGH 20g/L	0.372 \pm 0.000 a	0.620 \pm 0.004 a	-21.130 \pm 0.252 a
NGQ-g-H 10g/L	0.750 \pm 0.017 b	0.750 \pm 0.048 a	-4.860 \pm 1.671 d
NGQ-g-H 20g/L	0.751 \pm 0.000 b	0.730 \pm 0.001 a	2.450 \pm 0.329 e

Letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.5$).

11.3.4 BIOENSAYO 3

11.3.4.1 Pérdida fisiológica de peso

Hubo diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tratamientos y de acuerdo a la prueba de medias LSD los frutos recubiertos con Q 10g/L y NGQ-g-H 10g/L tuvieron menor %PFP con respecto al control (Fig. 11.6). La duración de este bioensayo fue de 8 días desde la aplicación de los tratamientos y 11 días desde la cosecha. Los recubrimientos Q 10g/L y NGQ-g-H 10g/L fungieron como una barrera que evitó la migración de gases y vapor de agua entre el fruto y el medio ambiente (Maté, 2008).

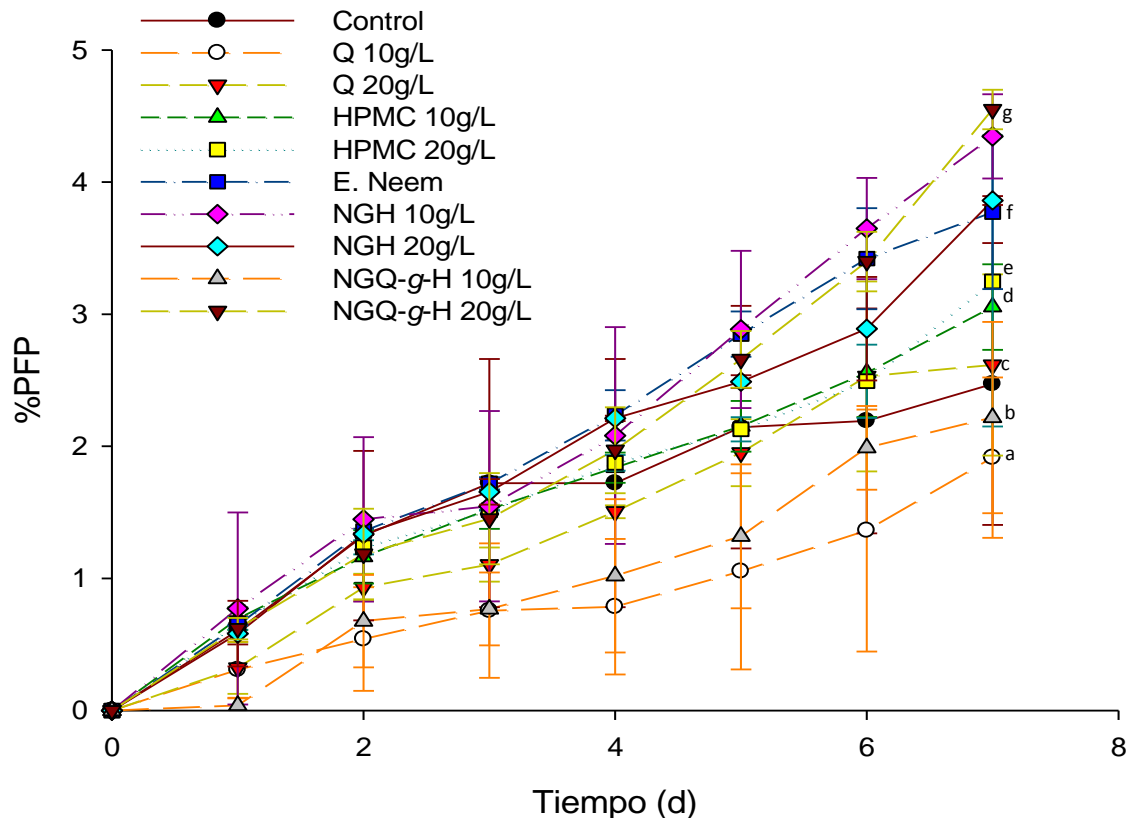


Fig. 11. 6 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.

Los mejores tratamientos fueron en emulsión logrando que los frutos perdieran menor PFP ($p < 0.05$). Sin embargo, el empleo de la emulsión ocasionó oscurecimiento en el epicarpio comparado con el control, este fenómeno posiblemente se debió al uso de aceites vegetales (López, 2014) o bien por efectos de luz y disponibilidad de oxígeno (Kargar *et al.*, 2010). Los frutos recubiertos que no se encontraban en emulsión

lograron que los frutos perdieran mayor peso en promedio, pero fueron capaces de conservar sus características de calidad, tal como lo reportó Han *et al.* (2004).

El resultado de este bioensayo fue consistente con el anterior (2), en donde se determinó nuevamente que no existió diferencia significativa ($p>0.5$) entre las concentraciones de Q, sin embargo que los recubrimientos estresaron los frutos ya que a mayores concentraciones hubo mayor pérdida de firmeza y agrietamientos en los epicarpios. Por tal razón se modificaron las formulaciones de los emulsiones disminuyendo a 5 y 10 g/L de Q.

11. 3.5 DISMINUCIÓN DE CONCENTRACIONES DE BIOPOLÍMEROS EN EMULSIONES O/W

Dado los resultados obtenidos en la fase *in vivo*, se decidió seguir estabilizando la emulsión con mejores características para conservar la vida poscosecha de la pitaya y esta fue la emulsión NGQ-g-H 10g/L, por lo que se volvió a caracterizar y se comparó entre esta concentración y una menor (5g/L).

Se obtuvo diferencia significativa ($p<0.05$) obteniendo que la emulsión NGQ-g-H 5g/L fue el sistema más estable al presentar menor tamaño de gota y un sistema monodisperso Sin embargo, para el potencial zeta no hubo diferencia significativa entre los tratamientos (Tabla 11.3).

Tabla 11. 3 Resumen de la estabilización de emulsiones con concentraciones bajas de biopolímeros

Tratamiento	D (3,0) μm	Span	Potencial zeta (mV)
NGQ-g-H 5g/L	0.860 \pm 0.024 a	0.955 \pm 0.007 a	8.440 \pm 0.331 a
NGQ-g-H 10g/L	1.240 \pm 0.035 b	1.155 \pm 0.094 b	8.600 \pm 0.387 a

Letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p<0.5$).

Por lo que cinéticamente la emulsión NGQ-g-H 5 g/L resultó ser la menos inestable al coincidir con lo reportado por Valdés (2010), ya que tuvo menores tamaños de gota y fue un sistema monodisperso; sin embargo, el potencial zeta aunque es mayor a cero no lo es suficientemente alejado de él, ya que Malvern (2011) sugiere que cuando el

potencial zeta es cercano a ± 30 el sistema será más estable, por lo que podemos atribuir el cremado de la emulsión a que no hubo la suficiente repulsión de las cargas.

11.3.6 BIOENSAYO 4

Se probaron dos temperaturas de almacenamiento, la ambiente ($25\pm 2^\circ\text{C}$) y la de refrigeración ($10\pm 5^\circ\text{C}$). A lo que se obtuvieron como resultados:

11.3.6.1 Pérdida fisiológica de peso

A $25\pm 2^\circ\text{C}$ (Fig. 11.7) hubo diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tratamientos; de acuerdo a la prueba de comparación de medias LSD se determinó que después de 4 días de tratamiento (7 días desde la cosecha), el grupo comprendido por el control, y los frutos recubiertos con NGQ-g-H 5g/L, Q 5g/L y NGQ-g-H 10g/L perdieron menor cantidad de agua (6.6% en promedio) que el Q 10g/L (15.7%). Armella *et al.*, 2003 reportaron que después de 5 días desde su cosecha a la temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$, los frutos perdieron el 18% de su peso y su calidad de consumo en fresco, lo que concuerda con lo reportado por Gervacio (2005) quien mencionó que la vida útil de una pitaya desde su cosecha es menor a 5 días debido al manejo durante y después de la cosecha. Por lo que los recubrimientos a base de Q no lograron ser mejor al control y estos lograron que los frutos perdieran su calidad de consumo en fresco, sin embargo la duración del control de nuestro bioensayo fue mayor a lo reportado, lo que pudimos atribuir a un mejor manejo desde la cosecha y transporte de los frutos, ya que fueron acomodados de tal manera que la compresión de los mismos fuera menor, por lo que hubo menor daño en los epicarpios.

A $10\pm 5^\circ\text{C}$ hubo diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tratamientos, logrando así que todos prolongaran la vida poscosecha, ya que el control tuvo un menor periodo de vida poscosecha. En la Fig. 11.7, se muestra el análisis a los 8 días donde se observó que los frutos recubiertos con NGQ-g-H y el Q a las menores concentraciones reportaron menor % PFP y se mantuvieron así hasta el final del bioensayo a los 11 días de tratamiento (14 días desde la cosecha) obteniendo así mejores resultados que Armella *et al.*, quienes reportaron que después de 14 días a la temperatura de $7\pm 1^\circ\text{C}$ las pitayas perdieron aproximadamente el 8% de agua, sin embargo ya no fueron aptas para su

consumo en fresco por lo se recomendó procesarlas en productos como jaleas y mermeladas. En contraste en este estudio se obtuvo un 8.7% de pérdida de agua pero con calidad para consumo en fresco, por lo que los recubrimientos pueden prolongar la vida poscosecha de la pitaya.

Podemos concluir que los recubrimientos junto con la temperatura de refrigeración tuvieron un efecto sinérgico sobre las pitayas prolongando su vida poscosecha, tal como lo reporta Pinedo (2010), quien reporta el uso de recubrimientos a base de papel y la frigoconservación como un efecto sinérgico para la conservación poscosecha de la tuna.

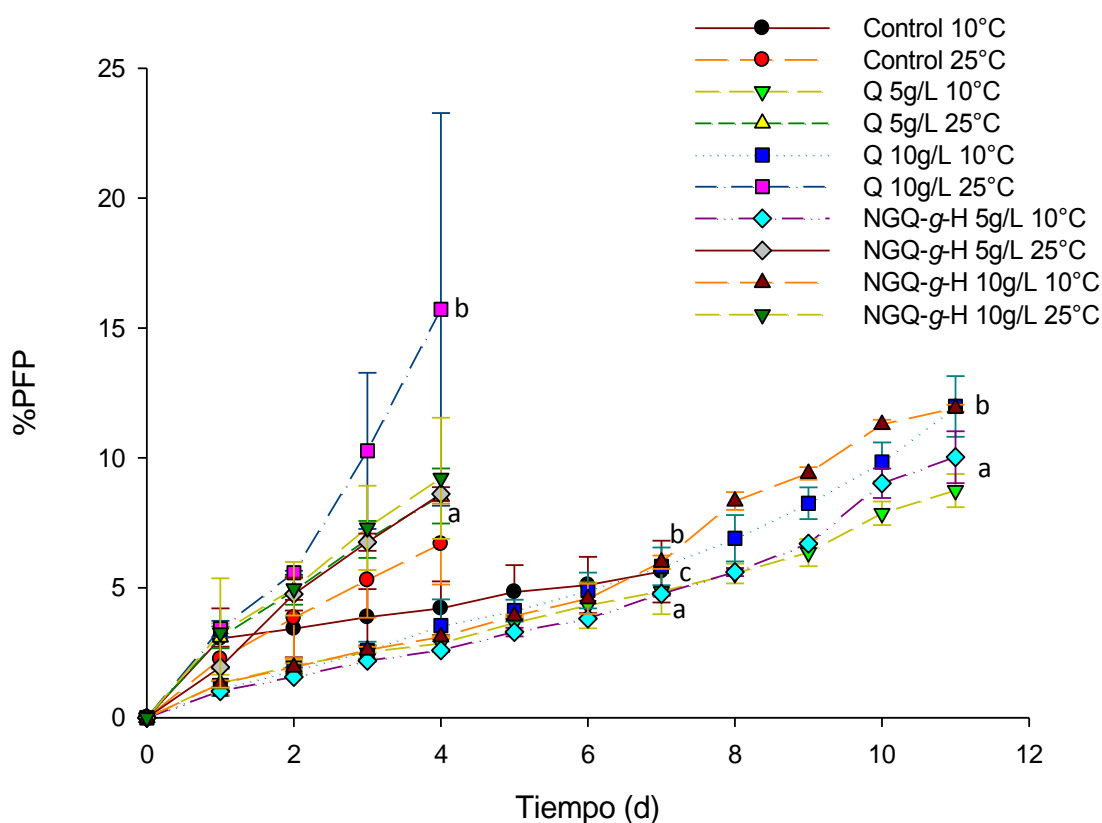


Fig. 11. 7 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD

No hubo diferencia significativa ($p > 0.5$) entre las concentraciones empleadas, por lo que se seleccionaron las menores. Siendo esto consistente en ambas temperaturas y con los bioensayos anteriores. Hubo diferencia significativa ($p < 0.5$) entre usar o no emulsión siendo esto consistente a ambas temperaturas, donde los frutos recubiertos con emulsión perdieron menor peso en promedio a los 8 días del bioensayo, este fenómeno

fue debido al uso de los aceites ya que estos tuvieron una baja polaridad lo que presentó una escasa permeabilidad al vapor de agua (Kester y Fennema, 1986; Ramos *et al.*, 2010), sin embargo al final del bioensayo no existió diferencia significativa entre el uso o no de emulsión, lo que se podría atribuir la baja estabilidad de las emulsiones.

11.3.6.2 Color

El color fue determinado en aquellos tratamientos a temperatura de refrigeración ($10\pm 5^{\circ}\text{C}$).

Para L^* existió diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tratamientos, ya que todos menos el control presentaron oscurecimiento del epicarpio a los 6d; siendo los frutos con emulsión los de menor luminosidad. Lo que fue consistente con el ángulo de Hue (h) donde existió diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tratamientos, se observó que el tono estuvo en los colores rojos. Sin embargo, las emulsiones presentaron oscurecimiento del epicarpio mayor al control a los 6d, ya que su tono inicial fue rojo y su tono desde los 6d hasta 11d fue guinda (Fig. 11.8), debido a que estas provocaron prooxidación en el epicarpio de los frutos, ya que López (2014) reporta que este fenómeno se puede dar por efecto de la luz, temperatura y disponibilidad de oxígeno o bien por compuestos prooxidantes que conformaron la emulsión (Kargar *et al.*, 2010). Por lo que para nuestro caso estos factores estuvieron presentes durante el bioensayo por lo que pudieron detonar este fenómeno, ya que por la baja estabilidad de las emulsiones los aceites se liberaron rápidamente provocando que estos estuvieran en contacto con el medio ambiente y se oxidaran sobre los epicarpios de los frutos o bien por el implemento de los emulsionantes (tween20 y tween80), provocando el oscurecimiento de los mismos.

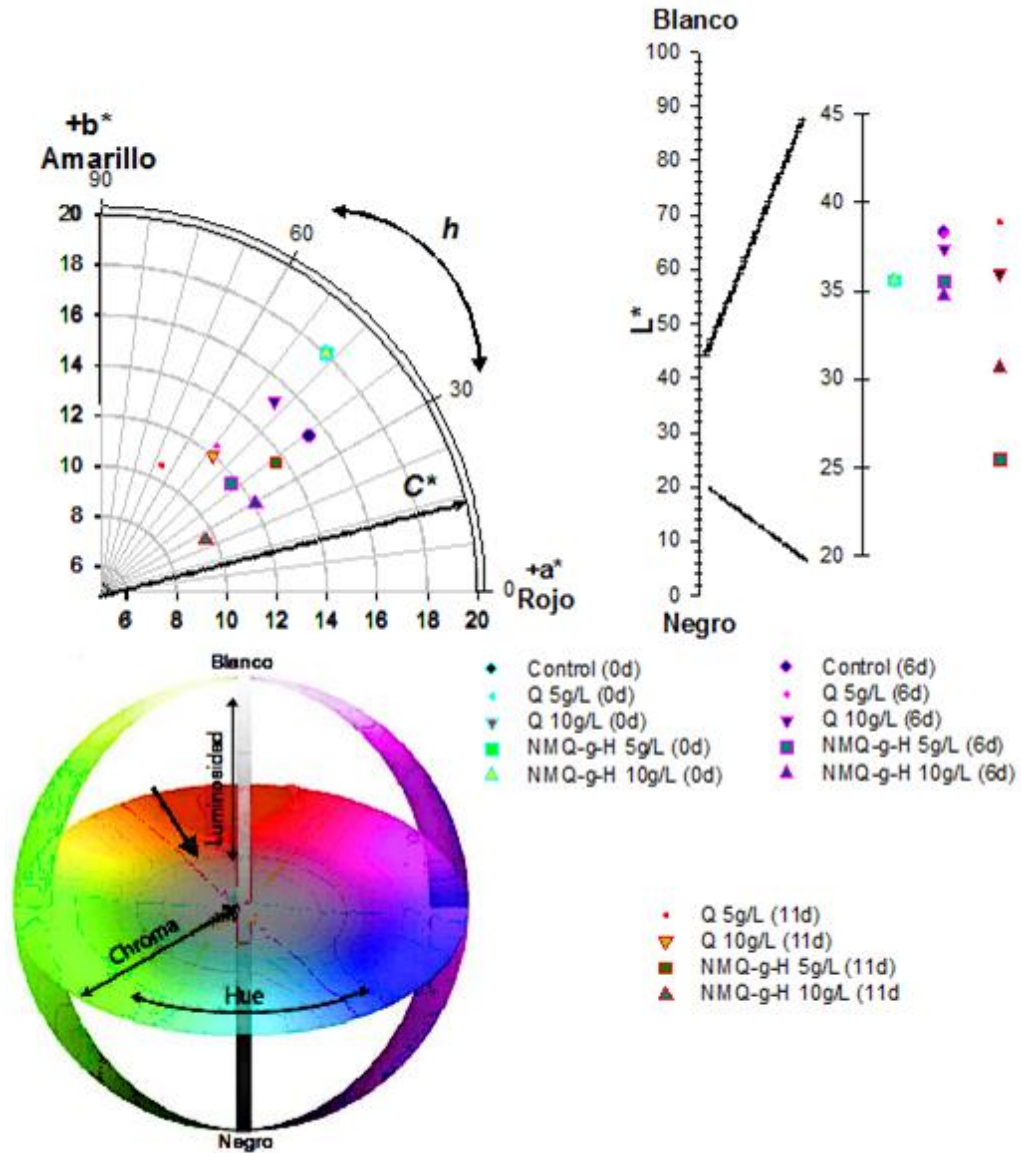


Fig. 11. 8 Cambio de color en los frutos con los tratamientos y el control del bioensayo 4.

Para la cromaticidad (C^*) no existió diferencia significativa ($p > 0.5$) entre los tratamientos, por lo que la saturación o matiz es prácticamente igual para todos los tratamientos.

11.3.6.3 Firmeza

Hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos que estuvieron en refrigeración ($10 \pm 5^\circ\text{C}$) a los 9 y 11d, a lo que la prueba LSD agrupa los frutos recubiertos con Q y NGQ-g-H a 10g/L como los de mayor firmeza, a los 11d los frutos con Q a ambas concentraciones y NGQ-g-H 5g/L fueron los de mayor firmeza. Siendo este último el que perdió mayor firmeza al final del bioensayo (Fig. 11.9). La pérdida de firmeza se asocia al proceso de senescencia según la FAO (2012), esto fue lo que ocurrió durante el bioensayo ya que la firmeza se redujo a lo largo de los días, este proceso de ablandamiento fue debido a la degradación de sus azúcares y a la degradación de las paredes celulares de los frutos (Reardon, 2010).

