



Casa abierta al tiempo  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa

**ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE  
MICROENCAPSULADOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE NEEM EN  
MATRICES DE QUITOSANO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A:

*M. en B. Carmen Guadalupe Hernández Valencia*

Directora de Tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto<sup>1</sup>

Asesoras:

Dra. Angélica Román Guerrero<sup>1</sup>

Dra. Ma. de los Angeles Aguilar Santamaría<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de  
Procesamiento de Desperdicios Orgánicos

<sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa

México, Cd. de México, 14 de mayo de 2019.

“El Doctorado 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 de CONACyT (No. 237292).

La obtención de nanofibrillas de quitina y formulación de emulsiones Pickering se llevaron a cabo en el Departamento de Química y Biotecnología de la Universidad de Tottori, bajo la asesoría del Dr. Shinsuke Ifuku gracias a la beca mixta asignada por CONACyT a Carmen Guadalupe Hernández Valencia para la realización de dicha estancia.

Ciudad de México a 14 de mayo de 2019

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

**Estudio de las propiedades fisicoquímicas y biológicas de microencapsulados de compuestos bioactivos de neem en matrices de quitosano.**

Que presentó:

**M. en B. Carmen Guadalupe Hernández Valencia**

**Comité tutorial:**

**Directora de tesis:**

**Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos.

**Asesoras:**

**Dra. Angélica Román Guerrero**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

**Dra. Ma. de los Ángeles Aguilar Santamaría**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Ciencias de la Salud.

**H. Jurado:**

**Presidente:**

Dr. Miquel Gimeno Seco

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



**Secretario:**

Dra. Angélica Román Guerrero

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



**Vocales:**

Dra. María de los Angeles Aguilar Santamaría

Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



Dra. Adriana Hernandez Rangel

Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.



## AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por la dirección, confianza, consejos y apoyo siempre brindado. Muchas gracias Doctora por la confianza en mí para la realización de este proyecto y por fomentar en mí el amor a la ciencia. Es usted un ejemplo de perseverancia y tenacidad.

A la Dra. Ángeles Aguilar por la disposición que siempre tuvo cuando yo tenía dudas y por mostrarme la grandeza de la biología. Gracias Doctora por ser una excelente persona.

A la Dra. Angélica Román por la disposición a lo largo del trabajo experimental.

Al Dr. Gabriel Vigueras y al Dr. Hugo Najera, por permitirme trabajar en sus laboratorios.

Al Dr. Miquel Gimeno y a la Dra. Adriana Hernandez, por sus valiosas observaciones y sugerencias al presente trabajo.

To Dr. Ifuku and to Dr. Saimoto, for receiving me in your laboratory and for all the support I received before, during and after the training research. Thanks to all my coworkers in the Tottori laboratory for helping me learn the techniques and manage the equipment. ありがとうございます.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Biopolímeros: Dra. Zaizy, Mariana, Jesús, Manuel, Karina, Raquel, Ivana, Stephany, Marco, Lety, Iván y demás personas que de alguna forma contribuyeron a la realización de este trabajo. Muchas gracias a todos por su ayuda incondicional y los gratos momentos compartidos.

A Carmen y la Mestra Graciela por acogerme como su propia hija en Japón y mostrarme como viven las mexicanas en otro país, orgullosas de sus raíces.

A Hideki, por que eres el japonés más mexicano que conozco, gracias por enseñarme muchas costumbres de Japón, por permitirme conocer tu religión y sobretodo por traducirme todo de japonés al español.

To my friends from Kaikan: Asmaa, Antoine, Rupp, Rini, Sakana and Vickie. Thanks.

A la Universidad Autónoma Metropolitana - Unidad Iztapalapa, institución en la que he aprendido mucho, por haberme dado la oportunidad de realizar este proyecto. Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para realizar la parte experimental de esta investigación.

## DEDICATORIAS

A mis padres Juan Carlos y Guadalupe, por darme la vida y haberme transmitido todas las enseñanzas que me han hecho quien soy. Gracias por haber creído en mí y haberme apoyado incondicionalmente en el desarrollo de todos mis estudios.

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

A mis abuelitos Julia, Ernesto y Eduardo, por siempre apoyarme y enseñarme que puedo valerme por mi misma.

Especialmente a mi abuelita Remedios, fuiste una madre para mi y aunque no alcanzaste a verme finalizar esta etapa de mi vida, me dijiste que estabas orgullosa y que donde fuera que estuvieras estarías presente este día, un millón de gracias abuelita por estar siempre que te necesite, por impulsarme a viajar e ir a dejarme y recogerme siempre al aeropuerto, simplemente gracias por fomentar en mi el amor a la vida y por enseñarme que el trabajo duro siempre tendrá sus recompensas.

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xii
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS .....	xiii
<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>6</b>
4.1 MICROENCAPSULACIÓN .....	6
4.2 EMULSIÓN.....	6
4.2.1 Estabilidad de emulsiones .....	7
4.3 CLASIFICACIÓN DE EMULSIONES .....	8
4.3.1 Emulsiones aceite en agua.....	8
4.3.2 Emulsiones Pickering.....	8
4.4 QUITINA (CT).....	9
4.4.1 Nanocristales y nanofibrillas de CT .....	10
4.5 QUITOSANO (CS).....	10
4.5.1 Mecanismo antimicrobiano de CS .....	11
4.5.2 Aplicaciones de CS .....	11
4.6 HIDROXIPROPILMETILCELULOSA (HPMC).....	12
4.7 GOMA DE MEZQUITE (GM) .....	13
4.8 2-HIDROXIETIL METACRILATO (HEMA) .....	13
4.9 NEEM (NM).....	14
4.10 RECUBRIMIENTOS PARA LA CONSERVACIÓN POSTCOSECHA.....	15
4.10.1 Frutos en México.....	16
<b>5. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>18</b>
<b>6. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN.....</b>	<b>18</b>
<b>7. OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
7.1 Objetivo general.....	19
7.2 Objetivos particulares .....	19
<b>9.1 ETAPA I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NEEM, QUITINA Y QUITOSANO.....</b>	<b>21</b>
9.1.1 Obtención de NM.....	21

<b>9.2 ETAPA II. FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE EMULSIONES O/W</b> .....	26
9.2.1 Formulaci3n NCH .....	26
9.2.2 Formulaci3n y caracterizaci3n de NCGM .....	27
9.2.3 Aplicaci3n de emulsiones cl3sicas como recubrimiento para conservaci3n poscosecha de frutos de pitaya .....	28
<b>9.3 ETAPA III. FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE EMULSIONES PICKERING</b> .....	33
9.3.1 Caracterizaci3n de NF .....	33
9.3.2 Formulaci3n y caracterizaci3n de Cg.....	35
9.3.3 Formulaci3n y caracterizaci3n de emulsiones pickering .....	36
9.3.4 Aplicaci3n de emulsiones pickering como recubrimiento para conservaci3n poscosecha de frutos de pitaya .....	37
<b>9.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	39
<b>9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	39
<b>10.1 ETAPA I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NEEM, QUITINA Y QUITOSANO</b> .....	39
10.1.1 Caracterizaci3n de NM.....	39
10.2 Caracterizaci3n de CT.....	51
10.2.1 Caracterizaci3n de CS .....	51
10.2.1 Caracterizaci3n de matriz de encapsulamiento NCH.....	52
10.2.2 Caracterizaci3n de emulsiones NCH y NCGM.....	53
10.2.3 Evaluaci3n de recubrimientos en conservaci3n poscosecha de pitaya....	54
<b>10.3 ETAPA III. FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE EMULSIONES PICKERING</b> .....	79
10.3.1 Caracterizaci3n de NF .....	79
10.3.2 Caracterizaci3n de Cg .....	82
10.3.3 Evaluaci3n de recubrimientos en conservaci3n poscosecha de pitaya.....	97
<b>11 CONCLUSIONES</b> .....	120
<b>12 PERSPECTIVAS</b> .....	121
<b>13 PUBLICACIONES</b> .....	121
<b>14 TRABAJOS PRESENTADOS</b> .....	143
<b>15 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	144
<b>16 ANEXOS</b> .....	152