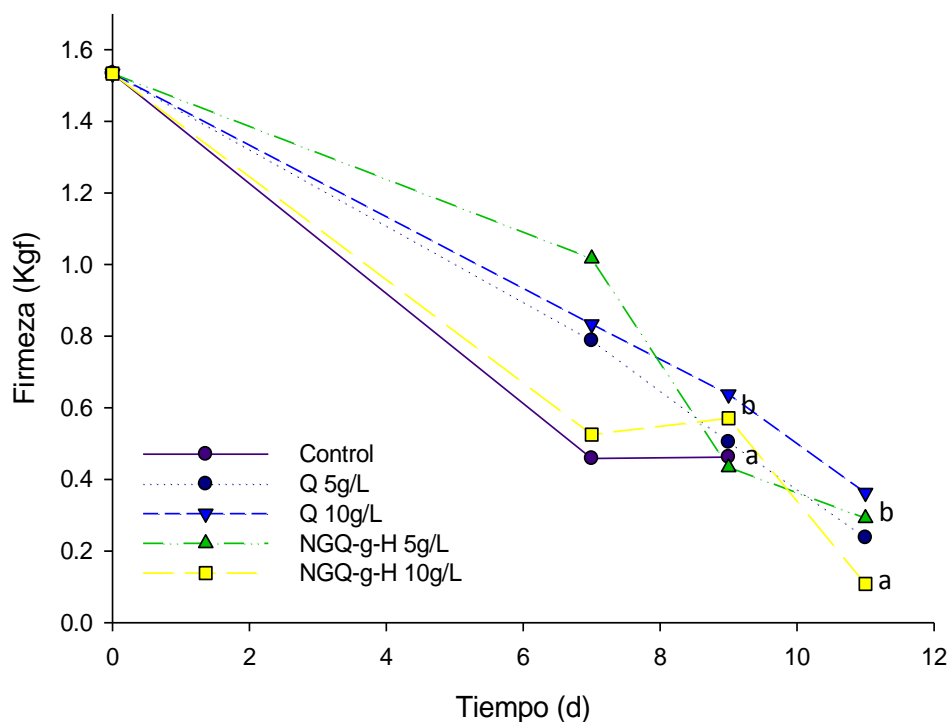


Fig. 11. 9 Firmeza de los frutos control y recubiertos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD

11.3.6.4 Unidades infectadas

A lo largo del bioensayo se determinó la cantidad de unidades infectadas por cada tratamiento, resultando que el control obtuvo un mayor porcentaje por lo que podemos concluir que los frutos con Q y N, tuvieron efecto antimicrobiano, tal como lo mencionan Marmol *et al.* (2011), Brahmachari (2004), Girish y Shankara (2008) (Tabla 11.4).

Tabla 11. 4 Unidades infectadas por hongos

Tratamiento	%UI 7d	%UI 11d
Control	83.3	100
Q 5g/L	25	50
Q 10g/L	50	66.6
NGQ-g-H 5g/L	33.3	58.3
NGQ-g-H 10g/L	50	66.6

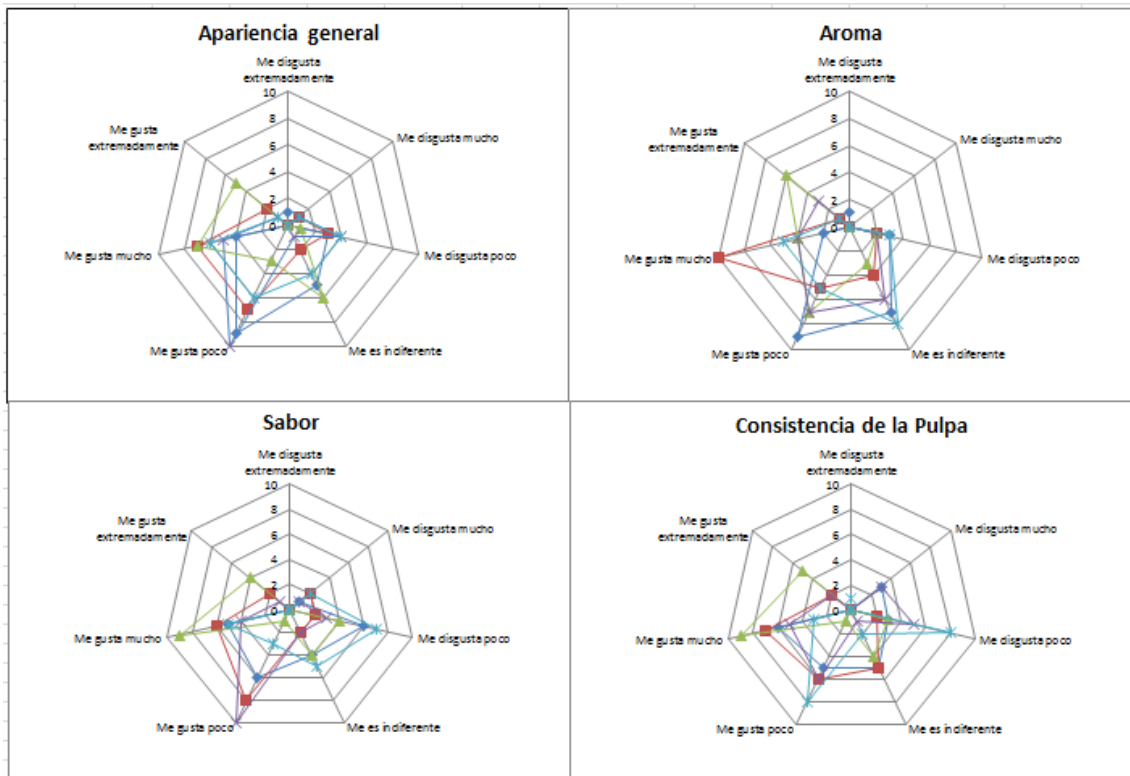
11.3.6.5 Evaluación sensorial

Parra *et al.* (2012), elaboraron pruebas sensoriales en el valle de Tehuacán Puebla con los mismos productores de pitaya a lo que encontraron que las personas pueden tener preferencia por las variedades de pitaya dependiendo de la región, por ejemplo en San Luis Atolotitlán las personas prefirieron variedades rojas, mientras que en Coatepec prefirieron las variedades verdes sobre las rojas; a pesar de ello en general la mayoría de las personas (75%) se inclinó por pitayas de epicarpios delgados en cuanto a su sabor; y a las pitayas con epicarpio más grueso debido a su fácil transporte. Sin embargo, no existe información sobre evaluación de propiedades organolépticas de pitaya cuando los frutos tienen recubrimiento, por lo que se elaboró la evaluación de algunas características sensoriales; es decir, todo lo que se pudo percibir por los sentidos para determinar su aceptación por el consumidor (Barda, 2012), entre las que se encontraron la apariencia general, aroma, sabor y consistencia de la pulpa, donde se clasificó cada tratamiento en una escala hedónica (zona de agrado, indiferente y desagrado) a los 6 y 11 días de la aplicación de los tratamientos.

En la Fig. 11.10, se presenta la comparación sensorial entre los tratamientos. Se observó que para la apariencia general no hubo diferencia significativa ($p > 0.5$) a los 6d

y todos los frutos tratados tuvieron tendencia a la parte de agrado, sin embargo a los 11d únicamente los frutos con NGQ-g-H 10g/L se detectó tendencia al desagrado. Para el aroma a los 6d existió diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tratamientos, siendo los frutos a ambas concentraciones de Q los de mayor agrado, sin embargo no existió diferencia significativa ($p > 0.5$) a los 11d entre los tratamientos ubicándolos a todos en la parte neutra (indiferencia) de la escala hedónica. Los consumidores catalogaron el sabor a los 6d como mayor agrado ambas concentraciones de Q y NGQ-g-H 5g/L como indiferente, mientras que el control y NGQ-g-H 10g/L fueron los frutos que se encontraron en la zona de desagrado; a los 11d los consumidores consideraron a NGQ-g-H 10g/L con un sabor desagradable. Por último, los consumidores catalogaron a los 6d ambas concentraciones de Q como la mejor consistencia en la pulpa siendo así los tratamientos más aceptados, mientras que los frutos con NGQ-g-H 10g/L consideraron que perdieron consistencia causando desagrado, a los 11d consideraron que los frutos más aceptados fueron los recubiertos con ambas concentraciones de Q.

6 d



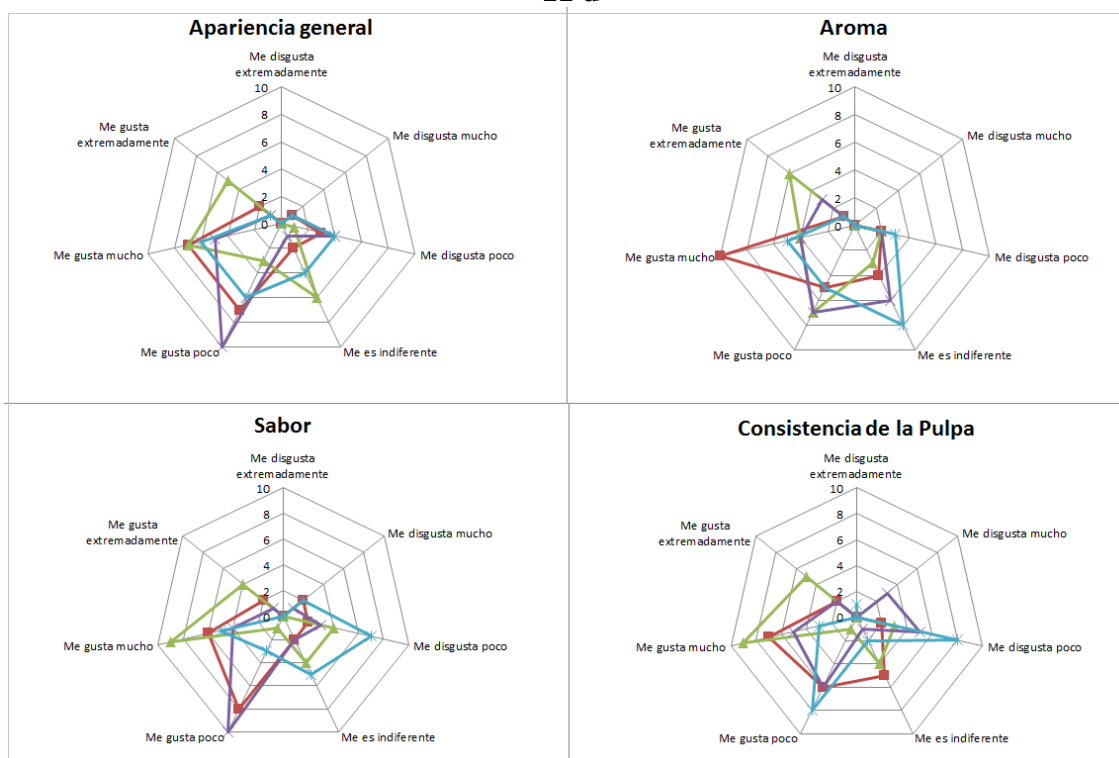







Fig. 11. 10 Evaluación sensorial a los 6 d y 11 d de *Stenocereus pruinosus*. Símbolos Control (); Q5g/L(); Q10g/L(); NGQ-g-H 5g/L(); NGQ-g-H 10g/L().

En resumen, la duración de este bioensayo a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ fue de 4 días, desde la aplicación del tratamiento (7d desde la cosecha). Y la duración del bioensayo a $10\pm 5^{\circ}\text{C}$ fue de 11 días desde la aplicación del tratamiento (14d desde la cosecha), estas últimas con la calidad para su consumo en fresco, contrario a lo reportado por Armella *et al.* (2009), sin embargo hubo oscurecimiento en el epicarpio de los frutos posiblemente debido al efecto prooxidante del aceite de girasol, es decir, que los aceites poseen especies reactivas que son capaces de iniciar o inducir la oxidación (López, 2014; Kargar *et al.*, 2010). Este efecto provocó en los frutos que perdieran apariencia, color y firmeza, por lo tanto afectaron su calidad poscosecha. Por lo que se propuso la modificación de la formulación de la emulsión, sustituyendo el aceite de girasol por aceite mineral grado alimenticio (Jiménez *et al.*, 2009).

11.4 FASE 2: SUSTITUCIÓN DEL ACEITE DE GIRASOL POR ACEITE MINERAL EN LA FASE DISPERSA DE EMULSIONES O/W

11.4.1 Uso de diferentes fases oleosas

Para el tamaño de gota sólo la emulsión de NMQ-g-H 5g/L a $\phi=0.1$ fue la que obtuvo mayor tamaño. También hubo polidispersidad en los sistemas siendo la emulsión NGQ-g-H 5g/L a $\phi=0.3$ la más monodispersa. Para el potencial zeta, todos los tratamientos presentaron un valor cercano a cero. En cuanto al tiempo de cremado la emulsión NGQ-g-H 5g/L a $\phi=0.3$ fue la que tuvo un mayor tiempo de cremado y por lo tanto, la menos inestable según lo reportado por Valdés (2010) (Tabla 11.5).

Sin embargo, y dado que el aceite de girasol pudo haber fungido como agente prooxidante, tal como Kargar *et al.* (2010) reportaron, quienes esclarecían que los aceites usados para emulsiones tipo O/W pueden sufrir oxidación dependiendo de parámetros como luz, temperatura, grado de oxígeno y de instauración del aceite empleado, sin embargo es posible reducir este efecto mediante un cambio de la fase oleosa o bien de la manipulación de las propiedades microestructurales de la emulsión. Razón por lo que se decidió sustituir el aceite de girasol por el aceite mineral por lo que se trabajó con la formulación NMQ-g-H 5g/L a $\phi=0.1$, ya que fue menos polidisperso que la misma emulsión a $\phi=0.3$.

Tabla 11. 5 Resumen de la estabilización de emulsiones usando diferentes fases oleosas

Tratamiento		D (3,0) μm	Span	Potencial zeta (mV)	Tiempo de cremado (min)
NGQ-g-H 5g/L	0.3	0.860 \pm 0.024 a	0.955 \pm 0.007 a	8.440 \pm 0.035 b	720
NGQ-g-H 5g/L	0.1	1.090 \pm 0.010 b	1.720 \pm 0.090 c	0.853 \pm 0.160 a	12
NMQ-g-H 5g/L	0.3	1.440 \pm 0.050 b	1.820 \pm 0.090 c	9.140 \pm 1.990 b	480
NMQ-g-H 5g/L	0.1	2.770 \pm 0.390 c	1.280 \pm 0.010 b	1.080 \pm 0.670 a	470

Letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p<0.5$)

Para todos los casos, las emulsiones sufrieron un proceso de cremado debido a la inestabilidad del sistema (Delgado, 2008).

11.4.2 PVA como cotensoactivo

Debido a los resultados obtenidos en el experimento 11.4.1 y dado la poca estabilidad de las emulsiones, en 2010 Hoon Oh, *et al.*, reportaron el uso de una mezcla de tensoactivos (Tween20:Tween80) y de Polivinil alcohol (PVA) como cotensoactivo, en una relación 5:1. Mientras que en el mismo año Sharma *et al.*, reportó el uso de 3% PVA para encapsulados de hidrocarburos aromáticos en quitosano-alginato.

Por lo que se propuso el uso de PVA (polímero anfifílico) como cotensoactivo, a diferentes concentraciones ya que de acuerdo a lo reportado por Aranberri *et al.* (2006) el PVA incrementa la viscosidad de las emulsiones, lo que conlleva que la fase continua impida el movimiento de la fase dispersa, por lo tanto, la probabilidad de que dos gotas se acerquen y se agreguen. Cuyas variables respuestas fueron el tamaño de gota, dispersidad del sistema, potencial zeta y tiempo de cremado.

En la tabla 11.6, se observó que los sistemas son polidispersos y estuvieron alejados de la unidad (sistema monodisperso ideal), sin embargo en las concentraciones de 10g/L y 100g/L no hubo diferencia significativa entre ellas. Se observó que el potencial zeta se incrementó en este bioensayo donde el tratamiento a 100g/L fue el que reportó un valor mayor. En las micrografías de las emulsiones (Fig. 11.12) se observó que los tamaños de las gotas son muy variados, por lo tanto cuando se acercaron las gotas de estas se agregaron, llevando con ello la separación de las fases. Por lo tanto se decidió trabajar con 100g/L PVA ya que fue el sistema con mayor tiempo de cremado.

Tabla 11. 6 Resumen de la estabilización de emulsiones con PVA como cotensoactivo

Porcentaje de Estabilizante	D (3,0) (µm)	Span	Potencial zeta (mV)	Tiempo de cremado (min)
10g/L PVA	1.32± 0.07 a	2.12 ± 0.07 a	18.9 ± 0.79 b	30
30g/L PVA	1.35 ± 0.00 a	2.53 ± 0.10 b	17.66 ± 0.61 b	20
50g/L PVA	1.37± 0.02 a	2.51 ± 0.14 b	15.00 ± 0.70 a	24
100g/L PVA	1.37± 0.40 a	2.2 ± 0.09 a	22.3 ± 0.33 c	38

Letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer (p<0.5)

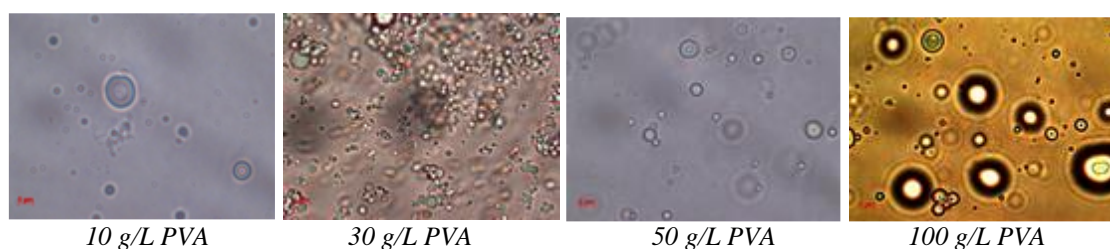


Fig. 11. 11 Micrografías de la polidispersidad de las emulsiones (100x) usando PVA como cotensoactivo.

11.4.3 Uso de diferentes emulsionantes

Debido a los resultados obtenidos en el bioensayo 11.4.2, se seleccionó una mezcla de emulsionantes, esto recomendado por Muñoz *et al.* (2007) quienes optimizaron las mezclas de los emulsionantes a través de su balance hidrófilo lipófilo (HLB). Los emulsionantes son de naturaleza anfifílica, pero pueden tener una mayor o menor tendencia a solubilizarse en medio oleoso o acuoso, dependiendo de la importancia relativa de sus grupos hidrófilos (cabezas polares) e hidrófobos (cadenas largas hidrocarbonadas, $C \geq 12$). Si el emulsionante tiende a ser soluble en agua será útil para formar emulsiones O/W. El HLB indica la tendencia dominante, hidrófila o lipófila del emulsionante en una formulación. Los emulsionantes con número HLB comprendido entre 8 y 18 se recomiendan para formar este tipo de emulsiones (St. Angelo, 1989).

Hoon Oh, *et al.*, 2010, reportaron el uso de una mezcla de emulsionantes entre Tween20:Tween80 (con HLB de 16.7 y 15 respectivamente), por lo que se propuso trabajar con la mezcla de emulsionantes para mejorar la estabilidad de emulsiones O/W. Las variables respuesta fueron el tamaño de gota, dispersidad de sistema, potencial zeta y tiempo de cremado.

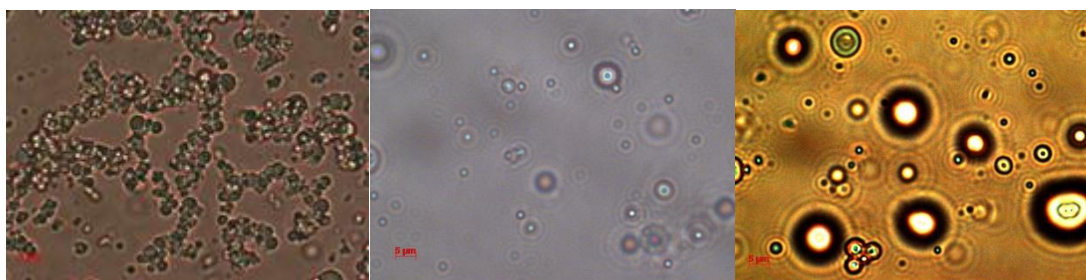
Para este bioensayo existió diferencia significativa ($p < 0.05$) para los tamaños de gota y el potencial zeta. Siendo la de menor tamaño la mezcla emulsionante 70g/L Tween20 : 30g/L Tween80, y el mayor para la concentración 90g/L Tween20 : 60g/L Tween80. En cuanto a la polidispersidad no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) y ninguno estuvo cerca de la unidad por lo que no tuvimos sistemas homogéneos, tal como se observó en las micrografías de la Fig. 11.12. Para el potencial zeta se observaron 2 grupos diferentes siendo la emulsión de la mezcla 60g/L Tween20 : 40g/L Tween80 con un mayor potencial zeta. Para el tiempo de cremado todas las formulaciones resultaron

cremadas, siendo la emulsión con 90g/L Tween20 : 60g/L Tween80 la que prolongó este tiempo, ya que hubo separación de fases a los 45 min de su preparación (Tabla 11.7).

Tabla 11. 7 Resumen de la estabilización de emulsione usando diferentes emulsionantes

Concentración de emulsionante	D (3,0) μm	Span	Potencial zeta (mV)	Tiempo de cremado (min)
70g/L Tween20 – 30g/L Tween80	1.280 \pm 0.005 a	1.930 \pm 0.090 a	6.050 \pm 0.330 a	35
60g/L Tween20 – 40g/L Tween80	1.340 \pm 0.010 b	2.280 \pm 0.340 a	22.400 \pm 1.210 b	30
90g/L Tween20 – 60g/L Tween80	1.390 \pm 0.10 c	1.930 \pm 0.020 a	20.100 \pm 1.300 b	45

Letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.5$)



70g/L Tween20 :
30g/L Tween 80

60g/L Tween20 :
40g/L Tween 80

90g/L Tween20 :
60g/L Tween 80

Tabla 11. 8 Micrografías de la polidispersidad de las emulsiones (100x) usando diferentes emulsionantes

Por lo tanto, la emulsión más estable fue la emulsión que tuvo como fase dispersa el aceite mineral con una fracción másica de 0.1, Tween80 como emulsionantes 90g/L Tween20 : 60g/L y como cotensoactivo 100g/L PVA. Esta emulsión fue aplicada sobre frutos de xoconostle dulce, ya que debido a la época de cosecha no fue posible hacerlo en pitaya, pero si en este fruto que pertenece a la misma familia y género.

11.4.4 BIOENSAYO 5

Se determinó la pérdida fisiológica de peso del xoconostle dulce a lo que obtuvo diferencias significativas ($p < 0.5$) entre los tratamientos, resultando 3 grupos diferentes por la prueba de medias LSD, siendo el primer grupo NMQ-g-H 5g/L y Q 5g/L, en el segundo grupo el control y Q-g-H 5g/L y en el último grupo H 10g/L (Fig. 11.13), a pesar de que no existe reporte (ScienceDirect y Web of science) sobre la aplicación de recubrimientos sobre estas cactáceas se observó la misma tendencia que con la aplicación de los recubrimientos sobre la pitaya, obteniendo que la funcionalización de Q no logró mejorar la PFP de los frutos, comparado con el control lo que podemos atribuir a la baja concentración de Q y alta concentración de H por lo que este recubrimiento es hidrofílico permitiendo mayor permeabilidad al vapor de agua (Alonso et al., 2010; Nicio, 2011), comparado con el recubrimiento de Q y de NMQ-g-H 5g/L, cuyo aceite le confiere hidrofobicidad evitando la permeabilidad al vapor de agua (Kester y Fennema, 1986; Ramos *et al.*, 2010).

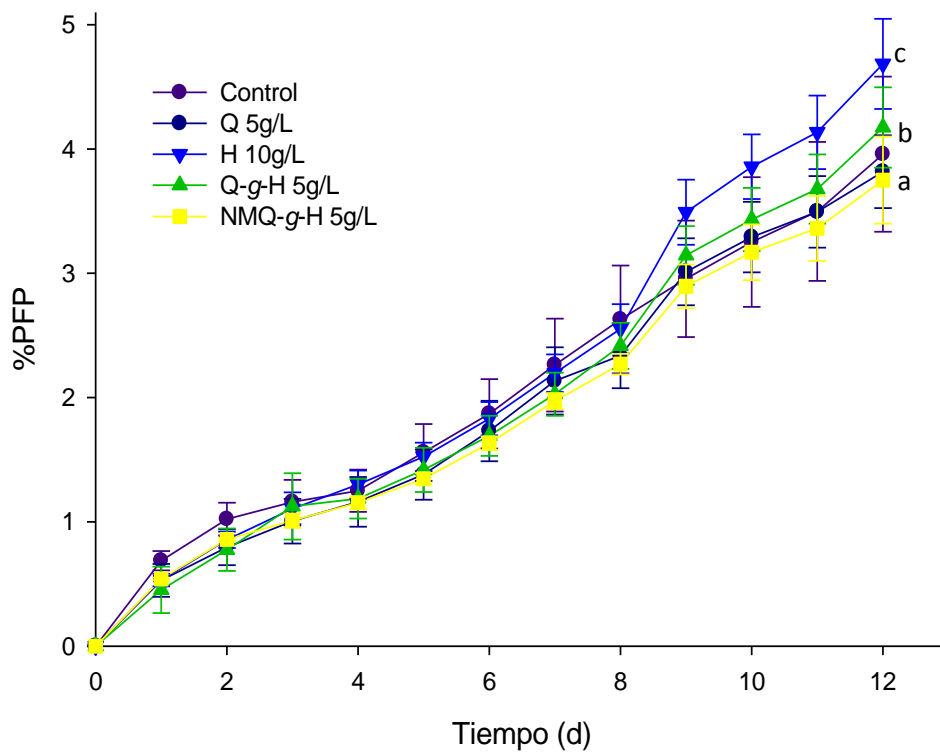


Fig. 11. 12 PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD

Por lo que podemos concluir que los mejores tratamientos son el Q y la NMQ-g-H 5g/L, ya que lograron que los frutos perdieran menor PFP y con la nueva formulación de la emulsión se logró eliminar el efecto de la prooxidación, como se observa en la fotografía (Fig. 11.13).

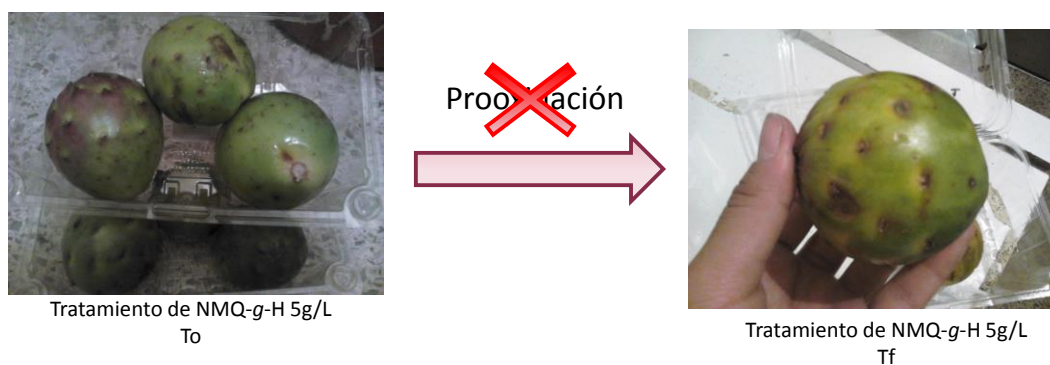


Fig. 11. 13 Fotografías de tratamientos NMQ-g-H 5g/L al inicio y final del bioensayo.

De igual manera que en la Tabla 11.8, se obtuvo el porcentaje de unidades infectadas sobre los frutos a los 12 días de la aplicación de los recubrimientos, siendo todos los tratamientos menor al control, por lo que pudimos concluir que existió efecto antimicrobiano de los tratamientos, donde el Q-g-H 5g/L fue el tratamiento que no obtuvo unidades contaminadas (posiblemente debido al acomodo de las cajas durante el almacenamiento ya que en los bioensayos anteriores si hubo contaminación por hongos), seguido de Q 5g/L. Con este bioensayo se corroboró una vez más el efecto antimicrobiano del Q y del N (Marmol *et al.*, 2011; Brahmachari, 2004; Girish y Shankara, 2008).

Fig. 11. 14 Unidades infectadas por hongos a 12 días de la aplicación

Tratamiento	%Unidades infectadas
Control	33.3
Q 5g/L	11.1
H 10g/L	22.2
Q-g-H 5g/L	0
NMQ-g-H 5g/L	22.2

11.5 FASE 3: ESTABILIZACIÓN DE EMULSIONES

Dado que la estabilización de la emulsión no era la óptima, se buscó un sistema cuyas propiedades permitieran tiempos de cremado prolongado, idealmente se buscan sistemas con pequeño tamaño de gota, monodispersos, y con alto potencial zeta, sin embargo generalmente este sistema no se logra conseguir. Para ello, Nitcharacter (2014) afirmó que la polidispersidad de una emulsión depende de la técnica de homogenización empleada, y que el factor más importante que afecta al potencial zeta es el pH, por lo que en este último rubro la medición del potencial zeta a diferentes pH nos proporcionó información acerca de la estabilidad de su sistema, por ejemplo, nos dio el valor del punto isoeléctrico (pH al cual el potencial zeta es cero y es el punto donde el sistema es menos estable).

Según los reportes de Espinoza *et al.* (2009) y Pérez (2011), quienes propusieron el uso de goma arábica (GA) y goma de mezquite (GM) respectivamente, para la estabilización de emulsiones a base de quitosano, se decidió usar GM, como estabilizante ya que los usados hasta el momento (Tween) fueron de bajo peso molecular por lo tanto no fueron capaces de emulsionar con el biopolímero, además que estos y según lo reportado por Kargar *et al.* (2010) el uso de Tween puede aumentar la tasa de oxidación de los aceites debido que tiene una capacidad para formar una capa interfacial de bajo espesor alrededor de las gotas de aceite.

Se determinó el potencial zeta a diferentes pH de los materiales usados y propuestos para la formulación de la emulsión, obteniendo como resultados (Fig. 11.15) que Q disminuye su potencial zeta a medida que el pH se incrementaba, contrario a lo que ocurrió con la GM, también se determinaron estos valores para el Q-g-H a lo que se obtuvo que independientemente a los valores de pH el potencial zeta se mantiene cercano a cero, por lo que esto fue la principal limitante para la estabilización de la emulsión ya que con ello se perdió la funcionalidad para anclarse en la interfase, por lo que para los próximos bioensayos se decidió trabajar solo con el Q nativo, ya que es el biopolímero de interés por sus propiedades antimicrobianas.

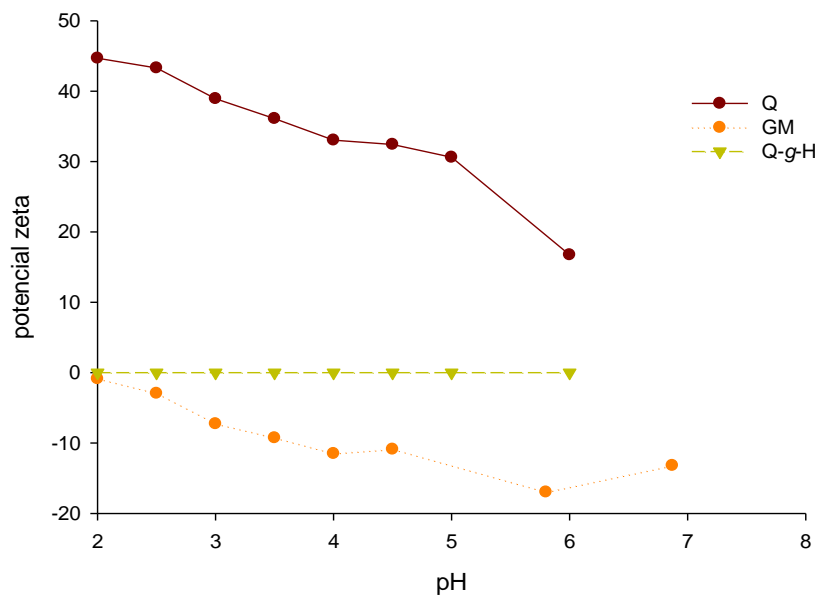


Fig. 11. 15 Perfil de cambios del potencial zeta de Q, GM y Q-g-H a diferentes pH.

Se construyeron gráficas de potencial zeta contra pH y a partir de éstas se determinó el valor de pH donde existe la máxima diferencia estequiométrica de cargas electrostáticas entre los Q y GM, este valor se registró a 4.5 de pH.

11.5.1 Goma de mezquite como estabilizante.

Ruiz (2004) y Rendon *et. al.* (2010), propusieron una relación de 100g/L GM : 6g/L Q, mientras que Pérez (2011) sugirió una relación de 100g/L GM : 4g/L Q, ambos obtuvieron una emulsión estable.

Por lo que se estableció una relación para la emulsión 100g/L GM : 5g/L Q (que fue la concentración establecida de Q en la fase *in vivo*), a dos fracciones másicas dispersas (ϕ) de 0.1 y 0.3, cabe mencionar que se ajustó el sistema a un pH de 4.5. Las variables respuesta fueron: tamaño de gota, polidispersidad del sistema, potencial zeta y tiempo de cremado. Los resultados de este bioensayo se encuentran resumidos en la Tabla 11.9.

Tabla 11. 9 Resumen de la estabilización de emulsiones usando GM como estabilizante

Tratamiento	ϕ	D (3,0) μm	Span	Potencial zeta (mV)	Tiempo de cremado (h)
100g/L GM : 5g/L Q	0.1	1.62±0.01 b	6.02±0.19 b	-3.88±0.33 b	1.5
100g/L GM : 5g/L Q	0.3	1.58±0.01 a	2.43±0.11 a	-11.20±0.82 a	30

Letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.5$)

En la tabla 11.9, se observó que existe diferencia significativa ($p < 0.05$) para todas las variables respuesta, donde a través de la comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer se diferenciaron dos grupos, siendo el tratamiento de $\phi = 0.1$ con el menor tamaño de gota y el sistema más polidisperso, la emulsión a $\phi = 0.3$ tuvo un potencial zeta más alejado de cero. Para ambos casos se incrementó el tiempo de cremado.

11.5.2 Uso de dos métodos de homogenización

Hasta este momento la mayoría de las pruebas de las emulsiones presentaron baja estabilidad, por lo que se decidió estabilizar los dos tratamientos, se probaron dos métodos de homogenización (Nitcharacter, 2014) el primero de ellos, fue el ya usado que consistió en un rotor/estator (ultraturrax) y el segundo por ultrasonificación, con ellos se buscó disminuir los tamaños de gota, así como una distribución de las mismas para sistemas más homogéneos (Pérez *et al.*, 2002).

El primer método constó de un conjunto de un rotor de dos palas y un estator vertical o ranuras inclinadas alrededor de la pared del homogenizador; el rotor estaba alojado concéntricamente en el interior del estator, a medida que el rotor giraba, se generó un campo de cizallamiento que redujo el tamaño de gota (Maa *et al.*, 1996). Mientras que el segundo método ultrasonificación consistió en la deformación elástica de materiales, dentro de un campo eléctrico de alta frecuencia causada por la mutua atracción de moléculas polarizadas en el campo (Raichel, 2000), a través de la cavitación gaseosa, que se produce en aquellas regiones de un líquido que se encuentran sometidas a presiones de alta amplitud que alternan rápidamente (Robles *et al.*, 2012).

Se propuso, elaborar las emulsiones a las condiciones 100g/L GM : 5 g/L Q a una relación másica dispersa (ϕ) de 0.1 y 0.3. Las fuentes de variación fueron el equipo de homogenización empleado así como un rango de pH (3, 3.5, 4 y 4.5), las variables respuesta fueron: tamaño de gota, dispersidad del sistema, potencial zeta y tiempo de cremado.

11.5.2.11 Homogeneizador rotor/estator

Para el uso del rotor/estator (Ultraturrax) hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) para el tamaño de gota a $\phi = 0.1$ siendo el mayor tamaño la emulsión a pH de 4.5, sin embargo no hubo diferencia significativa para $\phi = 0.3$. Para la variable respuesta dispersidad y para potencial zeta existió diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos siendo la emulsión $\phi = 0.1$ a pH 4.5 el sistema más monodisperso que el resto y también fue quien obtuvo un potencial zeta más elevado, sin embargo, para todos los casos las emulsiones no duraron más de media hora, ya que sufrieron cremado (Tabla 11.10).

Tabla 11. 10 Resumen de la estabilización de emulsiones a diferentes pH por homogeneizador rotor/estator (Ultraturrax).

Ultraturrax						
pH	D(3,0) μm		Span		Potencial zeta (mV)	
	$\phi = 0.1$	$\phi = 0.3$	$\phi = 0.1$	$\phi = 0.3$	$\phi = 0.1$	$\phi = 0.3$
3	1.67 \pm 0.006 a	1.89 \pm 0.012 a	5.53 \pm 0.365 D	2.36 \pm 0.072 b	-6.57 \pm 1.201 c	1.59 \pm 0.337 d
3.5	1.65 \pm 0.006 a	1.88 \pm 0.006 a	3.88 \pm 0.14 C	2.22 \pm 0.044 b	-8.43 \pm 0.279 b	-8.56 \pm 0.335 c
4	1.74 \pm 0.078 a	1.94 \pm 0.006 a	2.59 \pm 0.05 B	2.25 \pm 0.032 b	-14.66 \pm 0.577 a	-10.86 \pm 0.681 b
4.5	5.99 \pm 1.309 b	1.95 \pm 0.000 a	0.79 \pm 0.401 A	1.84 \pm 0.012 a	-14.93 \pm 0.737 a	-11.2 \pm 0.819 a

Letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.5$)

11.5.2.2 Homogeneizador Ultrasonicación

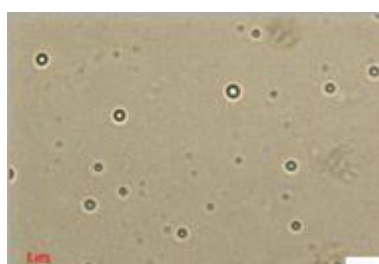
Para el caso del uso de ultrasonicación hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos para cada variable respuesta, a lo que se observó (Tabla 11.11), que la emulsión de $\phi = 0.1$ y pH 4.5 fue la que tuvo menor tamaño de gota y potencial zeta, y aunque esta no fue el sistema más monodisperso (Fig. 11.16), si prolongo el tiempo de cremado, ya que las emulsiones de $\phi = 0.3$ son las que se cremaron primero, teniendo

una duración menor a 1 hora para los pH 3 y 3.5, 24 horas para el pH 4. Mientras que las emulsiones a $\phi=0.1$ a los pH de 3 y 3.5 no sobrepasaron las 3 horas para cremarse, 48 horas para el pH 4. Sin embargo para ambas fracciones másicas a pH de 4.5 se conservaron por más tiempo.