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4. 1 Estructura de quitina (Marmol <i>et al.</i> , 2011).....	9
Figura 4. 2 Estructura de quitosano (Mármol <i>et al.</i> , 2011). .....	10
Figura 4. 3 Estructura de HMPC (Sánchez <i>et al.</i> , 2010). .....	12
Figura 4. 4 Estructura de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA) .....	14
Figura 4. 5 Estructura de Azaridactina (Schaaf <i>et al.</i> , 2000).....	15
Figura 8. 1 Descripción general de la metodología .....	20
Figura 10. 1 Capacidad antimicrobiana, expresada en porcentaje de inhibición empleando diferentes concentraciones de CNM (■), ENM (▨), HNM (▩) sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> . Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer. ....	45
Figura 10. 2 Micrografías de <i>Escherichia coli</i> : control (a) y expuestas con NHM (b); <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : control (c) y expuestas con NHM (d); <i>Listeria monocytogenes</i> : control (e) y expuestas con NH (f). Las flechas indican la formación del tabique transversal.....	47
Figura 10. 3 Recuento celular de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, control (■), etanol (▨) y expuestas a HNM (▩). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.....	49
Figura 10. 4 Citotoxicidad sobre linfocitos humanos: control (■), etanol (▨) y HNM (▩). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.....	50
Figura 10. 5 Capacidad antimicrobiana, expresada en porcentaje de inhibición empleando diferentes concentracion de CS sobre el crecimiento de <i>Escherichia coli</i> (■), <i>Listeria monocytogenes</i> (□) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (▩). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer. ....	52

Figura 10. 6 Esquema de reacción del entrecruzamiento entre HPMC y CS, empleando ácido cítrico como agente de reticulación (Alonso <i>et al...</i> , 2009). Donde R=CH <sub>3</sub> o CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> . .....	53
Figura 10. 7 Pérdida Fisiológica de Peso de pitaya ( <i>Stenocereus pruinosus</i> ). Control (●), CS (▽), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de <i>Fisher's LSD</i> . .....	56
Figura 10. 8 Color en epicarpio Control (●) al 0 d, Control (○), CS (▽), NCH (◇), NCGM (△) a los 15 d. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de <i>Fisher's LSD</i> . .....	58
Figura 10. 9 Porcentaje de inhibición fúngica. CS (▽), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de <i>Fisher's LSD</i> . .....	59
Figura 10. 10 Pérdida Fisiológica de Peso de pitaya ( <i>Stenocereus pruinosus</i> ). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de <i>Fisher's LSD</i> . .....	60
Figura 10. 11 pH (a), TA(b), TSS (C) y TSS TA <sup>-1</sup> (d) de pitaya ( <i>Stenocereus pruinosus</i> ). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de <i>Fisher's LSD</i> .....	63
Figura 10. 12 Firmeza de pitaya ( <i>Stenocereus pruinosus</i> ). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲).....	64
Figura 10. 13 Cambio de color en fruta Control (●) a 0 d, Control (○), CS (▽), CH (□), NCH (◇), NCGM (△) a los 15 d. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de <i>Fisher's LSD</i> . .....	65
Figura 10. 14 Contenido de betacianinas (a), betaxantinas (b) y betalaínas totales (c) en pitaya ( <i>Stenocereus pruinosus</i> ). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲).	

Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*. ..... 69

Figura 10. 15 Compuestos fenólicos solubles totales (a) y ácido ascórbico (b) en pitaya (*Stenocereus pruinosus*). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*. ..... 70

Figura 10. 16 Fotografía de microscopía óptica de un aislado de hongos teñidas con azul de metileno a 100x (a). Porcentaje de inhibición de hongos (b) y bacterias mesofílicas aerobias (c) CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*. ..... 72

Figura 10. 17 Liberación de azadiractina en fruta recubierta con NCH (◇) y NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*. ..... 73

Figura 10. 18 Análisis sensorial de Pitaya Control (●) a 0 d. .... 74

Figura 10. 19 Análisis sensorial de Pitaya Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲) a 15 d de almacenamiento. .... 75

Figura 10. 20 Micrografías por SEM de recubrimientos al tiempo inicial y después de 15 d de almacenamiento, areola (a), control (b y g), CS (c y h), CH (d y i), NCH (e y j) y NCGM (f y k), inoculación de *Alternaria* (l). RT son espinas radiales, CC son espinas centrales, A es la aerola, F es hongos y NC es la cera natural. .... 78

Figura 10. 21 SEM de CT (a) y NF después de 2 (b), 4 (c), 6 (d), 8 (e) ciclos en el molino. .... 81

Figura 10. 22 Espectro FTIR de NF con diferentes ciclos de molienda. .... 82

Figura 10. 23 a) Espectros de absorción FTIR de CS y HEMA. Injerto Cg en diferentes concentraciones de NCA sin purificar (b) y purificado (c). .... 86

Figura 10. 24 Viscosidad de Cg-NF ( $\Delta$ ), HNMSO+Cg-NF ( $\bullet$ ), CNMSO+ Cg-NF (O) y HNMNCSO+Cg-NF( $\blacktriangledown$ ). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer. ....	87
Figura 10. 25 Separacion gravitacional de emulsiones en las diferentes fases, en la tabla se muestra el porcentaje de separacion de la fase cremosa de la acuosa. ....	91
Figura 10. 26 Eficiencia de encapsulación y aceite en cremado de HNM+Cg-NF ( $\bullet$ ), CNMSO+ Cg-NF (O) y HNM-CNM-SO+Cg-NF( $\blacktriangledown$ ). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer. ....	92
Figura 10. 27 Viscosidad empleando 0.4% (a) y 0.6% (b) de NF. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer. ....	93
Figura 10. 28 Separacion gravitacional de emulsiones emplenado diferentes concentraciones de NF en diferentes pH. ....	96
Figura 10. 29 Eficiencia de encapsulación y aceite en cremado de emulsiones con 0.4 (a) y 0.6 (b) % NF en diferentes pH. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.....	96
Figura 10. 30 Pérdida fisiológica de peso del Bioensayo 1 (a): Control ( $\bullet$ ), Cg ( $\blacksquare$ ), NF ( $\blacklozenge$ ), NNCg ( $\blacktriangle$ ) a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ , $80\pm 5\% \text{HR}$ y del bioensayo 2 (b): Control ( $\bullet$ y O), CS ( $\blacktriangledown$ y $\blacktriangledown$ ), Cg ( $\blacksquare$ y $\square$ ) a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ (viñetas negras) y $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ (viñetas blancas), $80\pm 5\% \text{HR}$ . Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de <i>Fisher's LSD</i> . ....	99
Figura 10. 31 pH (a), TA(c), TSS (e) y TSS TA <sup>-1</sup> (g) del bioensayo 1 (a): Control ( $\bullet$ ), Cg ( $\blacksquare$ ), NF ( $\blacklozenge$ ), NNCg ( $\blacktriangle$ ) a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ , $80\pm 5\% \text{HR}$ y pH (b), TA(d), TSS (f) y TSS TA <sup>-1</sup> (h) del bioensayo 2 (b): Control ( $\bullet$ y O), CS ( $\blacktriangledown$ y $\blacktriangledown$ ), Cg ( $\blacksquare$ y $\square$ ) a $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ (viñetas negras) y $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ (viñetas blancas), $80\pm 5\% \text{HR}$ . Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de <i>Fisher's LSD</i> .....	103