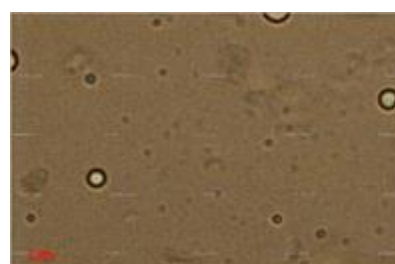
Tabla 11. 11 Resumen de la estabilización de emulsiones a diferentes pH por Ultrasonido

Ultrasonificación						
Ph	D(3,0) μm		Span		Potencial ζ (mV)	
	$\phi=0.1$	$\phi=0.3$	$\phi=0.1$	$\phi=0.3$	$\phi=0.1$	$\phi=0.3$
3	1.12 \pm 0.006 b	8.66 \pm 1.107 b	1.58 \pm 0.006 C	1.12 \pm 0.002 a	-2.61 \pm 0.878 c	1.16 \pm 0.394 b
3.5	1.69 \pm 0.982 c	1.15 \pm 0.000 a	1.17 \pm 0.017 A	1.64 \pm 0.01 b	-14.1 \pm 0.7 b	-14.9 \pm 1.709 a
4	1.08 \pm 0.093 b	1.33 \pm 0.006 a	1.42 \pm 0.011 B	1.83 \pm 0.3 c	-21.56 \pm 0.907 a	-16.63 \pm 2.684 a
4.5	0.393 \pm 0.006 a	1.04 \pm 0.036 a	1.86 \pm 0.005 D	2.83 \pm 0.141 d	-21.83 \pm 0.971 a	-17.1 \pm 0.872 a

Letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.5$)



NMQ-g-H 5g/L ($\phi=0.1$)



NMQ-g-H 5g/L ($\phi=0.3$)

Fig. 11. 16 Micrografías de la polidispersidad de las emulsiones (100x).

Por lo tanto, se observó que las emulsiones elaboradas por ultrasonificación en general son sistemas con mayor tamaño de gota y más homogéneos, a un pH de 4.5 a $\phi=0.1$ y 0.3 tuvieron mayor estabilidad, por lo que se caracterizaron a lo largo de un periodo de tiempo ya que con ellos se estimó el tiempo aproximado de cremado (Valdez, 2010).

11.6 CARACTERIZACIÓN DE LAS EMULSIONES

11.6.1 Cinética de cremado

Se calculó el diámetro volumétrico a lo largo de 30 días (Fig. 11.17) con ello se estimó la velocidad de cremado. Obteniéndose para la emulsión de $\phi=0.3$ de 0.13cm/d por lo que se estimó un cremado a 1 mes 15 días. Mientras que para $\phi=0.1$ la velocidad de cremado fue de 0.015cm/d por lo que se estimó un cremado total de 1 año 2 meses.

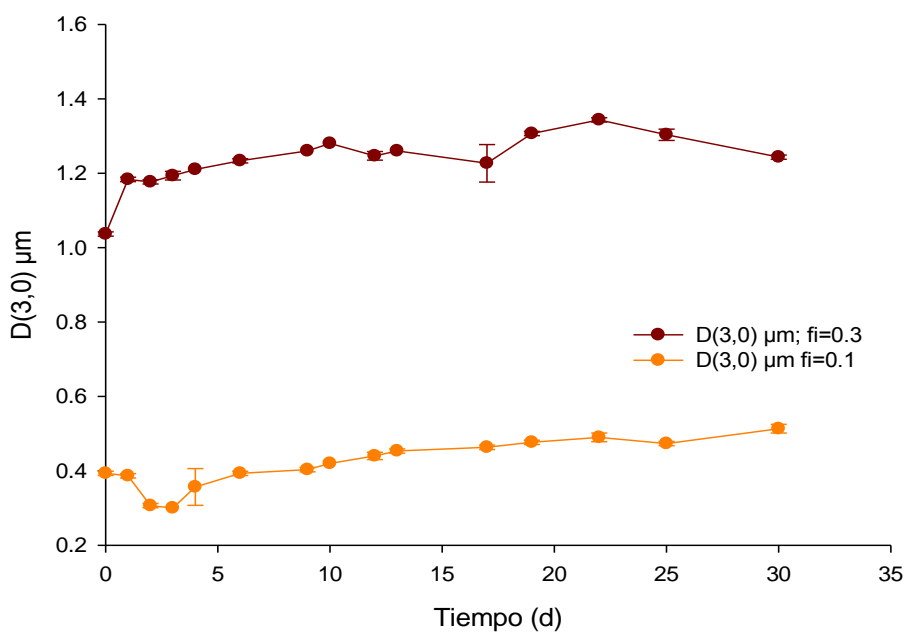


Fig. 11. 17 Cinética de cremado de la emulsión a lo largo del tiempo.

Dados los resultados obtenidos en esta fase, se decidió continuar con la caracterización de la emulsión 100g/L GM : 5g/l Q a una ϕ de 0.1, porque fue la que presento mayor estabilidad ya que la coalescencia se disminuyó debido a que el tamaño de gota mostro menor variación a lo largo del tiempo. Además, la disminución de la fracción másica dispersa utilizada en esta emulsión es benéfico para el medio ambiente ya que este aceite es un derivado del petróleo por lo tanto es un contaminante de suelo y agua (Castro, 2007).

11.6.2 Eficiencia de encapsulación

Se determinó la eficiencia de encapsulado (%) del aceite de neem, obteniéndose un valor de $88.5\% \pm 0.99$, lo que fue un valor aproximado (89%) de lo que reportaron Rendón *et al.* (2010) quienes encapsularon aceite de linaza en una matriz polimérica de 100g/L GM : 6g/L Q.

11.6.3. Cambio de color de la emulsión

A lo largo de 20 días se monitoreo el cambio de color, para observar si este influye sobre los frutos, a lo que se observó que para la luminosidad (L^*) y la saturación (C^*) no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) a lo largo del tiempo. Sin embargo, para el ángulo de Hue (h) (Fig. 11.18) se observó diferencia significativa ($p < 0.05$), pero a lo largo del tiempo se mantuvo en la gama de los amarillos. Por lo que una vez aplicado sobre los frutos estos no debieron cambiar el color de su epicarpio a lo largo de su vida poscosecha.

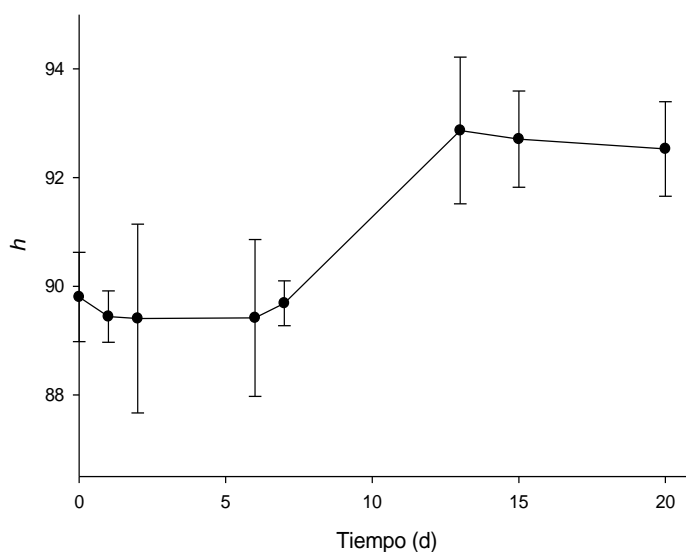


Fig. 11. 18 Cambio de tono representado por el ángulo de Hue (h) de la emulsión a lo largo de 20 d

11.6.4 Liberación de azadiractina

Jerobin *et al.* (2012), propusieron determinar la liberación de Azadiractina, por lo que se determinó la absorbancia a 214nm por duplicado de la emulsión durante 20 días a diferentes pH. Se obtuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) a los diferentes pH (Fig. 11.19), en letras se encuentra la comparación de medias por la prueba de Tukey-Kramer. En la gráfica (Fig.11.19), se observó que a menor pH la liberación fue más

rápida, y que en el inicio de este experimento no inicio de origen la liberación, esto debido a que existió aceite libre ya que no tuvimos un 100% de eficiencia de encapsulado como se mencionó anteriormente. Por lo tanto, desde los 15 días la liberación se mantuvo constante para el pH 2.5, mientras que para el grupo conformado por los pH 3, 3.5 y 4 la liberación se mantuvo constante desde los 11 días. Para el pH de 4.5 se observó que la liberación fue menor sin embargo existió, esto se lo atribuimos a la reestructuración que sufrió la emulsión al tener contacto con el gradiente debido a que contenía mayor cantidad de agua. Además, esto se corrobora con el perfil de potencial zeta (Fig.11.15) donde el sistema es más estable a un pH de 4.5 ya que a menores pH se encontró que disminuía el potencial electrostático de las emulsiones, lo que promovió la liberación del aceite.

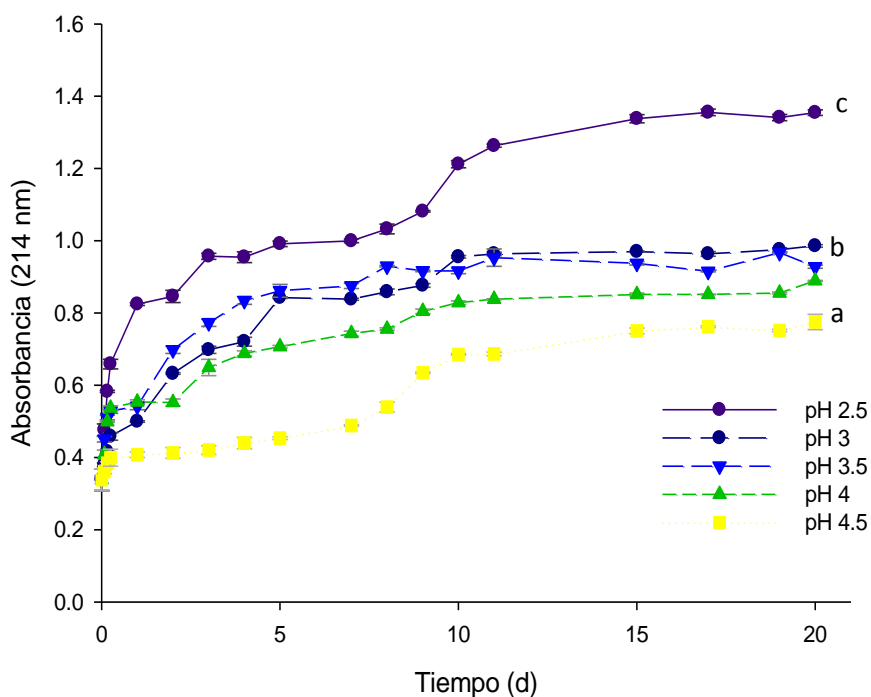


Fig. 11. 19 Liberación de Azadiractina por efecto de pH a lo largo de 20 d, donde las letras representan la comparación de medias efectuada por la prueba de Tukey-Kramer ($p < 0.5$)

11.6.5 Espectrometría de infrarrojo FTIR-ATR

Se realizó la espectrometría de infrarrojo ATR-FTIR con el objetivo de observar la presencia grupos funcionales del aceite de Neem, GM y Q en la emulsión se observaron los picos en 2922 y 2852 cm^{-1} correspondientes a un anillo aromático y a un grupo alifático C-H, respectivamente. Donde el grupo aromático correspondió a la

azadiractina. Para el aceite de Neem se observaron bandas en 1744 cm^{-1} correspondientes a un ácido carboxílico (COOR) (Jerobin *et. al.*, 2012; Bage *et. al.*, 2012). Para la emulsión, a una frecuencia de 3336 cm^{-1} se observó la presencia de un grupo O-H perteneciente a la GM, mientras que hay una banda de a 1590 cm^{-1} correspondiente a la amina del Q (Nicio, 2011) (Fig. 11.20).

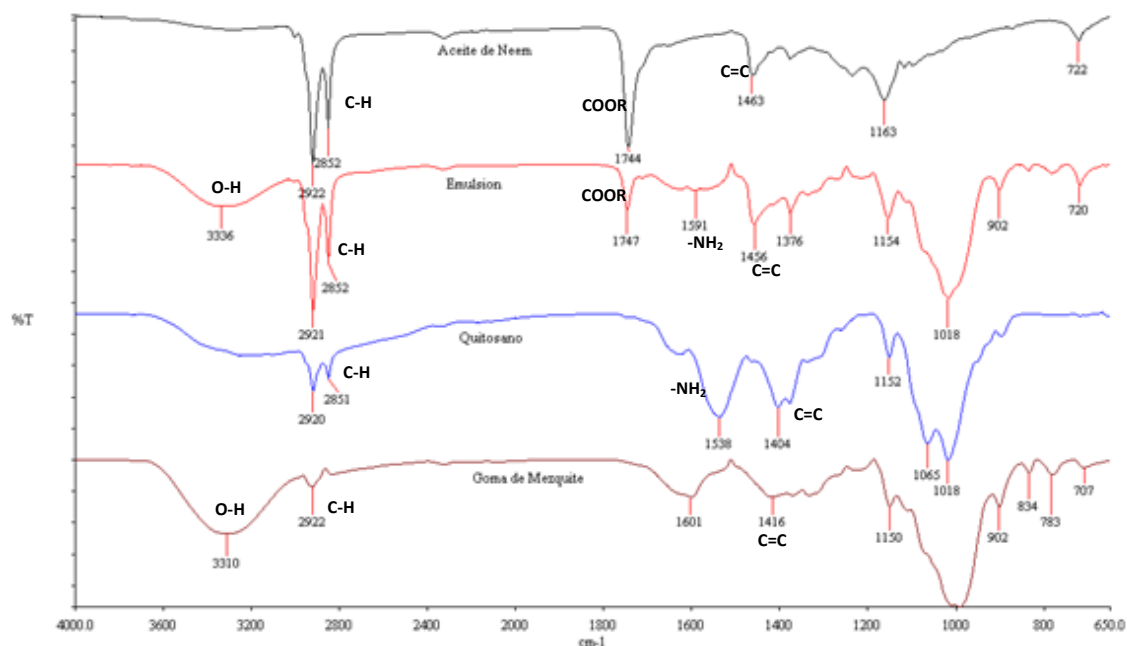


Fig. 11. 20 Espectros infrarrojo FTIR-ATR de N, Emulsión, Q y GM, para observar la presencia de azadiractina al inicio del bioensayo de liberación.

En esta imagen se muestra la emulsión en el tiempo cero, y las emulsiones a los diferentes pH después de 20 días a lo que se observó que todos los picos estuvieron presentes del día 0 al 20. Y que los picos característicos de la azadiractina (2922 y 2852 cm^{-1}) se mantuvieron lo que nos indica que el principio activo se liberó de manera prolongada con el tiempo y que este no sufrió degradación (Fig. 11.21).

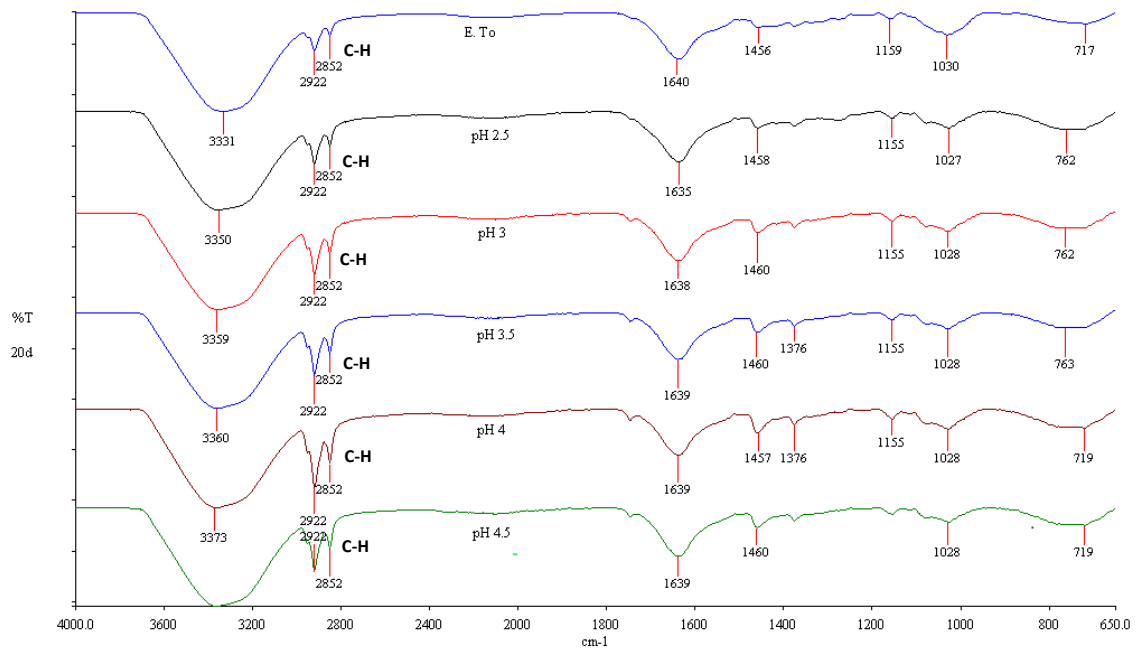


Fig. 11. 21 . Espectros infrarrojo FTIR-ATR de Emulsión, a diferentes pH para observar la presencia de azadiractina al final del bioensayo de liberación.

11.6.6 Permeabilidad al vapor de agua (WVP)

La WVP por sus siglas en inglés se midió a $10\pm 5^{\circ}\text{C}$, simulando las condiciones de almacenamiento de los frutos, en donde la HR de la celda de prueba fue de 30% correspondiente a la humedad promedio que tiene el estado de Oaxaca (donde se aplicaron recubrimientos en los bioensayo *in vivo* del 4), mientras la humedad de la cámara ambiental fue la humedad promedio en el refrigerador (75%), también se llevó a cabo la prueba invirtiendo el gradiente de humedad con lo que se observó el comportamiento de los recubrimientos.

Se observó una relación directa entre el peso de las películas y su espesor. Los factores que determinaron el espesor de las películas, fueron la composición de la solución formadora de película, la cantidad de solución añadida a las placas y el área superficial de las mismas (López, 2013). Las películas de Q empleado tuvieron un espesor de película 0.035 ± 0.01 mm, mientras que la GM tuvo un espesor de 0.354 ± 0.01 mm mientras que la emulsión (NMQGM) tuvo un espesor 0.367 ± 0.15 mm.

Los valores de espesor fueron importantes ya que se observó un efecto debido a éste en la WVP; se observó que a medida que el espesor de la película aumentaba, se incrementaba la resistencia a la transferencia de masa a través de ella, en consecuencia,

la presión parcial de vapor de agua de equilibrio en la superficie inferior de la película se incrementó (Bertuzzi et al., 2002).