Figura 10. 32 Firmeza del bioensayo 1 (a): Control (●), Cg (■), NF (◆), NNCg (▲) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\% \text{HR}$  y del bioensayo 2 (b): Control (● y ○), CS (▼ y ▽), Cg (■ y □) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  (viñetas negras) y  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  (viñetas blancas),  $80\pm 5\% \text{HR}$ . Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*..... 105

Figura 10. 33 Espesor del bioensayo 1 (a): Control (●), Cg (■), NF (◆), NNCg (▲) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\% \text{HR}$  y del bioensayo 2 (b): Control (● y ○), CS (▼ y ▽), Cg (■ y □) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  (viñetas negras) y  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  (viñetas blancas),  $80\pm 5\% \text{HR}$ . Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*..... 107

Figura 10. 34 Cambios de color el epicarpio y pulpa en temperatura de refrigeración y ambiente de bioensayo 1 y 2: Control (●) al inicio (0d); Control (○), CS (▽) Cg (□), NF (◇), NNCg (△) al final del bioensayo (18d para  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  y 9d para  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ ). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.  
..... 111

Figura 10. 35 Porcentaje de inhibición. Bioensayo 1 (a): Cg (■), NF (◆), NNCg (▲) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\% \text{HR}$  y del bioensayo 2 (b): CS (▼ y ▽), Cg (■ y □) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  (viñetas negras) y  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  (viñetas blancas),  $80\pm 5\% \text{HR}$ . Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD* ..... 118

Figura 10. 36 Micrografías por SEM de recubrimientos al tiempo inicial y después de 18 d de almacenamiento, control (a y b), CS (c y d), Cg (e y f), respectivamente..... 119

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 10. 1 Compuestos identificados mediante GC-MS del aceite comercial (CNM) y extractos de semillas (ENM) y hojas (HNM) con propiedades antimicrobianas y/o antifúngicas.....	41
Tabla 10. 2 Compuestos identificados mediante GC-MS del aceite comercial (CNM) y extractos de semillas (ENM) y hojas (HNM) con propiedades promotoras del crecimiento. ....	42
Tabla 10. 3 Caracterización de las emulsiones NCH y NCGM .....	54
Tabla 10. 4 Índices de color al inicio y final del almacenamiento .....	66
Tabla 10. 5 Caracterización de NF después de los diferentes ciclos en el molino, donde 0 ciclos refiere a la CT previo a la fibrilación. ....	80
Tabla 10. 6 Caracterización de Cg.....	84
Tabla 10. 7 Tamaño de encapsulado (dilución 1:10) empleando SO y diferentes tipos de N en la fase dispersa: HNM (hoja de neem), CNM (neem comercial) y una mezcla de estos (HNM-CNM) y como fase continua solo Cg y en combinación con diferentes concentraciones de NF (0, 2, 4, 6 y 8%). ....	89
Tabla 10. 8 Tamaño de partícula de emulsiones (dilución 1:10) con 0.4 y 0.6% de NF en diferentes pH, empleando como fase dispersa HNM-CNM-SO. ....	94
Tabla 10. 9 Potencial zeta de las emulsiones empleando 0.4 y 0.6 % de NF en diferentes pH.....	97
Tabla 10. 10 Índices de color de epicarpio y pulpa.....	112
Tabla 10. 11 Resumen de betaninas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos y ácido ascórbico en epicarpio y pulpa de pitaya. ....	114

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

---

W/O	Emulsión agua-en-aceite
O/W	Emulsión aceite-en-agua
CT	Quitina
NCT	Nanocristales
NF	Nanofibrillas
CS	Qitosano
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
GM	Goma de mezquite
HEMA	2-hidroxietil metacrilato
NM	Neem
ENM	Neem extraído de semillas
HNM	Neem extraído de hojas
CNM	Neem comercial
UPC <sup>2</sup>	Cromatografía de convergencia de alta presión
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a masas
MTT	3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5- difeniltetrazólico
NR	Rojo neutro
%DM	Porcentaje de desmineralización
%DP	Porcentaje de desproteinización
DA	Grado de acetilación
Mv	Peso molecular promedio viscosimétrico
NCH	Emulsión Neem-Qitosano entrecruzado con Hidroxipropilmetilcelulosa

---

---

CH	Quitosano entrecruzado con Hidroxipropilmetilcelulosa
PVA	Polivinil alcohol
NCGM	Emulsión Neem-Quitosano y goma de mezquite
L*	Luminosidad
a*	Valores negativos indican verde mientras valores positivos indican rojo
b*	Valores negativos indican azul y valores positivos indican amarillo
WI	Índice de blanqueamiento
RI	Índice de enrojecimiento
YI	Índice de amarillamiento
PFP	Pérdida fisiológica de peso
TA	Acidez total titulable
TSS	Sólidos solubles totales
PDA	Papa agar dextrosa
SEM	Microscopía electrónica de barrido
AsA	Ácido ascórbico
%I	Porcentaje de inhibición
$\zeta$	Potencial zeta
HR	Humedad relativa
Cg	Quitosano con injerto de 2-hidroxietil metacrilato
SO	Aceite de soja
NCA	Nitrato cerio amonio
%EE	Porcentaje de la eficiencia de encapsulado

---

## 1. RESUMEN

El desarrollo de recubrimientos comestibles con base en biopolímeros aplicados a productos hortofrutícolas frescos ha generado interés debido a su baja toxicidad, biodegradabilidad y biocompatibles, cuyo principal objetivo es aumentar la vida de anaquel preservando las características de calidad. El quitosano (CS), un heteropolisacárido lineal derivado de la N-desacetilación de la quitina con propiedades antimicrobianas, ha sido ampliamente utilizado para este fin. Por ello, se estudió la aplicación de recubrimientos a base de CS con el fin de mantener la calidad durante la etapa poscosecha de *Stenocereus pruinosus* mejor conocida como pitaya, cuyo interés radica en que además de ser endémico de México, tiene un alto valor como antioxidante que le confiere propiedades funcionales a quien los consumen debido a que reducen las probabilidades de ataques al corazón, diabetes y cáncer. Sin embargo, su vida poscosecha es de 3 días a temperatura ambiente por lo que solo se distribuye localmente.

Por esta razón este trabajo formuló, caracterizó y aplicó recubrimientos para prolongar la vida poscosecha de pitaya empleando un extracto de hojas y semillas del árbol de Neem (NM) que se han utilizado como biopesticida, en este documento se combinó NM con CS y otros biopolímeros para mejorar las características antimicrobianas de los recubrimientos. El trabajo experimental se dividió en tres etapas.