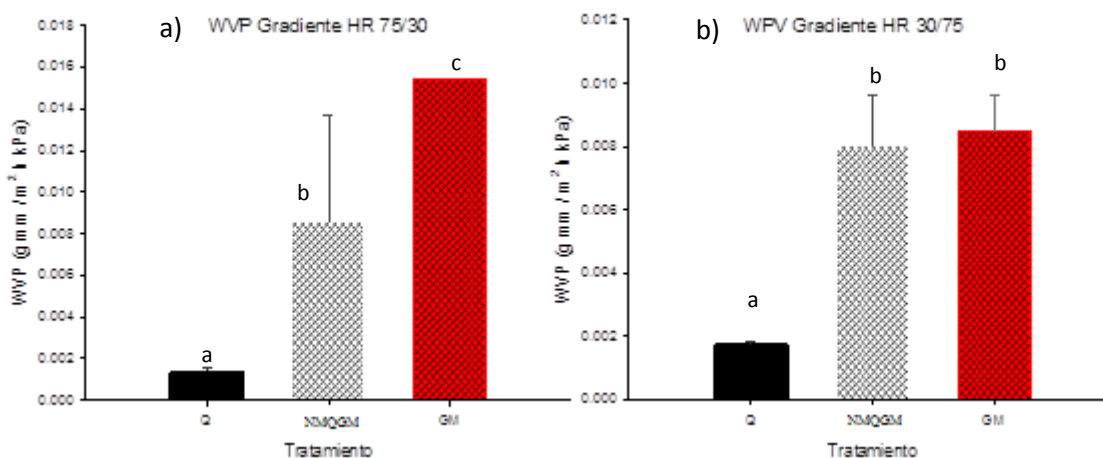


Fig. 11. 22 Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de películas de Q, NMQGM y GM en gradiente de humedad relativa (HR): a)HR 75/30 y b) HR 30/75. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer.

Existió diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$) a ambos gradientes, siendo el Q el que obtuvo menores valores $5.82 \times 10^{-5} \text{ mm/m}^2 \text{ h kPa}$ para gradiente 75/30, y $7.17 \times 10^{-5} \text{ mm/m}^2 \text{ h kPa}$ para gradiente 30/75% (Fig. 11.22). La WVP de las películas de Q se encontraron por debajo de las reportadas por Di Pierro *et al.* (2011), con valores de $0.0167 \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$ para un gradiente 0/100% y por debajo de los valores que reportó López (2013) $6.96 \times 10^{-4} \text{ mm/m}^2 \text{ h kPa}$ para un gradiente 22/75% y $1.53 \times 10^{-3} \text{ mm/m}^2 \text{ h kPa}$ para un gradiente 75/22%. Sin embargo, a pesar de que existen en la literatura valores de WVP reportados para películas de Q, no son comparables en su totalidad ya que se ha demostrado que la permeabilidad de las películas hidrofílicas está relacionado directamente con el gradiente de HR (Miranda *et al.*, 2003), por lo tanto es necesario que los valores reportados concuerden con las condiciones del bioensayo. En la literatura no existe reportes sobre la WVP de películas con GM en este bioensayo obtuvimos $6.4 \times 10^{-4} \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$ para gradiente 75/30, y $3.52 \times 10^{-4} \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$ para gradiente 30/75%. Finalmente, Ruiz (2004) reportó que WVP para una emulsión (conformada con 10%GM, 0.6%Q, cera de candelilla y aceite mineral) fue de $0.1 \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$ a 25°C , que son valores más elevados de los que obtuvimos para las películas de la emulsión $3.54 \times 10^{-4} \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$ para gradiente 75/30, y $3.32 \times 10^{-4} \text{ g mm/m}^2 \text{ h kPa}$ para gradiente 30/75, esta variación pudo deberse al gradiente de

humedad relativa, temperatura y propiedades fisicoquímicas de las películas. Sin embargo, y contrario a lo esperado, la emulsión tuvo mayor WVP que el quitosano lo que se pudo atribuir a la alta concentración de GM y su naturaleza hidrofílica (Ruíz, 2004).

En resumen, una vez que se caracterizó la emulsión más estable se evaluó su efecto sobre pitaya, comparando entre los mejores tratamientos en las fases *in vivo* sobre xoconostle dulce (NMQ-g-H 5g/L y Q 5g/L), y se decidió comprobar el efecto Q a una menor concentración y de Q comercial, obteniéndose los resultados siguientes:

11.7 BIOENSAYO 6

11.7.1 Pérdida fisiológica de peso

Se observó diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los tratamientos, logrando NMQ-g-H 5g/L y Q tanto el B-Q como el comercial lograron prolongar la vida poscosecha de los frutos, siendo esta emulsión y el Q 5g/L los que redujeron la PFP de los frutos al final de este bioensayo, ya que el control solo logró una vida poscosecha de solo 8 días, lo cual es consistente con lo obtenido en el bioensayo 4. Sin embargo, los tratamientos con GM prolongaron solo por un corto tiempo la vida poscosecha (8d), debido a que la goma es muy susceptible a hongos porque su estructura contiene azúcares simples (L-arabinosa, L-ramnosa, β -D-glucuronato y 4-o-metil- β -D-glucuronato) y cadenas laterales de oligosacáridos (Pérez *et al.*, 2011) que pueden ser aprovechadas como sustrato (Fig, 11.23).

En cuanto a los tratamientos con y sin emulsión hubo diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$) los 8 días del bioensayo, donde los frutos recubiertos con emulsiones perdieron menor peso en promedio debido a que presentaron una baja polaridad lo que presentó una escasa permeabilidad al vapor de agua (Kester y Fennema, 1986; Ramos *et al.*, 2010), sin embargo al final del bioensayo no existió diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los frutos recubiertos o no con emulsión, lo que se podría atribuir a su baja estabilidad, lo cual fue consistente con el bioensayo 4.

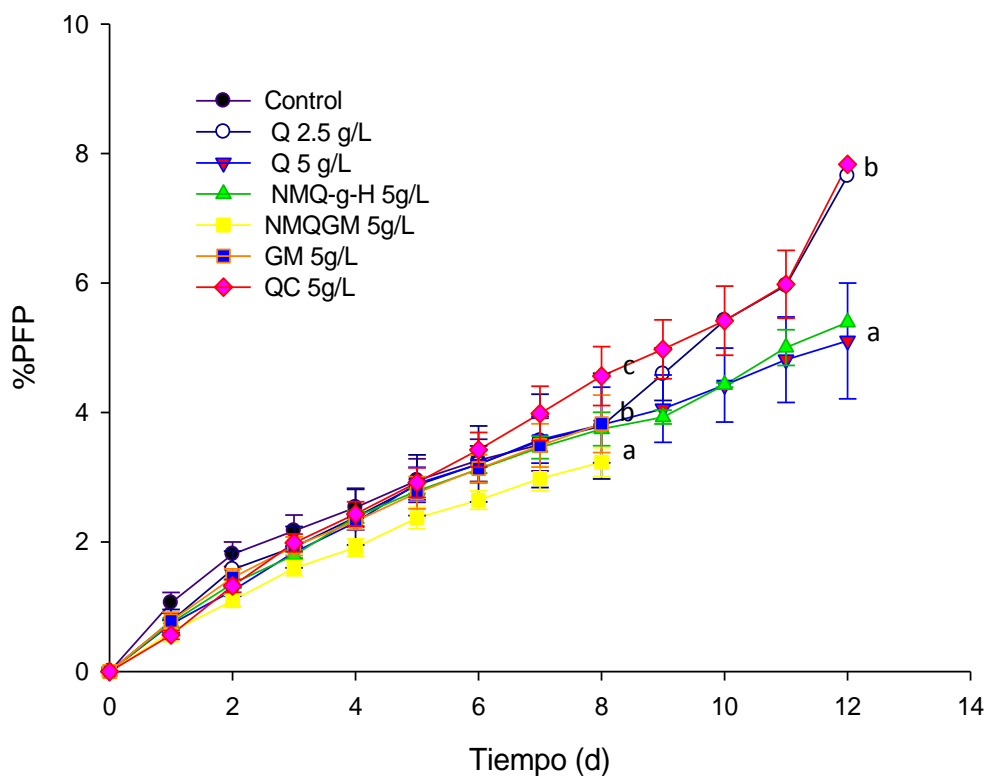


Fig. 11. 23 . PFP de los frutos con los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD

111.7.2 Color

Para el color no existió diferencia significativa entre los tratamientos ($p > 0.05$) para ninguna de las variables respuesta. Obteniendo que todos los tratamientos fueron similares a los frutos control en luminosidad (L), tono (*h*) y matiz (C^*).

Como se muestra en la Fig. 11.24, se observó que no hubo diferencias en los epicarpios tratados y el control para cada variable respuesta, por lo tanto, el fenómeno de prooxidación que posiblemente fue causado por el aceite de girasol (Kargar *et al.*, 2010) fue eliminado.

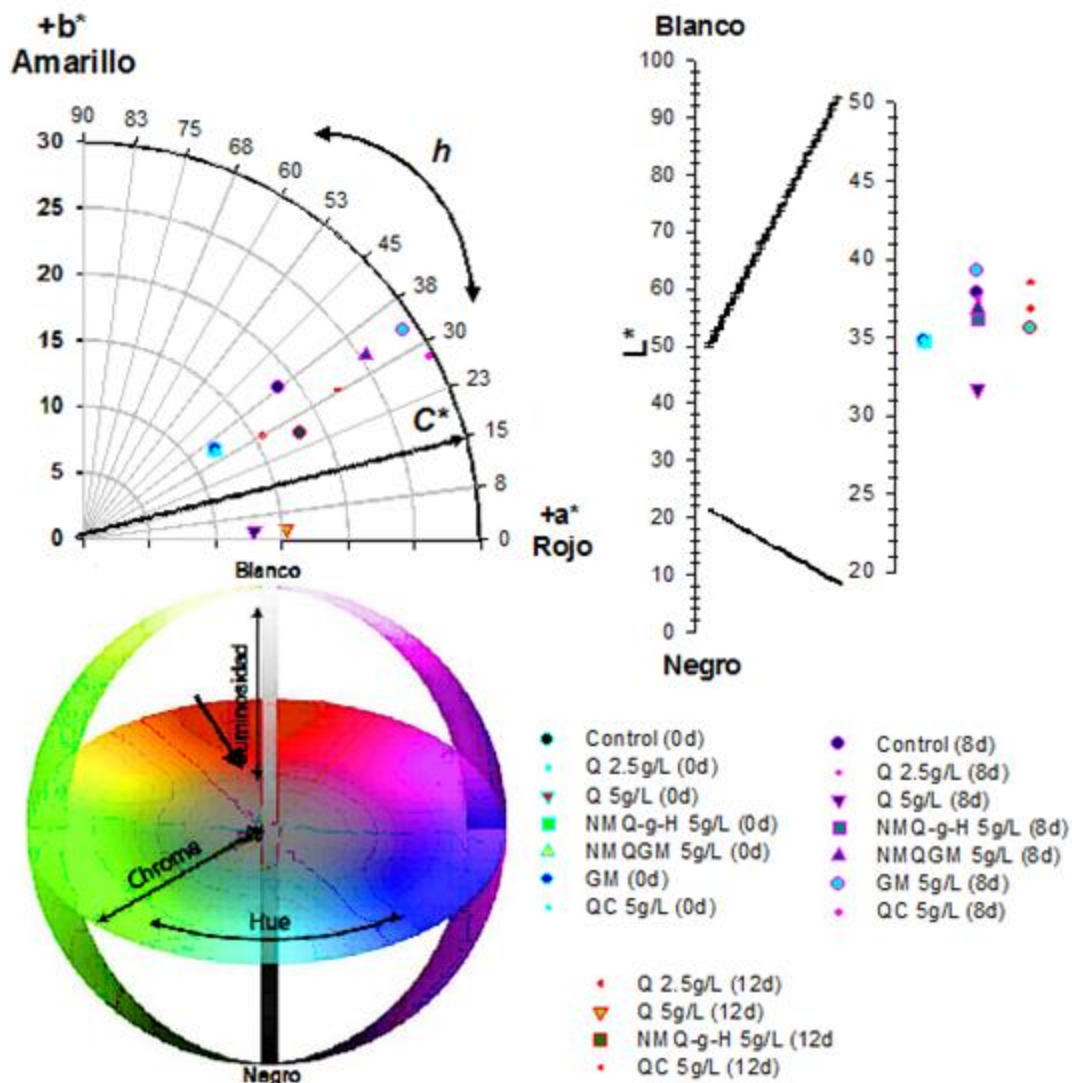


Fig. 11. 24 Cambio de color en los frutos con los tratamientos y el control del bioensayo 6.

11.7.3 Firmeza

Hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($p < 0.05$) a los 8 y 12 d del bioensayo, siendo ambas emulsiones, GM y el Q 5g/L los que mantuvieron mayor firmeza que el control, a los 8d de la aplicación de los recubrimientos (Fig. 11.25). De acuerdo a El Ghaouth *et al.*, (2000) los recubrimientos de Q afectan significativamente la respiración y la síntesis de etileno, conservando la firmeza por modificaciones de ambos procesos.

A los 12d se observa que la emulsión NMQ-g-H 5g/L conservó mayor firmeza esto concuerda con lo obtenido en la PFP ya que fue de los mejores tratamientos, por lo que

al perder menor cantidad de agua, el proceso de ablandamiento fue menor (Reardon, 2010).

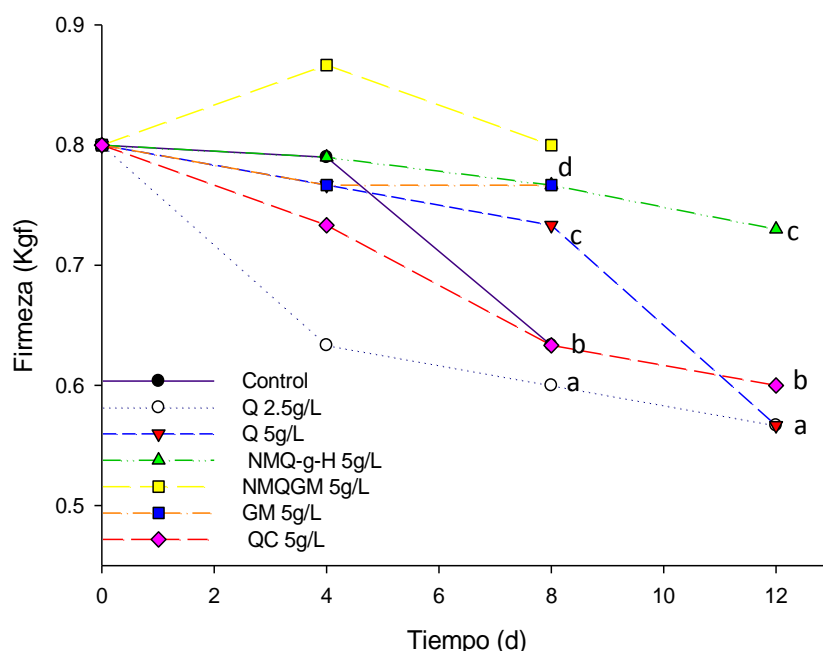


Fig. 11. 25 Firmeza de los frutos con el control y los tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD.

11.7.4 Unidades infectadas

Para este bioensayo los frutos no fueron lavados sino que se recubrieron directamente a petición de los productores, ya que estos frutos se producen en zonas áridas y semi-áridas por lo que hay escasez de agua. No obstante la microflora natural de los frutos, permitieron comprobar el efecto antimicrobiano del Q nativo o funcionalizado con H y N, donde todos lograron reducir drásticamente la contaminación por hongos tal como lo reporta Marmol *et al.* (2011), Brahmachari (2004), Girish y Shankara (2008). También se observó que el Q B-Q, tuvo mayor efecto antimicrobiano que el Q comercial, debido a que el primero tuvo un bajo grado de acetilación (12.78%) mientras que el comercial tuvo mayor cantidad de grupos acetilo ($18.42 \pm 1.04\%DA$) (Corona, 2013). Sin embargo, en los recubrimientos donde estuvo presente la GM se contaminaron debido a que como se mencionó anteriormente los azúcares que posee fungieron como sustrato (Pérez *et al.*, 2011), estos tratamientos presentaron el mismo %UI que el control a los 7 días por lo que a los 8 días se tuvieron que retirar las unidades experimentales (Tabla 11.12).

Tabla 11. 12 Unidades infectadas por hongos a los 7 y 12 d

Tratamiento	% UI 7d	% UI 12d
Control	83.3	100
Q 2.5g/L	33.3	66.7
Q 5g/L	33.3	50
NMQ-g-H 5g/L	50.0	83.3
NMQGM 5g/L	83.3	100
GM 5g/L	83.3	100
QC 5g/L	33.3	83.3

11.7.5 pH

Campos *et al.* (2011), mencionó que el pH de una pitaya roja es de alrededor de 4.7 ± 0.37 , lo cual concuerda con los valores obtenidos al inicio del bioensayo donde se obtuvo un pH de 5.2 ± 0.1 . Se observó que hubo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos siendo el QC 5g/L el que presentó una disminución de pH, posiblemente debido a una baja en la actividad respiratoria (García *et al.*, 2013) los tratamientos Q B-Q a ambas concentraciones y NMQ-g-H 5g/L mantuvieron el pH desde el inicio hasta el final del experimento (Fig. 11.26).

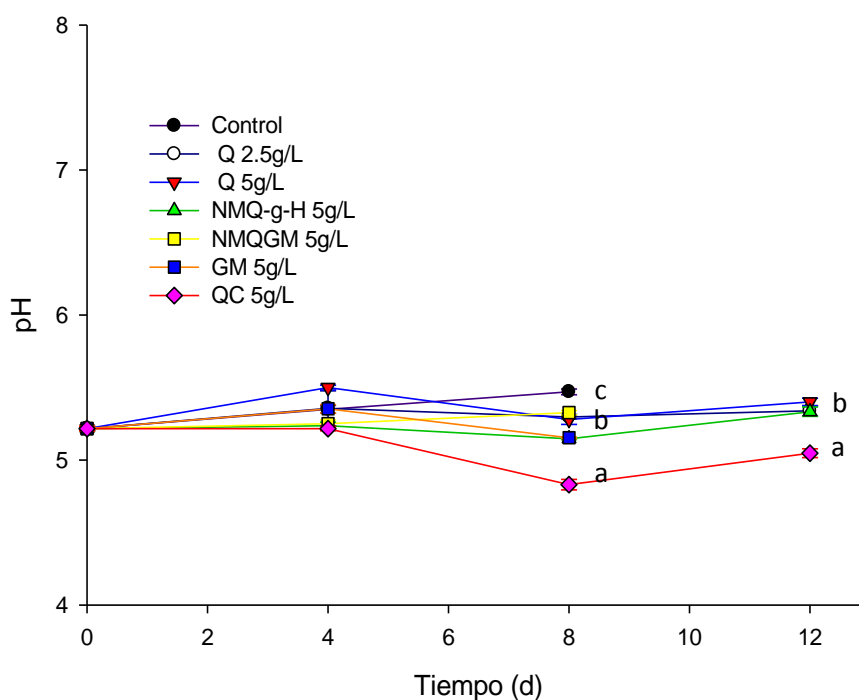


Fig. 11. 26 pH de los frutos con el control y los tratamientos. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD

11.7.6 Sólidos solubles totales (SST) y Acidez total titulable (ATT)

En el metabolismo de la maduración sobresale la síntesis de algunos ácidos orgánicos como cítrico, málico, ascórbico, oxálico, fumárico y tartárico. Para la pitaya se ha encontrado que el más representativos es ácido málico (García *et al.*, 2013; González, 2006). Usualmente, los ácidos orgánicos disminuyen durante la maduración debido a la respiración o su conversión en azúcar (Wills *et al.*, 1999). En este último ámbito, Campos *et al.* (2011) y Luna & Aguirre (2006) reportaron que los SST pueden variar dependiendo al zona geográfica donde se cultive y cosechen las pitayas.

La relación SST/ATT es importante para el consumo del fruto en fresco (De Souza *et al.*, 1984; Ramírez *et al.*, 2010), dado que indica la relación entre el grado de dulzor y acidez de la fruta. En este estudio, se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los tratamientos en la relación SST/ATT a los 8d desde la aplicación de los recubrimientos donde el control obtuvo un mayor valor de la relación por lo que este tratamiento fue el menos ácido, mientras que el QC 5g/L fue el más ácido. A los 12 d también hubo diferencia significativa siendo el Q 2.5g/L el tratamiento con mayor dulzor (Fig. 11.27).

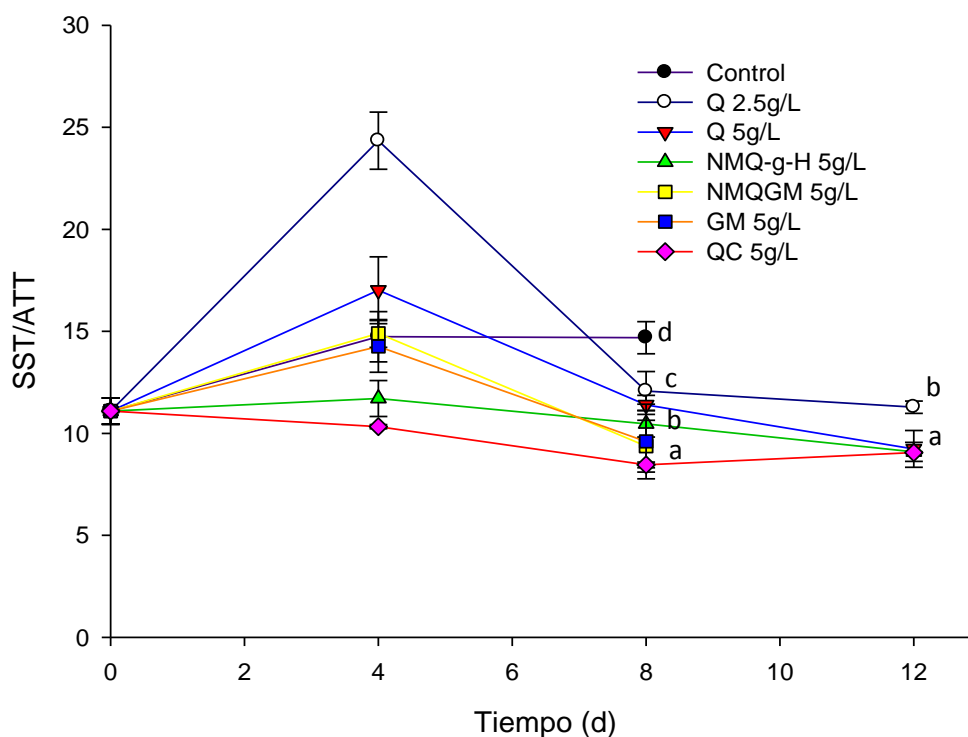


Fig. 11. 27 Relación SST/ATT de los tratamientos y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD

11.7.7 Cuenta en placa de hongos

Se observa en la Fig. 11.28 que conforme transcurrió el tiempo de almacenamiento el número de colonias fúngicas (UFC/g) se incrementó lo que concuerda con las unidades infectadas, ya que la refrigeración en conjunto con el recubrimiento con Q tuvieron un efecto fungistático (No *et al.*, 2007), por lo que tuvieron mayor duración que el control. Se observó que los frutos recubiertos con NMQ-g-H 5g/L, fue la que resultó ser el tratamiento con mayor crecimiento fúngico. Esto pudo deberse a que la liberación del aceite de neem no fue eficiente durante el período de prueba, ya a que el pH de las cáscaras no fueron suficientemente ácidos.

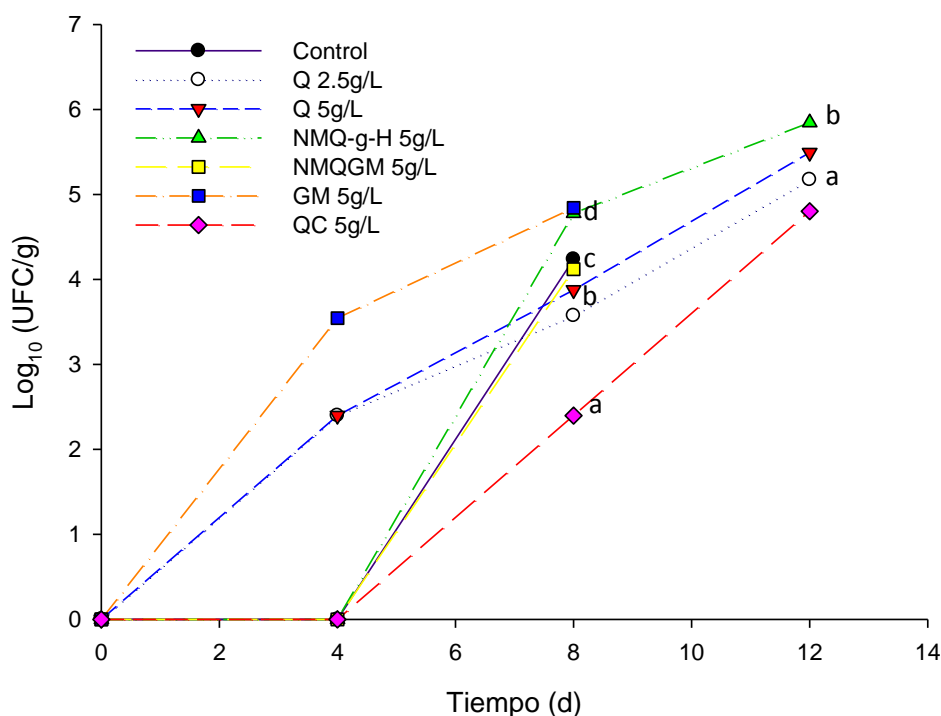


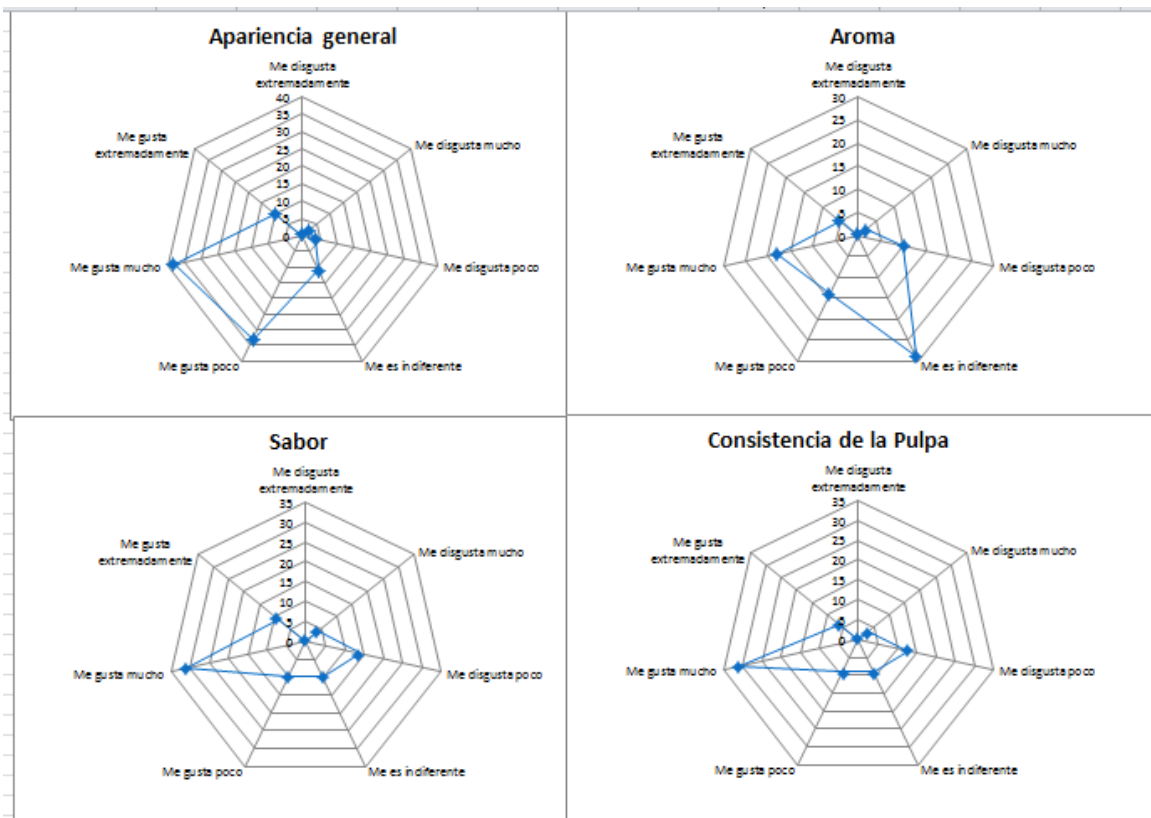
Fig. 11. 28 Cuenta de hongos en el epicarpio de los frutos tratados y el control. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$) mediante prueba de comparación múltiple de medias LSD

11.7.8 Análisis sensorial

Al tiempo inicial, se observa que los frutos control tienen buena aceptación en cuanto a la apariencia general, sabor y consistencia de la pulpa, sin embargo, en cuanto a su aroma son catalogados por los consumidores como indiferente. A los 8 días se observó que todos los tratamientos se encontraron en la zona de agrado de la escala hedónica

para la apariencia general, lo cual es consistente con el control al tiempo cero. Para el aroma los frutos recubiertos con Q 5g/L se catalogó de la zona indiferente al desagrado, esto fue contrario a lo obtenido a los 6d en el bioensayo 4; sin embargo de la zona indiferente a la de poco agrado se encuentran los frutos recubiertos con GM 5g/L; todos los demás tratamientos se encontraron en la zona de agrado siendo los frutos recubiertos con NMQ-g-H 5g/L el tratamiento con mayor aceptación. Para el sabor los consumidores catalogaron a los frutos recubiertos con Q2.5g/L, NMQ-g-H5g/L y NMQGM5g/L como los tratamientos de mayor agrado, siendo los frutos recubiertos con GM los que se catalogaron como el sabor muy desagradable, los demás tratamientos y el control se encontraron de una zona de indiferencia a poco agrado. Finalmente los consumidores catalogaron los frutos recubiertos con ambas emulsiones como la consistencia de la pulpa de mayor agrado, y los frutos recubiertos con Q 2.5g/L como el tratamiento con consistencia desagradable (Fig. 11.29). Por lo que comparando estos resultados, con el bioensayo 4, se observó que para este caso los frutos recubiertos con emulsiones fueron los que tuvieron mayor agrado en cada uno de los parámetros evaluados sensorialmente, lo que podemos atribuir a los cambios en la formulación de las emulsiones.

0d



8d

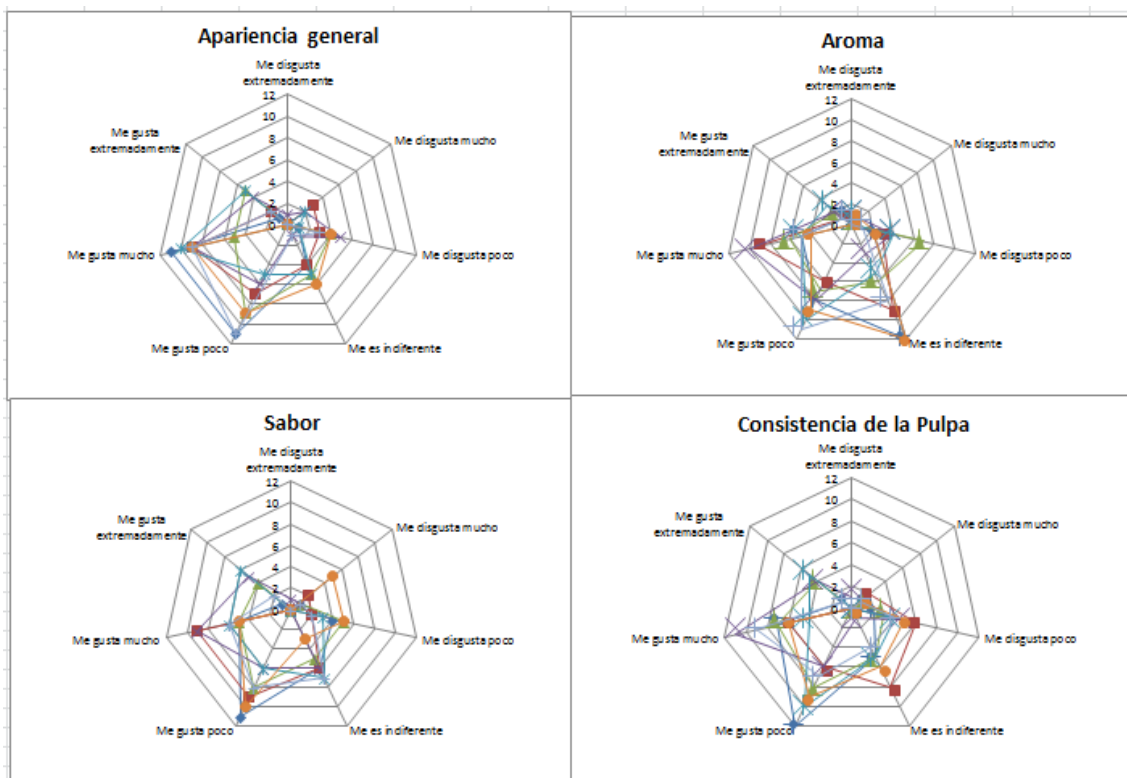









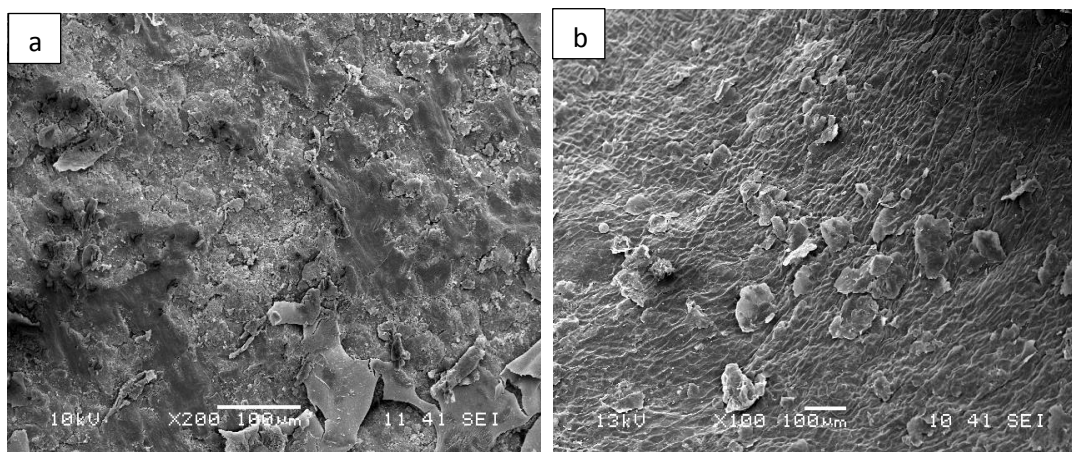
Fig. 11. 29 Evaluación sensorial a los 0 d y 8 d de *Stenocereus pruinosus*, Símbolos Control(); Q2.5g/L(); Q5g/L(); NMQ-g-H 5g/L(); NMQGM 5g/L(); GM (); QC5g/l().

11.7.8 Microscopía electrónica de barrido

En las microscopías electrónicas al inicio del bioensayo (Fig. 11.30) se observó que el control (Fig. 11.30a) tiene un recubrimiento de cera natural, al igual que la mayoría de las cactáceas (FAO, 2012) lo que le confiere brillo y resistencia a factores ambientales. En Fig. 11.30b se observa una areola de pitaya, en su estructura exterior está conformada por una serie de espinas llamadas radiales, y de una o más espinas centrales; internamente es un cumulo de células indiferenciadas y totipotenciales; es decir, que no conforman un tejido particular por lo que se pueden convertir en cualquier elemento de la planta (Yáñez *et al.*, 2009).

Los recubrimientos de Q y según lo reportado por Pereda *et al.* (2014), Saavedra & Algecira (2010) y Martínez (2009) reportaron que forman superficies lisas y homogéneas, lo que es comparable con los micrografías obtenidas en la pitaya (Fig. 11.30c, d, e), por lo que fungieron como barrea a factores ambientales, por lo cual perduraron por más tiempo la vida poscosecha de los frutos comparado con el control. Para la GM (Fig. 11.30f), también se observó una película homogénea y lisa, sin embargo esta es altamente susceptible a contaminantes por lo que no fue mejor al control, ya que no logro perdurar su vida poscosecha.

Para NMQGM (Fig. 11.30g) se observó que el recubrimiento presentó poros en el epicarpio, sin embargo, la presencia del aceite libre disminuyo la permeabilidad de agua, por lo que en el día 8 los frutos con este recubrimiento redujo la PFP de los frutos comparado con el control, pero al igual que el recubrimiento con GM no se logró un efecto sinérgico entre los componentes antimicrobianos presentes, por lo que ambos sufrieron contaminaciones por hongos que disminuyeron la vida poscosecha de la pitaya (Bautista *et al.*, 2005). Finalmente, en el recubrimiento NMQ-g-H (Fig. 11.30h), se observó que no fue homogéneo posiblemente debido a la separación de fases de la emulsión, exponiendo así los aceites que le confirieron hidrofobicidad, lo que repercutió en que este tratamiento logro disminuir la PFP en los frutos (Ramírez *et al.*, 2013) y la liberación del aceite provoco un efecto sinérgico con capacidad antimicrobiana.