La primera consistió en obtener NM y CS. NM se obtuvo de las hojas y semillas, se comparó con un producto comercial. El CS fue obtenido mediante desacetilación termoquímica heterogénea a partir de quitina extraída de una fermentación láctica de desperdicios de camarón.

La segunda etapa consistió en la formulación de matrices de encapsulamiento para el producto de neem comercial, donde CS se entrecruzó con hidroxipropilmetilcelulosa (CH) y CS se mezcló con goma de mezquite (CGM). Se obtuvieron mediante la formulación de emulsiones estabilizadas por el uso de emulsificantes. Al caracterizarlas se obtuvo que solo NCGM (emulsión NM-CS-GM) fue estable, sin embargo, solo NCH (emulsión NM-CH) preservaron las características de calidad de la pitaya durante 15 días a temperatura  $10\pm 5^{\circ}\text{C}$  y  $80\pm 5\%$  de humedad relativa.

La etapa tres se encapsuló la mezcla de NM de hoja y comercial en una matriz de CS injertado con 2-hidroxietilmetacrilato (Cg). Esto se realizó mediante emulsiones pickering, estabilizadas por nanofibrillas de quitina. Nuevamente, la emulsión más estable no pudo preservar las características de calidad de la fruta, pero sí lo hizo Cg durante 18 días a temperatura  $10\pm 5^{\circ}\text{C}$  y  $80\pm 5\%$  de humedad relativa. Este resultado lo atribuimos a la presencia del 2-hidroxietilmetacrilato que es capaz de absorber agua y formar geles lo que impidió la migración de agua del interior al fruto al medio ambiente y mantuvo el resto de las características.

## 2. ABSTRACT

The development of edible coatings based on biopolymers has been applied for fresh fruit and vegetable products, therefore it is of great interest on the quest of materials with null toxicity, biodegradable and biocompatible, whose objective is increasing the storage life preserving the quality characteristics.

In this regard, Chitosan (CS) is a linear heteropolysaccharide derived from chitin N-deacetylation with antimicrobial properties that has been widely used. Therefore, in this study the application of coatings based on CS was studied to maintain quality of postharvest pitaya (*Stenocereus pruinosus*). *S. pruinosus* is an endemic fruit of Mexico and it has high nutritional value for the consumers because they reduce the chances of heart attacks and cancer, however, the main problem is its perishability with a postharvest life of only 3 days at room temperature hence it is only locally distributed.

For this reason, the aim of this study was the preparation, characterization and application of coatings to extend postharvest life of pitaya. The neem (NM) extract of leaf and seed from Neem tree has been used as a biopesticide, herein NM was combined with CS and other biopolymers to improve antimicrobial characteristics of coatings. The experimental work was divided into three stages. Initially, NE and CS were obtained and characterized. NM was obtained from the leaves and seeds and compared with a commercial product, while CS was prepared by thermochemical heterogeneous deacetylation from chitin extracted with a lactic acid fermentation.

The second stage consisted of the formulation of the encapsulated matrices that were cross-linked with hydroxypropyl methylcellulose (CH), and C mixed with Mezquite gum (CGM) that encapsulated commercial NM, these were obtained by oil in water emulsions. NCGM (emulsion NM-CS-GM) was the most stable emulsion, however when these

coatings were applied on pitaya, only NCH (NM-CH) preserved the fruit quality for 15 days at a temperature of  $10\pm 5^{\circ}\text{C}$  and  $80\pm 5\%$  relative humidity.

In the third stage, a mixture of leaf NM and commercial NM was also encapsulated in a matrix of C grafted with 2-hydroxyethylmethacrylate (Cg) by Pickering emulsion, which were characterized after being stabilized by chitin nanofibers as solid particles in nanoscale. The most stable emulsion could not preserve the characteristics of the fruit quality, but Cg extended 18 days at temperature of  $10\pm 5^{\circ}\text{C}$  and  $80\pm 5\%$  relative humidity the postharvest life of pitaya. A plausible explanation is the presence of 2-hydroxyethylmethacrylate that can absorb water and form gels preventing water migration of water avoiding desiccation and microbial contamination.

### 3. INTRODUCCIÓN

La incorporación de compuestos bioactivos para la formulación de productos benéficos e innovadores para la salud humana es un tema de gran interés que ha cobrado auge en los últimos años, principalmente en las industrias farmacéutica, cosmética, alimentaria y textil, entre otras; sin embargo, algunos de estos compuestos pueden ser altamente inestables ante factores ambientales. Por esta razón, en busca de una solución, se ha propuesto la encapsulación en matrices que ayuden a mantener estables los compuestos a largo plazo.

En ese sentido, el quitosano ha sido empleado por sus características biodegradables y biocompatibles a diferencia de otros polímeros de origen sintético, además representa actualmente un elemento importante en diversas industrias, debido a sus propiedades físicas, químicas y antimicrobianas (Alonso *et al.*, 2009 y 2010), así como la capacidad ser empleado como matriz de encapsulamiento (Hernández-Valencia *et al.*, 2016).

Una de las aplicaciones ha sido como recubrimiento de alimentos. México es un país rico en productos hortofrutícolas que tiene como principal problema que muchos son altamente perecederos, por lo que la formulación de nuevos recubrimientos pudiera ser una alternativa para la preservación de estos productos.

Un fruto que ha cobrado amplio interés por las propiedades funcionales que posee es *Stenocereus pruinosus* mejor conocido como pitaya de mayo, un fruto estacional que es altamente perecedero y que pierde fácilmente sus parámetros de calidad, además de ser susceptibles a la contaminación microbiana en un tiempo muy corto (3 a 5 días), razón por la cual su distribución comercial es a nivel local y no existen propuestas de preservación.

La presente investigación se enfocó hacia la búsqueda de un recubrimiento para prolongar la vida poscosecha de la pitaya considerando las características de este fruto empleando CS como matriz de encapsulamiento a través de emulsiones estabilizadas con tensoactivos y emulsiones pickering estabilizadas con nanopartículas sólidas.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **4.1 MICROENCAPSULACIÓN**

La microencapsulación es el proceso por el cual partículas individuales o gotas de un material activo se rodean con una cubierta para producir cápsulas en el rango de micrómetros a milímetros (Vila Jato, 1997). 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 (Hui *et al.*, 2013).

La microencapsulación es un procedimiento que incrementa o mantiene la viabilidad de diversos compuestos bioactivo (Flores-Belmont & Jimenez-Munguía, 2013), además 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 (Hui *et al.*, 2013). Este tipo de microencapsulados generalmente consisten en la mezcla de dos o más compuestos inmiscibles, razón por la cual son elaborados a través de emulsiones.

### **4.2 EMULSIÓN**

Es 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 (McClements, 2004). De manera general, están constituidas por tres regiones las cuales presentan propiedades fisicoquímicas diferentes: la fase dispersa, la fase continua y la interfase (Ruíz, 2004). La fase dispersa está constituida por los compuestos a encapsular, mientras que la fase continua serán las matrices de encapsulamiento como polímeros, por ejemplo, quitina, quitosano, hidroxipropilmetilcelulosa, 2-hidroxietil metacrilato, goma de mezquite entre otros. Finalmente, la interfase que depende del tipo de emulsión.

De acuerdo con la distribución de las fases acuosa y oleosa pueden ser nombradas emulsión agua-en-aceite (W/O) si la fase dispersa es la acuosa y la continua es la fase oleosa, pero si la fase oleosa está dispersa en la fase acuosa se conoce como emulsión aceite-en-agua (O/W) (Ruíz, 2004).

#### 4.2.1 Estabilidad de emulsiones

Los parámetros que determinan la estabilidad de las emulsiones son: el potencial zeta ( $\zeta$ ), el tamaño y distribución de gota (McClements, 2004).  $\zeta$  indica la carga que predomina en la emulsión, es el que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. Por lo tanto, es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula (Sandoval *et al.*, 2011). La distribución del tamaño de gota se expresa mediante la determinación de span, que nos indica que tan monodisperso (gotas del mismo tamaño) o polidisperso (gotas de diferente tamaño) es un sistema. El span relaciona los diámetros entre los que se encuentran el 10 y 90% de los tamaños de las partículas, por lo que cuando el span es uno se tiene una emulsión monodispersa y por lo tanto esta tendrá mayor estabilidad que una emulsión polidispersa (McClements, 2004).

## 4.3 CLASIFICACIÓN DE EMULSIONES

### 4.3.1 Emulsiones aceite en agua

Estas usan tensoactivos también llamados surfactantes o agentes de superficie activa, son especies químicas con una naturaleza anfifílica (estructura polar - no polar), con tendencia a localizarse en la interfase, formando una capa monomolecular adsorbida en la misma interfase (McClements, 2004), por esta razón este tipo de emulsiones son nombradas como clásicas.

Generalmente los agentes tensoactivos son compuestos de bajo peso molecular y con buena solubilidad en la fase continua (Loeza, 2007). Es importante conocer el tipo de fase continua y seleccionar un tensoactivo con mayor o menor tendencia a solubilizarse en medio oleoso o acuoso, lo cual depende de la importancia relativa de sus grupos hidrófilos (cabezas polares) e hidrófobos (cadenas largas hidrocarbonadas,  $C \geq 12$ ); este valor lo determina el balance hidrofílico-hidrofóbico (HLB) del tensoactivo. Por ejemplo, los emulsionantes con número HLB comprendido entre 8 y 18 se recomiendan para formar emulsiones O/W, siendo lo más usados el Tween 20 y 80 (Oh *et al.*, 2011). Sin embargo, el empleo de algunos tensoactivos de bajo peso molecular puede provocar efectos adversos a la salud humana como la irritación de tejidos, síndromes metabólicos y contaminación al medio ambiente (Chassaing *et al.*, 2015).

### 4.3.2 Emulsiones Pickering

Emulsiones Pickering, que se caracterizan por un sistema de estabilización empleando partículas sólidas que se acumulan en la interfaz aceite-agua para formar una barrera mecánica (estérica) que protege las gotas de la emulsión contra la coalescencia. Sin embargo, esta protección depende de la densidad de empaquetamiento de las partículas en la capa interfacial, es decir, se buscan partículas pequeñas, preferentemente en escala nanométrica, que logren estabilizar gotas en escala submicrométrica (Dickinson, 2017).

Este tipo de emulsiones ha cobrado importancia debido a que el uso de partículas sustituye a los surfactantes por lo que los efectos adversos se ven eliminados y las aplicaciones son más amplia (Chevalier & Bolzinger, 2013).

En la actualidad y en busca de compuestos de origen natural, se han formulado nanopartículas de quitina (CT) que sirvan como solidos capaces de estabilizar emulsiones (Tzoumaki *et al.*, 2011, 2015; Gülseren & Corredig, 2013; Perrin *et al.*, 2014; Ifuku *et al.*, 2009, 2015; Pang *et al.*, 2017, Demina *et al.*, 2018; Barkhordari & Fathi, 2018; Larbi *et al.*, 2018).

#### 4.4 QUITINA (CT)

La quitina (CT), poli( $\beta(1 \rightarrow 4)$ )-2-acetamido-2-deoxy-D-glucan (Figura 4.1), es un biopolímero que se encuentra en los exoesqueletos de crustáceos, como gambas, camarón, cangrejo y en hongos, en las membranas peritróficas, capullos de insectos y crustáceos, así como paredes fúngicas. Sin embargo, su aplicación es limitada debido a su alta cristalinidad lo que reulta en una pobre solubilidad en agua y solventes orgánicos comunes (Ifuku, 2014), lo que limita su aplicación, por ello la formulación de nanomateriales de este polímero ha permitido disolverlo en agua.

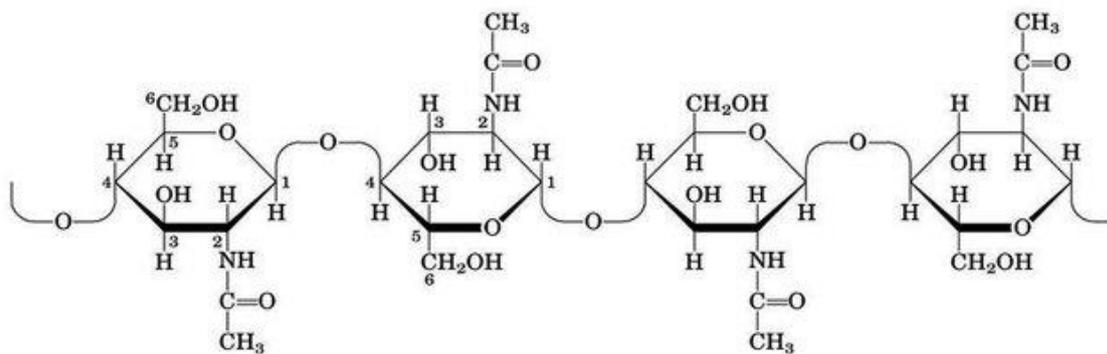


Figura 4. 1 Estructura de quitina (Marmol *et al.*, 2011).

#### 4.4.1 Nanocristales y nanofibrillas de CT

Los nanocristales (NCT) y nanofibrillas (NF) de CT, han cobrado interés debido a que se pueden aplicar en áreas alimenticias, farmacéuticas o cosméticas. Las NCT de manera convencional son obtenidos por hidrolisis ácida (Tzoumaki *et al.*, 2011, 2015; Gülseren & Corredig, 2013; Perrin *et al.*, 2014; Demina *et al.*, 2018; Barkhordari & Fathi, 2018; Larbi *et al.*, 2018), mientras que las NF pueden obtenerse por la oxidación mediada por TEMPO (Ifuku *et al.*, 2015; Pang *et al.*, 2017) o bien por métodos mecánicos (Ifuku *et al.*, 2009; 2014; Larbi *et al.*, 2018). Si bien, tanto NCT como NF han sido empleadas para estabilizar emulsiones tipo Pickering, Larbi *et al.* (2018) evaluaron las diferencias entre el uso de ambas, observando que las NF tienen una mejor capacidad de estabilización de emulsiones O/W debido a que tienen mayor viscosidad y mejor estabilidad térmica que los NCT que solo presentaron mayor grado de transparencia.