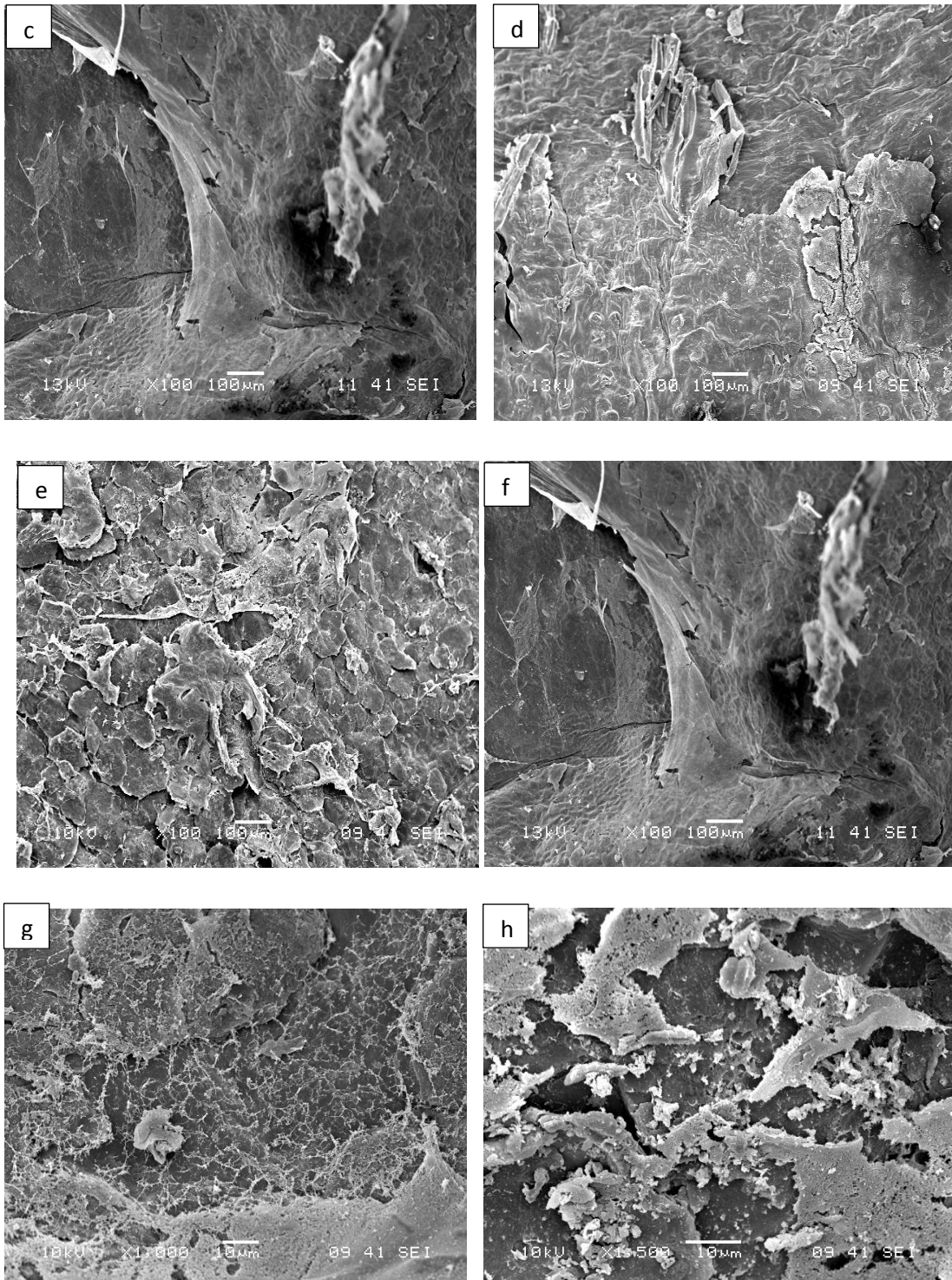


Fig. 11. 30. Micrografías electrónicas de recubrimientos al inicio del bioensayo a) Control (200X), b)Espina (25X), c) Q2.5g/L d) Q5g/L, e)QC5g/L, f)GM5g/L (100X); g)NMQGM 5g/L, h) NMQ-g-H 5g/L (1000X)

En la Fig. 11.31, se observan las micrografías obtenidas al final del bioensayo (12d), de los tratamientos que lograron perdurar la vida poscosecha de la pitaya, se observó que el Q 5g/L (i) conservo la estructura lisa y homogénea como al inicio del bioensayo (Pereda *et al.*, 2014; Saavedra & Algecira, 2010; Martínez, 2009). En cuanto la emulsión NMQ-g-H 5 g/L (j) al final del bioensayo se observó la completa separación de fases debido a la inestabilidad del sistema, sin embargo, se observó aglomeración de los polímeros y la posible liberación total de N, por lo que este tratamiento pudo prolongar la vida poscosecha de los frutos debido a la hidrofobicidad que evito la permeabilidad de agua (Ramírez *et al.*, 2013), así como efecto sinérgico de los compuestos empleados.

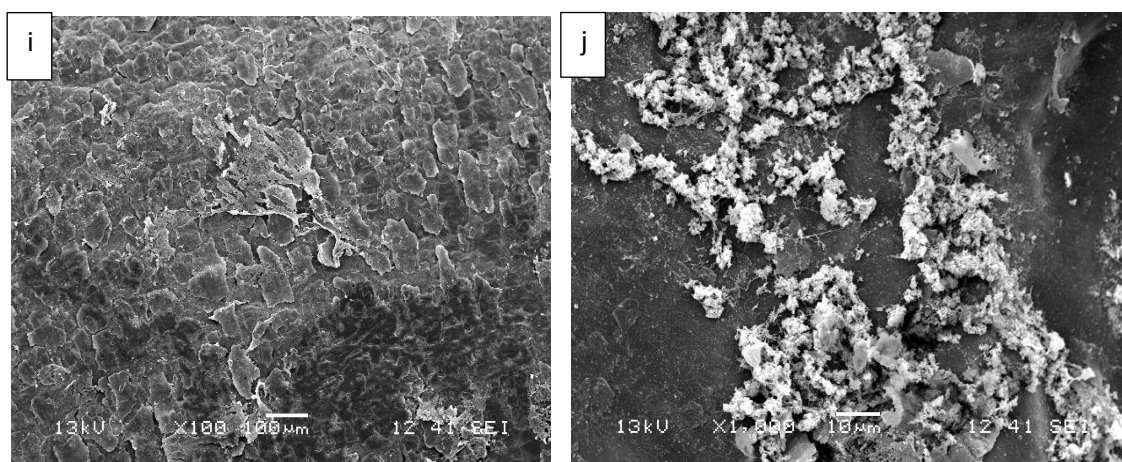


Fig. 11. 31 Micrografías electrónicas de recubrimientos al inicio del bioensayo (12d); i) Q5g/L (100X), j) NMQ-g-H 5g/L (1000X)

En resumen, a pesar que el último recubrimiento en emulsión fue estable, no pudo prolongar la vida poscosecha de los frutos debido que fue susceptible a contaminación por hongos, sin embargo la emulsión NMQ-g-H 5g/L a pesar de no ser estable una vez aplicada como recubrimiento logró que alargar la vida poscosecha de los frutos, además que eliminó el efecto de prooxidación y sensorialmente fue el más aceptado a los 8 días desde la aplicación de recubrimientos (11 días desde la cosecha). El Q obtenido por el método B-Q logro mayor efecto antimicrobiano que el Q comercial, lo se pudo atribuir a que este último tuvo un mayor grado de acetilación.

12. CONCLUSIONES

El método de obtención de Q fue determinante en las características del mismo, ya que la desacetilación homogénea llevo a la obtención de Q con un grado de acetilación de 12.78%, con un peso de 278.32 kDa.

Se formularon recubrimientos bioactivos a base de Q nativo o funcionalizado con H, solos o en combinación con N en emulsiones tipo O/W; sin embargo, a pesar de que las emulsiones fueron inestables estas se aplicaron en diversos bioensayos en la fase *in vivo* sobre pitaya y xoconoste dulce, logrando con ello que el Q nativo y las emulsiones NGQ-g-H, NMQ-g-H (todos a 5g/L) prolongaran la vida poscosecha de frutos.

Pero debido a la baja estabilidad de las emulsiones, se establecieron condiciones de entrapamiento de N en una matriz biopolimérica conformada por GM y Q, obteniendo un sistema estable NMQGM (5g/L), al cual se le determinaron eficiencia de encapsulación, permeabilidad al vapor de agua y las condiciones de liberación por efecto del pH.

Por otro lado, se aplicó la emulsión no estable NMQ-g-H (con mejores características para prolongar la vida poscosecha de los frutos), la emulsión estable NMQGM y Q nativos de origen B-Q y comercial. Los mejores tratamientos fueron la emulsión NMQ-g-H y el Q nativo de origen B-Q, debido a que estos lograron prolongar las características de calidad en la vida poscosecha de los frutos. Además existieron diferencias entre el uso de Q B-Q y el comercial, debido a que este último tuvo un menor efecto antimicrobiano cualitativamente, aunque no cuantitativamente donde no hubo diferencias significativas.

En este último punto, se requiere un estudio más profundo sobre las diferencias estructurales de los quitosanos biológico-químico y comercial, para comprender el comportamiento una vez que fueron usados como recubrimientos dada la tendencia obtenida cuantitativamente.

13. PERSPECTIVAS

Este trabajo propone recubrimientos bioactivos a base de quitosano para prolongar la vida poscosecha de los frutos de *Stenocereus pruinosus* y de *Stenocereus stellatus* debido a lo perecedero de los frutos, estos no tienen una amplia distribución comercial. Esta aportación abre la posibilidad de realizar diversos estudios para mejorar y aplicar los resultados obtenidos en la conservación de la pitaya y xoconostle dulce, debido a que en este ámbito no existe el uso de recubrimientos bioactivos.

A pesar de que emulsiones en su mayoría no fueron estables, si mostraron buenas propiedades en su aplicación *in vivo*, con lo que se abre una ventana de oportunidad para mejorar estas formulaciones con quitosano funcionalizado y obtener mejores resultados.

Además, se propone un estudio más profundo sobre la capacidad antimicrobiana del quitosano biológico-químico ya que resulto ser mayor, que el quitosano comercial.

14. TRABAJOS PRESENTADOS

- Carmen Hernández, Lizbeth Tellez, Daniela Moreno, Rosalio Sánchez, José Ramirez, Lourdes Yáñez, Keiko Shirai. RECUBRIMIENTOS DE QUITOSANO PARA LA CONSERVACIÓN POSCOSECHA DE PITAYA (*Stenocereus pruinosus*) Y XOCONOSTLE DULCE (*Stenocereus stellatus*). Oral presentado en el congreso XXXV Encuentro de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ). Puerto Vallarta, México. Mayo 2014.
- Carmen Hernández, Lizbeth Tellez, Angélica Román, Keiko Shirai. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD CINÉTICA DE EMULSIONES O/W CONTENIENDO ACEITE DE NEEM Y QUITOSANO EXTRAÍDO POR MÉTODO BIOLÓGICO-QUÍMICO. Cartel presentado en el congreso XXXV Encuentro de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ). Puerto Vallarta, México. Mayo 2014.

15. BIBLIOGRAFÍA

Alonso D. (2009). Estudio de la funcionalización de textil de celulosa mediante entrecruzamiento con quitosano, quitooligosacáridos y microcápsulas de quitosano y evaluación de las propiedades antimicrobianas. *Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. UAM-I.*

Alonso D., Gimeno M., Sepulveda-Sánchez J. D., Shirai K. (2010), Chitosan-based microcapsules containing grapefruit seed extract grafted onto cellulose fibers by a nontoxic procedure. *Carbohydrate Research* 345(6):854-859.

Ansel, H.C., Allen, L.V. y Popovich, N.G. (2004) *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 8ª Edition. Lea & Febiger, Philadelphia.

Aranberri I., Binks B.P., Clint P.D., Fletcher I., (2006). Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensioactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros Volumen 7(3)*

Armella M. A., Yañez L.L., Soriano S.J., Ramirez R.G., (2003). Phenology postharvest physiology and marketing of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) as a sustainable resource. Im: Duyaman E. Tuzel Y.). *Proceedings of the International Symposium on Sustainable Use of plant biodiversity to Promote New Opportunities for Horticultural Production Development*. Acta Horticultural e. num 598. ISHS Netherlands. Pp 251-258.

Bage A. V., Jadhav R. S., Gite V.V., Hundiwale D. G. y Mahulikar P.P., (2012). Controlled Release Study of Phenol Formaldehyde Microcapsules Containing Neem Oil as an Insecticide. *School of Chemical Sciences, North Maharashtra University, Jalgaon, India.*

Barda N., (2012). Análisis sensorial en alimentos. <http://www.biblioteca.org.ar/libros/210470.pdf>

Bautista B. S.; Hernández L. M.; Bosquez M. E. (2004). Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Mexican Journal of Phytopathology* 22:178-186

Bautista B. S., Hernández L. A., Velázquez V. M., Bosquez M. E., Sánchez D. D. (2005). Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícolas. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 7, núm. 1, pp. 1-6

- Benhamou N. (1992). Ultraestructural and citochemical aspects of chitosan on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis- Lycopersici*, agent of tomato crown and root rot. *Phytopathology* 82: 1185-1193
- Benzing, D. H. (1990). *Vascular epiphytes, general biology and related biota*. Cambridge: Cambridge University Press. Cambridge, XVII, 354 pages. ISBN 0-521-26630-0.
- Beristain, C.I. y Vernon-Carter, E.J. 1994. Utilization of mesquite (*Prosopis juliflora*) gum as emulsión stabilizing agent for spray-dried encapsulated orange peel oil. *Drying Technology* 12, 1727-1733.
- Beristain, C.I., García, H.S., y Vernon-Carter, E.J. 2001. Spray-dried cardamom essential oil mesquite (*Prosopis juliflora*) gum. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 34, 398-401.
- Bertuzzi, M.A., Armanda, M., Gottifredi, J.C., Aparicio, A.R., Jimenez, P. (2002). Estudio de la permeabilidad al vapor de agua de films comestibles para recubrir alimentos. Congreso Regional de Ciencia y Tecnología NOA, Secretaría de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de Catamarca. - Vols. Producciones Científicas. Sección: Ciencias de la Ingeniería, Agronomía y Tecnología.
- Bolívar K., Sanabria M. E., Rodríguez, Ulacio D. D., Camacaro M., Cumana J. L. y Crescente O. (2009). Calidad poscosecha en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides* y tratados con extractos vegetales.
- Boonsongrit, Y., Mueller, B. W., Mitrevej, A., 2007. Chatactezation of doug-chitosan interaction by H NMR, FTIR and isoterma sl titration calorimetry. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 69, 388-395
- Boscarol M. (2007). Colorimetría: Teoría de color. <http://gusgsm.com/colorimetria>
- Bósquez M. E. y Vernon C. E.J. (2005). Effect of plasticizers and calcium on water vapor permeability of mesquite gum-candelilla wax based films. *Revista mexicana de ingeniería química* Vol. 4, 157-162
- Bosquez, M. E. (1992). Manual de Prácticas de Fisiología y Tecnología Poscosecha de frutas y Hortalizas. UAM-Iztapalapa.
- Brahmachari G. (2004). Neem - a omnipotent plant: a retrospection. *Chem Biochem* 5: 408-421.
- Britton, N. L., y Rose, J. N. (1963). The cactaceae: Description and illustrations of plants of the cactus family (Vol. 2). New York: Dover.

- Campos R. E., Pinedo E. J. M., Campos M. R.G., Hernandez F. A. (2011). Evaluación de plantas de pitaya (*Stenocereus* spp) de poblaciones naturales de monte Escobedo, Zacatecas. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 17(3): 173-182, 2011
- Casas F.A. y Caballero N.J., (1996). Diversidad morfológica y genética del xoconochtli. *Economic Botany* 51: 279-292
- Casas, A. y A. Valiente B., (1995). Etnias, recursos genéticos y desarrollo sustentable en zonas áridas de México. *In: (ed.) Desertificación en Zonas áridas*. Chapingo, México.
- Casas, A.; J.L. Viveros & J. Caballero. (1994). *Etnobotánica mixteca: sociedad, cultura y recursos naturales en la Montaña de Guerrero México*. Instituto Nacional Indigenista- Consejo Nacional para la Cultura y las Artes. México: 366 p.
- Castro, V. G., 2007. Informe final. Diseño monitoreo frente derrames de hidrocarburos. Quillota, Chile.
http://www.sag.cl/sites/default/files/INFORME_FINAL_ASESORIA_SAG_HCS2.pdf
- Chi H.P., Wang W., Kan C., Zhou C., Ng F., Wat Elaine, Zhang V.,..., (2012). *Preparation and characterization of chitosan microcapsules loaded with Cortex Mountan*.
- Chi, M. F. (1998). *Etiología y manejo integral de las Bacteriosis (Erwinia carotovora Smith) en Pitahaya (Hylocereus undatus Britt y Rose)*. Tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura. Instituto tecnológico agropecuario No. 2 Conkal, Yucatan, México. pp 61.
- Cho, J., Heuzel, M-C., Carreau, P.J., (2006). Viscoelastic properties of chitosan solutions: effect of concentration and ionic strength. *J.Food L'ng.* 74, 500-515.
- Cira L., Huerta S., Hall G y Shirai K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*: 37:1359-1366.
- Corona S.I.J. (2013). Síntesis y caracterización fisicoquímica de un andamio celular a base de quitosano biológico-químico y colágena tipo I. Tesis para obtener el grado de Maestra en Biotecnología, UAM-I
- Darmadji, P. e Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*. 38:243–254.
- Di Pierro, P; Sorrentino, A.; Mariniello, L.; Valeria, C.L.; Porta, G.R, Chitosan/whey protein films as active coating to extend Ricotta cheese shelf-life, *LWT-Food Science and Technology*, 2011. - Vol. 44.
- De Sousa S. A.J., R. Pinheiro, R.V. R. Pinheiro, J.C. Gómez, A.C. G. de Souza y J.B. P. Chaves. 1984. Comparacao de onze variedades de manga producidas em Vizconde do

Rio Branco, Minas Gerais, visando ao consumo ao natural e a elaboração de geleias. *Revista Ceres* Vol. 31(178):464-478.

Deladino L., Anbinder P., Navarro A. y Martino M., (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from (*ilex paraguariensis*). *Carbohydrate Polymers* (71):126-134.

Delgado P. N. (2007). Estabilización de emulsiones de crudo pesado en agua con mezclas de surfactantes no-iónicos y aniónicos y aminas como co-surfactantes. *Tesis para obtener el grado de maestro en química*.

Dow Chemical Company (Midlan. M. I.), (1988). Mwthocel cellulose ethers, Technical.

El Ghaouth A.; Arul J.; Grenier J.; Asselin. (1992). Antifungal activity of chitosan on two post harvest pathogens of strawberry fruits. *Phytopathology* 82: 398-402.

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.

Espinoza A.H., Sandoval C. O., Vásquez T. H., Vernon C.E., Lobato C. C., 2009. Determination of the gum Arabic–chitosan interactions by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and characterization of the microstructure and rheological features of their coacervates. *Carbohydrate Polymers*.

FAO, (2012). <http://www.fao.org/docrep/x5055s/x5055s02.html>

Fernández P., André V., Rieger J., Kuhnle A. (2004). Nano-emulsion formation by emulsion phase inversión *Colloid Surf. A: Physicochem Eng. Asp.* 251: 53-58

Fwu-Long M., Chin-Tsung H., Hsiang-Fa L., Mei-Chin C., Ya-Ling C., Chu-Hung C., Hsing-Wen S. (2006). Physicochemical, antimicrobial and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid. *Journal of Agricultural and Food chemistry*. 54: 3290-3296.

García C.L., Valle G. S., Salinas M.Y, Joaquín C. E. (2013). Physical, Chemical, and Antioxidant Activity Characterization of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) Fruits. *Plant Foods Hum Nutr* (2013) 68:403–410

Garti, N. y Reichman, D. (1993). Hydrocolloids as foods emulsifiers and stabilizer. *Food Structure* 12, 411-426.

Gervacio B. I. (2005). Diseño de un sistema integral para almacenar, transportar y exhibir Pitaya. Tesis de Licenciatura, Universidad Tecnológica de la Mixteca, Huajuapán de León, Oax., México.

Gildberg A., Stenberg E. A. (2001). *A new process for advanced utilitation of shrimp waste. Process Biochemistry* 36. 809-812

GIM. Ficha técnica de Aceite de neem (2013). <http://www.greenideas.es/pdf/Ficha%20T%C3%A9cnica%20del%20Aceite%20de%20Neem.pdf>

Gimeno M., Ramírez J., Martínez C., Pacheco N., Garcia R., Barzana E., Shirai K. (2007). One-Solvent Extraction of Astaxantina from Lactic Acid Fermented Shrimp Wastes. *J. of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 10345-10350.

Girish K. and Shankara B.S. (2008). Neem – a green treasure. *Elect J Biol* 4: 102-111.

Gonzalez C. I. (2006). Desarrollo y aplicación de procesos tecnológicos para la elaboración de conservas a base de pitaya (*Stenocereus spp.*) de la región Mixteca. Tesis para obtener el grado de Ingeniero en Alimentos. Universida Tecnológica de la Mixteca.

Goycoolea F. M., Remuñán-López C., Alonso M. J. (2007), *Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano*.

Guida L., Martinez V., López M. C., Blasco R., Hermida L., Gallardo G. (2010). Microencapsulación de aceite vegetal rico en ácidos grasos ω -3 para el desarrollo de alimentos funcionales. INTI Cereales y Oleaginosas e INTI Química. Argentina.

Haber, W. A. (1983). *Hylocereus costaricensis (Pitahaya Silvestre), wild pitahaya*. In D. H. Janzen (Ed.), *Costa Rican natural history* (pp. 252–253). Chicago: The University of Chicago.

Han C, Zhao Y, Leonard SW, Traber MG. (2004) Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria × ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biol Tec*; 33 (1): 67–78.

Hirai A., Odani, H. y Nakajima, A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by H^1 NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin* Vol. 26, p. 87-94.

Han J., Guenier A., Salmieri S. y Lacroix M., (2008). Alginate and chitosan functionalitation for micronutrient encapsulation. *Journal of Agricultural and food chemistry* (56): 2528-2535.

Hirano S.; Nagao, N. (1995). Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme and chitinase on the growth of several phytopathogens. *Agricultural and Biological Chemistry* 53: 3065-3066.

Hoon Oh D., Balakrishnana P., Ohc Y., Kimc D., Yonga C., Choi H., (2010). Effect of process parameters on nanoemulsion droplet size and distribution in SPG membrane emulsification.

Horst, M. N.; Walker, A. N. In *Chitin Enzymology* (1993) Ed.; Atec: Italy; Vol. 1, pp 109-118

Hunter R. J., (2001). *Foundations of colloid science*. New York: 2nd ed; Oxford University Press.

Hwang, J.K., Shin, H.H., (2000). *Rheological properties of chitosan solutions*. *Korea-Aust. Rheol. J.* 12,175-179.

Jerobin J., Sureshkumar R. S., Anjali C. M., Mukerherjee A., Chandraskaran N., (2012). Biodegradable polymer based encapsulation of Neem for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate Polymers* 90 1750:1756.

Jiménez A. R., (2010). Estudio del efecto de complejos biopoliméricos en la estabilización y propiedades funcionales de emulsiones múltiples conteniendo hierro biglicinado. Autónoma Metropolitana Iztapalapa (Tesis para obtener el grado de doctor en Biotecnología).

Jiménez A. R., Beristain C.I., Medina T. L., Román G. A., Vernon C.E.J. (2009). Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by protein-polysaccharide complexes. *Food Hydrocolloids* 23 (2009) 2425–2433

Jongrattiporn, 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.

Jordán M. y Casaretto J. (2006). *Hormonas y Reguladores del Crecimiento: Etileno, Ácido Abscísico, Brasinoesteroides, Poliaminas, Ácido Salicílico y Ácido Jasmónico. Fisiología Vegetal* (F.A. Squeo & L. Cardemil, eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Kargar M., Spyropoulos F., Norton I. (2010). The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions. *Journal of Colloid and Interface Science* 357 (2011) 527–533

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.

Kester, J., and Fennema, O. 1986. Edible films and coatings: A review. *Food Technology* 40:47–59

Kjoniksen, A. L., Nystrom Bo., Iversen, C., Nakken, T., Palmgren, O., Tande, T., (1997). Viscosity of Dilute Aqueous Solutions of Hydrophobically Modified Chitosan and Its Unmodified Analogue at Conditions of Salt and Surfactant Concentrations, *Langmuir*, 13, 4948 – 4952.9

Krochta J., Baldwin E., Nisperos M., (1994). *Edible coatings and films to improve food quality*. Florida, United States of America: CRC Press.

Kumar S., Eswara R. N. P., Hariprasad R. K., Devi M. C. (2007). Evaluation of Fungicidal Resistance Among *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates Causing Mango Anthracnose in Agri Export Zone of Andhra Pradesh, India

Kumar V., Banker G. (1993), *Drug Dev. Ind. Pharm.*

Kumar, M. N. V.; Muzzarelli R. A. A., Muzzarelli C., Sashiwa H., and Domb A. J.(2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives, *American Chemical Society*

Larez V. C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola* 8(1): 1-22

Less R., (1980). *Análisis de los alimentos. Métodos analíticos y de control de calidad*. 3ra. Edición. España: Acribia.

Ling F., Ronghua J., Xueyi L., Xiaohua Z., Shi C., Haifeng L., Yahong X.,(2011) *Chitosan microspheres for controlled delivery of auxins as agrochemicals*.

Liou, M. R., Hung, C. L., and Liou, R. F. (2001), First report of cactus virus on *H. undatus* (cactacea) in Twain (*Abstract. Plant Disease* 85:229)

Liu, Y., Chen, G., Chena, Y., y Linb, J. (2005). Inclusion complexes of azadirachtin with native and methylated cyclodextrins: Solubilization and binding ability. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 13, 4037–4042.

Loeza C. J, 2007. Modificación enzimática de la goma de mezquite para la obtención de L-arabinosa. *Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. UAM-I*.

López C. M., (2013). Síntesis y caracterización de materiales con base en quitosano, obtenido mediante desacetilación heterogénea de quitina extraída por un método biológico. *Tesis para obtener el grado de Químico en alimentos*.

López M., Cabrera C., Ruiz D. (2014). Estabilidad oxidativa de aceites vegetales comestibles. Sociedad Andaluza de nutrición clínica y dietética, Departamento de nutrición y bromatología, Universidad de Granada, España. Palmer JK. 1961. *Plant Physiology*

López, B. S. M. 2001. Evaluación de películas plásticas sobre la calidad de la tuna (*Opuntia spp.*) Mínimamente procesada bajo condiciones de refrigeración. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.

Luna M.C.; Aguirre R.J., (2006). Clasificación tradicional, aprovechamiento y distribución ecológica de pitahaya mixteca en México. *Interciencia* 26: 18-24

Maa Y., Hsu C., (1996). Liquid-liquid emulsification by rotor/stator homogenization. *Journal of Controlled Release*. Vol 38 pp 219-228.

Magaña W.; Balbín M. I.; Corrales J.; Rodríguez A.; Saucedo C.; Cañizares E.; Sauri E. (2004). Efecto de la frigoconservación en el comportamiento fisiológico de frutas de pitahaya (*Hylocereus undatus Haworth*). *Cultivos Tropicales*, vol. 25, núm. 4, pp. 33-39. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. La Habana, Cuba

Malvern, 2011. <http://www.malvern.com/Assets/MRK1839.pdf>

Marmol Z., Paez G., Rincon M., Araujo K., Aiello C., Chandler C., Gutierrez E. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones.

Martínez C. G. (2009). Uso de bacterias lácticas en recubrimientos de quitosano para la conservación postcosecha de litchi y rambután (Tesis de Doctorado)

Mason T. G., Krall A. H., Gang H., Burette J., Weitz D. A. (1996) *Encyclopedia of Emulsion Technology*, Marcel Dekker, New York.

Maté C. J. (2008). VI Panorámica actual de la industria alimentaria; Películas comestibles y biodegradables: Oportunidades y usos. Universidad pública de Navarra. https://www.cresca.upc.edu/sites/default/files/docs/5.JIMat%C3%A9_Univ.Navarra.pdf

Mayen P., (2012). Cactáceas en México <http://bva.colech.edu.mx/xmlui/bitstream/handle/123456789/HASH01036c0d6acfbcbcd b2ceedb/doc.pdf?sequence=28>

McClements D.J., (2004). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, Second Edition

Miranda, P.S; Cárdenas, G.; López, D.; Sagahon, Lara A.V., Comportamiento de películas de quitosán compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate, *Revista de la Sociedad Química de México*, 2003. - 4 : Vol. 47.

Moller H., Grelier S., Pardon P., Coma V. (2004). Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-H- based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52:6585-6591.

Montes, E., (2011). Elaboración de películas de quitosano, caracterización y estudio de su efecto antifúngico sobre *Penicillium chrisogenum* en medio de cultivo sólido Czapeck. (Trabajo de servicio social).

Muñoz J., Alfaro M.C., Zapata I. (2007). Avances en la formulación de emulsiones. *Grasas y aceites*, 58 (1), enero-marzo, 64-73, ISSN: 0017-3495

Muzzarelli, R. A. A. (1985). In *The Polysaccharides*; Aspinall, G. O., Ed.; Academic Press: New York; Vol. 3.

Muzzarelli, R. A. A., Jeuniaux, C., Gooday, G. W. (1986), *Chitin in Nature and Technology*; Eds.; Plenum: New York.

Nicio C. A. A., (2011), Síntesis y caracterización de películas de quitosano-cítrico-H. (Tesis para obtener el título de química de alimentos).

Nitcharacter (2014). <http://www.nitcharacter.com/es/servicios/tamano-y-distribucion-de-tamanos-de-particula.html>

No H.K., Meyers S.P., Prinyawiwatkul W. and Z. Xu.(2007).Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A Review. *Journal Food Science* 27: 87C10

Norma oficial mexicana NOM-111-ssa1-1994, bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/111ssa14.html>

OMS y FAO. (2004). Informe sobre el fomento del consume mundial de frutas y verduras. *Estrategia mundial de frutas y verduras*. <http://www.msal.gov.ar/argentina-saludable/pdf/dpas-plan-imp-alc.pdf>

Organización Mundial de la Salud (OMS), (2007). <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/es/index1.html>

Pacheco N., Gárnica G. M., Ramirez H. J., Flores A. B., Gimeno M., Bárzana E., Shirai K. (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 100(11):2849-2854.

Pacheco N; Garnica G; Gimeno M; Bárzana E; Trombotto S; David L; Shirai K; (2011). Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules*. Vol. 12, p. 3285-3290.

Parra F., Blancas J., Casas A., (2012). Landscape management and domestication of *Stenocereus pruinosus* (cactácea) in the Tehuacán Valley: human guided selection and

gene flow. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*.
<http://www.ethnobiomed.com/content/8/1/32>

Pelayo Z.C., Castillo A.D., Chatelain M.S., Siade B. G., 2010. Manejo poscosecha de la Nochtli o tuna (*Opuntia Spp*). Ed. UAM, México. pp 148-152.

Pereda M., Moreira M., Roura S., Marcovich N., Aranguren M. (2014). Bio-plúculas para el envasado de alimentos: proteínas y carbohidratos. *Ciencia e investigación - Tomo 64 N° 2*.

Pérez M., Zambrano N., Ramírez M., Tyrode E., Salager L. (2002). Surfactant-Oil-Water systems near the affinity inversión. XII: Emulsion Drop Size versus Formulation and Composition. *J. Disp. Sci. Tec. 23. 1-3. 55-63*

Pérez O. J., Barrios S. E., Roman G.A., Pedroza I.R., 2011 .Interaction of mesquite gum-chitosan at the interface and its Influences on the stability of multiple emulsions w1/o/w2. *Revista Mexicana de Ingenieris Quimica. Vol. 10, No. 3 (2011) 487-499*

Pérez Q. J., Coll G.Y., Curiel H., Peniche C.C. (2010), *Microspheres of chitosan for controlled delivery of brassinosteroids with biological activity as agrochemicals*. *Carbohydrate polymers* Vol. 80, Issue 3, pp 915-921

Pérez R.A., (2011). Estudio comparativo de la estabilidad y degradación de carotenoides naturales incorporados en emulsiones aceite-agua (o/w) y agua-aceite-agua (w/o/w). Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (Tesis para obtener el grado de maestro en Ciencias).

Pérez, P. R., (2009). Aplicación de microondas en el tratamiento de emulsiones de tipo agua en aceite (W/O) y del tipo aceite en agua (O/W). Tesis Doctoral, Valencia, España.

Pijoan M, (2004). El Neem, la farmacia de la aldea. *Etnofarmacología*. OFFARM Vol. 25, Núm. 5. pp 127-133.

Pinedo E. J. M., Franco B, A., Hernández F. A. D., (2010). Comportamiento poscosecha de cultivares de tuna por efecto del manejo del huerto y temperatura de frigoconservación. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 11, núm. 1, pp. 43-58, Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C., México

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.

Quintero C., Falguera V., Muñoz H., (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Ciencias-Química*. MBAGA., pp 93-118.

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.

Raichel. D.R. (2000). The science and applications of acoustics. Edit series. Robert T. Beyer. Springer PVerlag. New York InC. pp. 418.

Ramírez M.J.G., (2007). *Monografía de la producción de Pitaya*, Puebla, México. pp 5-9.

Ramírez M., Qujada O., Castellano G., Burgos M. E., Camacho R., Marin R. (2010). Características físicas y químicas de frutos de trece cultivares de mango (*mangifera indica l*) en el municipio mara en la planicie de maracaibo. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 10, núm. 2, 2010, pp. 65-72, Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C.México

Ramos G. M., Bautista B. S., Barrera N.L.L, Bosquez M. E., Alia T. A. Y Estrada C., M (2010). Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. *Rev. Mex. Fito. Patol.* vol.28 no.1 Ciudad Obregón 2010.

Reardon J.H, 2010. pH y los Alimentos, North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services, *Food and Drug Protection Division*

Rendón G.M., Báez G.J.G., Alanís G.G., Regalado M. A., Galindo R. S. y Vernon C. E. J., (2010). Eficiencia de encapsulación del aceite de linaza utilizando goma de mezquite y quitosano como materiales de pared. *XII congreso nacional de ciencia y tecnología de alimentos*. Guanajuato, México.

Reyes R., N. de la P. (1995). *El cultivo de las pitahayas y sus perspectivas de desarrollo en México*. Villahermosa, Tabasco, gobierno del estado de Tabasco.

Robles O. L. E; Ochoa M. L.A., (2012). Ultrasonido y sus aplicaciones en el procesamiento de alimentos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 13, núm. 2, pp. 109-122. Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C. Hermosillo, México

Rocha-Pino Z., Shirai K., Arias L., Vazquez-Torres H. (2008). Efecto de la calidad del agua y tamaño de partícula en la producción de quitosano a partir de beta-quitina extraída de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 7(3):299-307.

Ramírez J., Aristizábal I., Restrepo J. (2013). Conservación de mora de castilla mediante la aplicación de un recubrimiento comestible de gel de mucílago de penca de sábila. *Vitae* vol. 20 no.3 Medellín Sept./Dec. 2013

Rodríguez C. A. (1999), Producción y comercialización de *Pitaya en México*, universidad Autónoma de Chapingo. pp 3-22.

Roller, S. and N. Covill (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology* 47: 67–77.

Román-Guerrero. A., Orozco V. J., Pérez O. J.P., Cruz S. F., Jiménez A-R. y Vernon-Certer, E.J. (2009). Application and evaluation of mesquite gum and its fractions as interfacial film formers and emulsifiers of orange peel–oil. *Food Hydrocolloids* 23, 708–713.

Rosales B. E., Luna M. C., Cruz L. A. (2008). Clasificación y selección tradicional de pitaya (*Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxb.) en Tianguistengo, Oaxaca y variación morfológica de cultivares. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 15(1): 75-82, 2009.

Ruíz R.J.O., (2004). Caracterización reológica de emulsiones aceite-en-agua (o/w) estabilizadas con goma de mezquite y quitosano y su efecto en la permeabilidad de películas comestibles. *Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias UAMI*, México.

Saavedra N., Algecira N. (2010). Evaluacion de películas comestibles de almidon de yuca y proteína aislada de soya en la conservación de fresas. *Ciencias biomédicas* Vol. 8, núm. 14. Colombia.

SAGARPA, Revista (2001). Abriendo surcos. <http://www.sagarpa.gob.mx>

Sánchez G. L., Vargas M., González M. C., Chiralt A., Cháfer M. (2009). Characterization of edible films based on hydroxypropyl methylcellulose and tea tree essential oil. *Food Hydrocolloids*, 23, 2102-2109

Sanchez R., Damas R., Dominguez P., cerezo P., Salcedo I., Aguzzi C., Viseras C. (2010), *Uso de la HidroxiPropilMetilCelulosa (H) en liberación modificada de fármacos*.

Sandoval Y. L., Montellano P. L., Piña S. M. y Sánchez G. L., 2011. Potencial zeta como una herramienta para determinar la aglomeración de las partículas en la reducción del volumen del lodo a disponer. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua*.

Schaaf O, Jarvis Ap, Van Der Esch Sa, Giagnacovo G. And Oldham Nj., (2000). *Rapid and sensitive analysis of azadirachtin and related triterpenoids from Neem (Azadirachta indica) by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry*.

Sharma G., Valenta D., Altman Y., Harvey S., Xie Y., Mitragotri S., J., (2010). Polymer particle shape independently influences binding and internalization by macrophages. *Vol. 147. Issue 3*, pp. 408-412.

Shirai K., Guerrero I., Huerta S., Saucedo G., Castillo A., González O., Hall G. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technology* 28 (2001) 446–452

Shrinivas, M., & Stevens, W. (2005). Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shirimp in a drum reactor and its chemical conversión to chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 1080-1087.

Siller C. J. H., (1999). Situación actual de la industria hortofrutícola en México. Centro de investigación en alimentación y desarrollo, A. C.

SINAREFI (2012). http://www.sinarefi.org.mx/redes/red_pitaya.html#cajaProyectos

Sinha, V.R.; Bansal, K.; Kaushik, R.; Kumria, R. & Trehan, A. (2004). Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. *Int. J. Pharm.*, Vol.278, pp. 1–23.

Sopeña F.; Maqueda, C. & Morillo E. (2009). Controlled release formulations of herbicides based on micro- encapsulation. *Cien. Inv. Agr.* Vol.35, No.1, pp. 27-42.

St Angelo AJ. (1989). A Brief Introduction to Food Emul- sions and Emulsifiers en Charalambous G. and Do- xastakis, G. (Eds) *Food emulsifiers, 1-8, Elsevier, Amsterdam.*

Stern O., (1924). "The theory of the electrolytic double layer," *Z. Elektrochem*, vol. 30, pp. 508-516.

Valdés P. S. C. (2010). Emulsiones. http://www.cneq.unam.mx/cursos_diplomados/cursos/antiores/medio_superior/dgapa_tere/material/04_cosmeto/archivos/Emulsiones-ENP.pdf

Valencia B.A. J., Sandoval J.S., Cardenas E., Michailides, T.J. and Rendon G., (2004). A new stern spot disease of pithaya causaden by usiocumm-like anamorph of *Botruosphaeria dothidea* (Morg Fr.) and not en Mexico. *Revista Mexicana de fitopatologia* 22: 140-142

Vargas M. (2008). Recubrimientos comestibles a base de quitosano: Caracterización y aplicación. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. España.

Vásconez M., Flores S., Campos C., Alvarado J., Gerchenson L., (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*. 42, 762-769.

Vernon C.E.J., Beristain, C.I. y Pedroza I. R. (2000). Mesquite gum (*Prosopis gum*). En Novel Macromolecules in Food systems. G. Doxastakis y V. Klosseoglov (Eds.). Elsevier Science, LTD, Holanda

Vernon C.E.J., Gomez S.A., Beristain C.I., Mosqueira, G., Pedroza R. y Moreno R.C. 1996. Color Degradation and Coalescence Kinetics of Aztec Marigold Oleoresin-in-Water Emulsions Stabilized by Mezquite or Arabic Gums and Their Blends. J.Text. Stud. 27: 625-641.

Villalobos R., Chanona J., Hernández P., Gutiérrez G., Chiralt A. (2005). Gloss and transparency of hydroxypropylmethylcellulose films containing surfactants as affected by their microstructure. Food Hydrocolloids, 19, 53-61

Villanova G. N. (2009). Microcápsulas de sílice preparadas a partir de sistemas tensioactivos para la liberación de sustancias activas. Tesis para obtener el grado de Maestro en Química. Universidad de Barcelona, España.

Wang, G. H. (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. Journal of Food Protection, 55:916–919.

Wei W.; Yu D.; Xiao W. (2008). Physical properties of fungal chitosan. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 2717- 2720.

Wills, R. (1999). Introducción a la fisiología y manipulación poscosecha de frutas y hortalizas y plantas ornamentales. Zaragoza: Acribia; p. 260.

Yáñez L. M., Armella V. M. A., Soriano R. R., Sánchez-Díaz L.D.M. (2009). *Estudios de tres cactáceas de la Mixteca Baja: conocimiento para su uso sustentable.*, Ediciones Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa., México, D. F.