#### 4.5 QUITOSANO (CS)

El CS, poli ( $\beta$ -(1,4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa) o poli D-glucosamina (Figura 4.2), es un polisacárido biodegradable, no tóxico, biocompatible, semipermeable con propiedades filmogénicas y antimicrobianas, derivado de desacetilación parcial de la quitina (Larez, 2008).

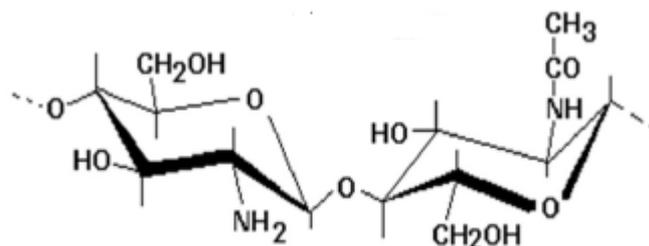


Figura 4. 2 Estructura de quitosano (Mármol *et al.*, 2011).

La presencia de grupos aminos en la cadena polimérica ha hecho del CS uno de los materiales más versátiles, por la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones, tales como las reacciones de anclaje de enzimas, reacciones de injerto, obtención de películas entrecruzadas, etc., por ello se obtienen diversos materiales que pueden ser implementados en varios campos de estudio (Lárez, 2008).

#### 4.5.1 Mecanismo antimicrobiano de CS

La actividad antimicrobiana depende de factores intrínsecos como el tipo de CS, 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 CS 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, Se ha propuesto que existe una relación directa entre su peso molecular (Hirano & Nagano, 1995; Bautista *et al.*, 2004) y su carácter catiónico. Posiblemente 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, provocan cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática y alteran las funciones celulares (Lárez, 2008).

#### 4.5.2 Aplicaciones de CS

Debido a sus excelentes propiedades biológicas el CS tiene aplicaciones en campos como la medicina, alimentación, ingeniería química, farmacia, nutrición, protección del medio ambiente, agricultura (Devlieghere *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008). En la rama alimenticia, ha sido ampliamente usado como recubrimiento en el área de postcosecha, 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, sea ha demostrado que actúa como barrera entre

el fruto y el ambiente, evitando así la evaporación de agua y alteraciones en el color del epicarpio (Martínez-Castellanos, 2009). Otra de las aplicaciones es que ha sido empleado solo o en combinación con otros polímeros para la formulación de matrices, en este trabajo hemos propuesto el uso de quitina, hidroxipropilmetilcelulosa, goma de mezquite y 2-hidroxietil metacrilato, con el objetivo de modificar las propiedades de CS.

#### 4.6 HIDROXIPROPILMETILCELULOSA (HPMC)

La HPMC (Figura 4.3) 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 y óxido de propileno (Kumar & Banker , 1993). Es un éter de celulosa con grupos metilo e hidroxipropilo, en el que 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 como agente estabilizador (espesante o potencializador de la viscosidad) de suspensiones y emulsiones (Ansel *et al.*, 2004), 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).

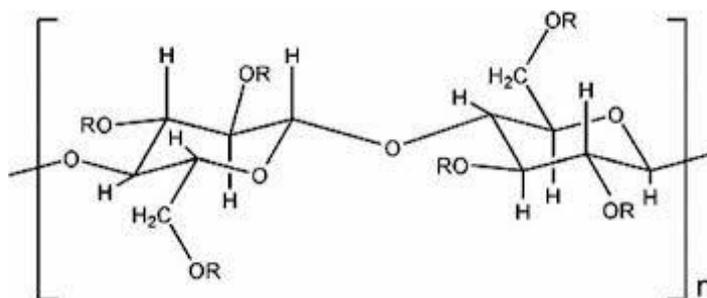


Figura 4. 3 Estructura de HMPC (Sánchez *et al.*, 2010).

#### **4.7 GOMA DE MEZQUITE (GM)**

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  $\beta$ -D-galactosa, constituyendo un esqueleto de uniones (1-3) y ramificaciones (1-6) conteniendo L-arabinosa (formas cíclicas de piranosa y furanosa), L-ramnosa,  $\beta$ -D-glucuronato y 4-o-metil- $\beta$ -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 GM ha sido reportada como agente emulsificante, como un eficiente microencapsulante de aceites esenciales y de oleorresinas utilizadas como colorantes naturales, entre otras aplicaciones (Bósquez & Vernon, 2005; 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 & Reichman, 1993).

#### **4.8 2-HIDROXIETIL METACRILATO (HEMA)**

El metacrilato de 2-hidroxietilo o 2-hidroxietil metacrilato (Figura 4.4), mejor conocido como HEMA, es un monómero con numerosas aplicaciones. Comercialmente se encuentra disponible y se prepara en una sola etapa a partir de metacrilato de metilo o ácido metacrílico, pueden polimerizarse fácilmente como la mayoría de los derivados metacrílicos. Este monómero, es soluble en agua, y después de su polimerización puede formar un hidrogel con amplias aplicaciones. Ha sido empleado para la inmovilización

de moléculas, como enzimas, células, drogas y fármacos; también se ha usado como implantes, para la preparación de lentes ópticos (Lee *et al.*, 2018). Además, recientemente su importancia radica en que el HEMA ha sido empleado para incrementar la hidrofiliidad superficial de emulsiones tipo Pickering (Yin *et al.*, 2018), obteniendo sistemas estables.

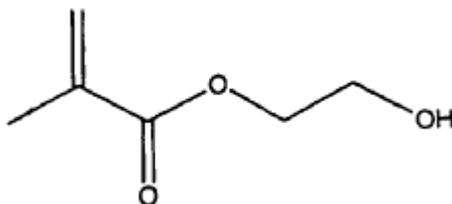


Figura 4. 4 Estructura de 2-hidroxietil metacrilato (HEMA)

Todos estos polímeros fueron usados como matrices de encapsulamiento, empleando como principio activo el neem (NM).

#### 4.9 NEEM (NM)

El árbol de Neem (*Azadirachta indica*) es tradicional de la India, en la actualidad es uno de más estudiados en el mundo (Bolívar *et al.*, 2009), debido a su enorme potencial antimicrobiano y antifúngico, es usado como fuente de plaguicidas, insecticidas y agroquímicos orgánicos (Brahmachari, 2004). Es una importante fuente de metabolitos secundarios dado que contiene más de trescientos compuestos bioactivos que han sido aislados de la planta, siendo los limonoides el grupo principal (tetranortriterpenoides). Entre ellos se encuentran azadiractina A, azadiractina B, salannina desacetil y salannina (Raizada *et al.*, 2001; Morgan, 2009).

La azadiractina ha sido encontrado en mayor concentración por lo que es considerado el principio activo, es un compuesto biológicamente activo que puede controlar el crecimiento hongos como *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*, *Trichothecium roseum* y *Alternaria alternata* presentes en ciruelas (*Prunus salicina*) y pera Yali (*Pyrus*

*bertschneideri*) (Wang *et al.*, 2010). La estructura de azadiractina (Figura 4.5) es similar a la hormona de insectos "ecdisona" que controla su metamorfosis. Este proceso requiere la cuidadosa liberación de hormonas como la ecdisona (un esteroide) y otros cambios fisiológicos para tener éxito, por lo que la azadiractina parece actuar como bloqueador de la hormona, lo que resulta en la inhibición de la muda de los insectos, interrumpiendo el ciclo de la vida y la reproducción de insectos. Adicionalmente, Raizada *et al.* (2001), afirman que la azadiractina es un compuesto no mutagénico sin toxicidad para los mamíferos o signos de mortalidad, estos estudios fueron realizados *in vivo*, en ratas expuestas durante 90 días quienes sin que mostraran cambios en el peso corporal o algún tipo de alteración.

Wijewardane y Guleria (2013), emplearon el NM para recubrir manzanas (*Malus domestica*) empleando concentraciones entre 1.5 y 2% a 18-25 °C y 65-75 % de humedad relativa (HR). Los frutos tuvieron una vida de almacenamiento de 45 d, la pérdida de peso fisiológica fue mínima, así como las enfermedades típicas postcosecha.

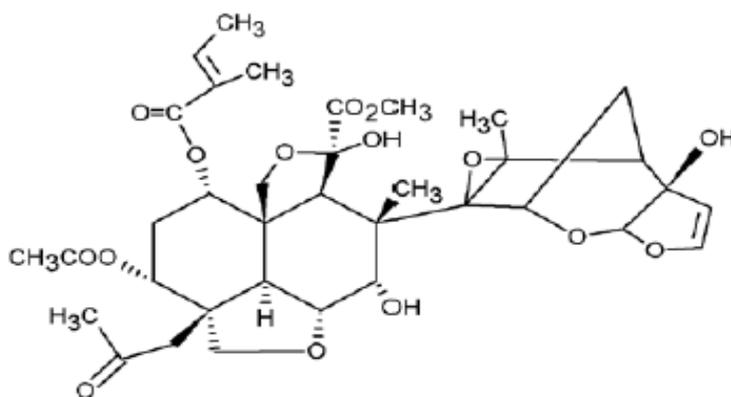


Figura 4. 5 Estructura de Azaridactina (Schaaf *et al.*, 2000).

#### 4.10 RECUBRIMIENTOS PARA LA CONSERVACIÓN POSTCOSECHA

El desarrollo de recubrimientos 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 se define como una matriz continua, ultra delgada, que se encuentra alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión de éste en una solución formadora del recubrimiento (Quintero *et al.*, 2010). Estos recubrimientos poseen propiedades mecánicas, generan un efecto de barrera frente al transporte de gases, también pueden adquirir diversas propiedades funcionales dependiendo de las características de las sustancias encapsuladas y formadoras de dichas matrices (Vásconez *et al.*, 2009). Uno de los usos más comunes es como para prolongar las características de calidad de los frutos.

#### 4.10.1 Frutos en México

El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó en 2018, que México es el sexto productor mundial de frutos y el cuarto exportador; sin embargo, hay algunas especies nativas del país, que actualmente no tienen alternativas de conservación que prolonguen su vida postcosecha, tal es el caso de una cactácea denominada pitaya.

##### 4.10.1.1 Pitaya

*Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxbaum es un cactus columnar endémico de las regiones áridas y semiáridas de México, cuyo fruto se denomina comúnmente pitaya de mayo (Armella *et al.*, 2003; Parra *et al.*, 2012), debido a que solo tiene una época de producción entre abril y junio, con un pico de producción en mayo; es un fruto no climatérico cuya cosecha se basa en los cambios de color, el brillo del epicarpio o la facilidad de desprendimiento de espinas en lugar de procedimientos estandarizados de control de calidad (Armella *et al.*, 2003; García-Cruz *et al.*, 2013). De acuerdo con el SIAP, en el año 2016 los principales productores de este fruto fueron Oaxaca, Jalisco y Puebla quienes sembraron más del 97% de la superficie total, destacando Oaxaca como el principal productor con 42.9%. El valor de la producción se registró en 68.38 millones de pesos. Para el 2017, la producción de este fruto en México fue de 4 678 toneladas.

Existen seis variantes identificadas de la fruta *S. pruinosa* según los colores de su pulpa, que pueden ser roja, amarilla, naranja, púrpura, blanca o rosada; estas tonalidades se deben a la presencia de betalaínas, que son pigmentos solubles en agua, contienen nitrógeno y se dividen en betaxantina y betacianinas. Las betaxantinas se encuentran en una concentración ligeramente más alta que las betacianinas en las variantes de carne roja (Chuck-Hernández *et al.*, 2016; García-Cruz *et al.*, 2016). Las betalaínas son quimiopreventivas con varias propiedades biológicas como antiinflamatorias, antioxidantes, antidiabéticas y anticancerígenas (Moreno *et al.*, 2008; Beltrán-Orozco *et al.*, 2009). Además, esta fruta tiene una cantidad significativa de compuestos fenólicos, vitaminas B, C y E, así como a minerales como el hierro, el cobre y el zinc (Bravo-Hollis *et al.*, 1991; García-Cruz *et al.*, 2013). Por la presencia de estos compuestos, la pitaya tiene un impacto beneficioso en la salud humana, por lo que es considerado un alimento funcional, por esta razón la tendencia del mercado para la pitaya está aumentando con excelente aceptabilidad para el consumo en fresco (Hernández-Valencia *et al.*, 2016).

Sin embargo, la principal problemática de esta fruta es el deterioro significativo después de 3 días, debido a que pierde su calidad de consumo. El empaque común de la fruta es en cajas de madera donde las espigas de las frutas contiguas causan daños entre éstas provocando la liberación del jugo de la pulpa lo que favorece la contaminación microbiana (Armella *et al.*, 2003) y además, existe una falta de información sobre la pérdida de calidad de pitaya debida a la descomposición, deshidratación y oxidación microbiana.

## 5. JUSTIFICACIÓN

Existe gran cantidad de frutos que, al igual que la pitaya, tienen una vida poscosecha muy breve. Para mantener sus cualidades y propiedades por más tiempo, en la industria alimentaria se emplean recubrimientos.

Considerando las características y propiedades antes descritas de la pitaya es considerada como un alimento funcional (Beltrán-Orozco *et al.*, 2009; Azeredo, 2009; García-Cruz *et al.*, 2013), se pensó en la conveniencia de elaborar un recubrimiento empleando extracto de hojas de Neem microencapsulado en matrices biopoliméricas de quitosano y otros polímeros con actividad antimicrobiana para retrasar el proceso de senescencia.

## 6. HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

El CS solo o mezclado con otros polímeros, será un material estructural que permitirá el diseño de matrices biopoliméricas para el encapsulamiento de compuestos bioactivos de NM, obteniendo recubrimientos antimicrobianos para prolongar la vida poscosecha de pitaya.

## 7. OBJETIVOS

### 7.1 Objetivo general

Preparar y caracterizar microencapsulados de compuestos bioactivos de neem en matrices poliméricas a base de quitosano mediante emulsiones aceite/agua estabilizadas con tensoactivos y nanofibrillas de quitina, para su uso como recubrimiento de frutas percederas para preservar sus características de calidad.

### 7.2 Objetivos particulares

- I. Obtener extractos - aceites de neem, determinar los componentes volátiles, concentración de azadiractina, corroborar la capacidad antimicrobiana y efecto citotóxico para determinar la concentración de neem a encapsular.
- II. Obtener quitina a partir de desechos de camarón, mediante un proceso biológico-químico para obtener nanofibrillas.
- III. Obtener quitosano a partir de la desacetilación de quitina y determinar la capacidad antimicrobiana para determinar el porcentaje de inhibición bacteriana.
- IV. Formular y caracterizar microencapsulados de neem en matrices a base de quitosano, mediante emulsiones estabilizadas por tensoactivos o nanofibrillas de quitina para su empleo como recubrimiento.
- V. Determinar el efecto de las emulsiones como recubrimiento para la preservación postcosecha de *Stenocereus pruinosus*.

## 8 MÉTODOLÓGÍA GENERAL

El trabajo experimental se dividió en tres etapas, en la primera se obtuvieron NM, CT y CS. La segunda y tercera etapa se formularon recubrimientos a partir de emulsiones estabilizadas con tensoactivos y nanofibrillas de CT, respectivamente. En ambas se determinó el efecto de las emulsiones y de los componentes de cada una sobre la conservación postcosecha de pitaya (Figura 8.1).

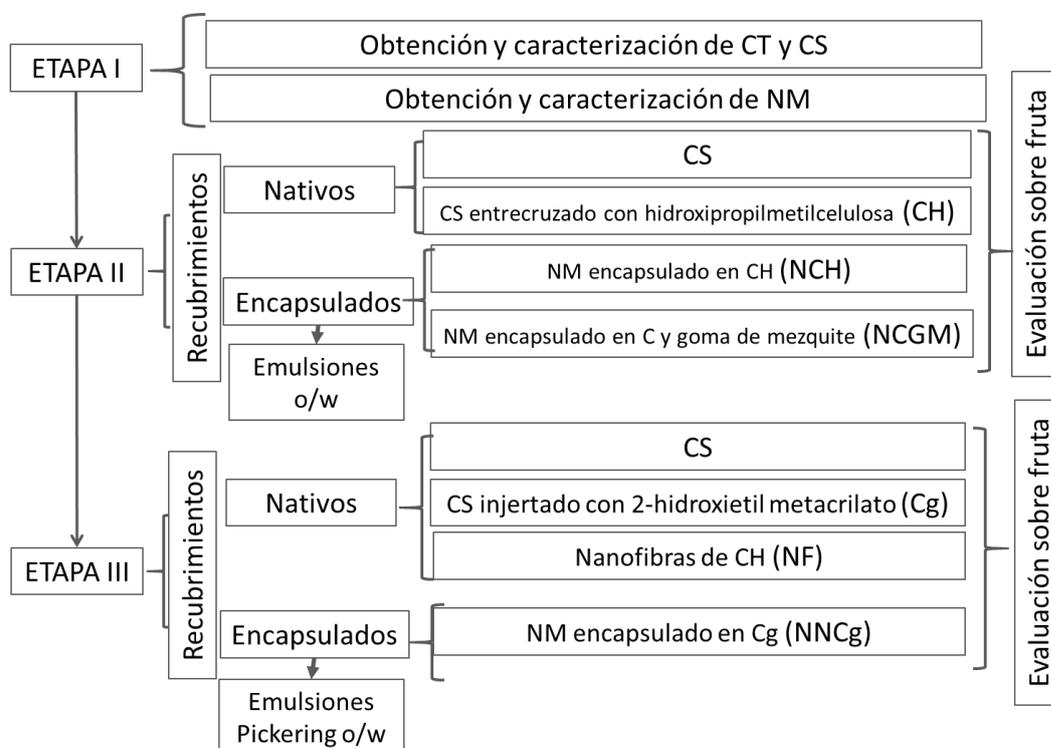


Figura 8. 1 Descripción general de la metodología

## 9 MATERIALES Y MÉTODOS

### 9.1 ETAPA I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NEEM, QUITINA Y QUITOSANO

#### 9.1.1 Obtención de NM

Se extrajo NM de las semillas (ENM) y hojas (HNM) que se obtuvieron de Culiacán, Sinaloa, México (24°47'25" N, 107°23'16" O); se usó como control un aceite comercial (CNM) de la empresa Neem-Mex. Para todos los casos, 20g de material vegetal triturado fue extraído por 80 mL de metanol, a temperatura ambiente por 48 h bajo agitación constante. Después se filtró usando un papel de 0.22 micrómetros. El filtrado se colocó en un rotavapor (Buchi R-200) a 40 °C, hasta la evaporación del solvente. El producto fue guardado en la oscuridad y se guardó en refrigeración hasta su uso (Moslem & El-Kholie, 2009; Adyanthaya *et al.*, 2014), para futuros análisis se disolvió en etanol.

#### 9.1.1.1 Caracterización de NM

##### 9.1.1.1.1 Actividad antirradicalaria

La determinación de la inhibición de la actividad de captación de radicales (RSA) se llevó a cabo en varias concentraciones de N (5 a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), que se agregaron con DPPH (Sigma-Aldrich, EE. UU.) recién preparado (0.1 mM metanol<sup>-1</sup> (ACS, Meyer). Los tubos de ensayo se agitaron en un vórtex y se incubaron a 30°C durante 30 min en la oscuridad; posteriormente se registró la absorbancia en una longitud de onda de 517 nm (espectrofotómetro UV-visible Genesys, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), la cuantificación se realizó por triplicado. Las determinaciones de RSA (%) se estimaron mediante la ecuación 9.1, considerando la absorbancia del etanol como control ( $A_0$ ) y la muestra ( $A_x$ ).

$$RSA \text{ (\%)} = \frac{A_0 - A_x}{A_0} \times 100 \quad (9.1)$$

Los datos experimentales se ajustaron al análisis estadístico Probit en el programa NCSS® (NCSS LLC, EE. UU.). El valor de  $CI_{50}$  fue la concentración de N que inhibe el 50% de la actividad de eliminación de radicales del DPPH (Carballo-Sánchez *et al.*, 2016).

#### 9.1.1.1.2 Caracterización por cromatografía de convergencia de alta presión (UPC<sup>2</sup>)

Cada muestra fue disuelta en metanol: éter de petróleo y después analizada por cromatografía de ultradesempeño (UPC<sup>2</sup>) (Waters ACQUITY, USA), usando una columna Viridis BEH 5  $\mu$ m, 4.6 mm X 100 mm, 30 °C como temperatura de columna, la temperatura de la muestra fue 5 °C, la detección fue a 217 nm, la presión de convergencia fue 1500 psi, la fase móvil fue CO<sub>2</sub> y metanol con un flujo 1.5 mL min<sup>-1</sup>. Se elaboró una curva patrón de azadiractina (Sigma-Aldrich, EE. UU.) para calcular la concentración de cada muestra.

#### 9.1.1.1.3 Caracterización por GC-MS

Se utilizó un cromatógrafo de gases masas Agilent Technologies 6890N con ionizador 5975B. Empleando helio como gas acarreador, la columna fue empacada HP5. La temperatura del inyector fue de 200 °C y el flujo del helio fue de 1 mL min<sup>-1</sup>. La temperatura del horno se programó iniciando en 50 °C incrementando hasta 300 °C a una razón de 8 °C min<sup>-1</sup>. El horno se mantuvo a 300 °C por 9 min. El voltaje de ionización de 70 eV (Akpuaka *et al.*, 2013). Para la identificación de los compuestos se realizó una comparación con la base de datos *Match Quality* por arriba del 90% del equipo.

#### 9.1.1.1.4 Capacidad antimicrobiana

Se determinó usando el kit de viabilidad celular bacteriana L13152 de Molecular probes, cuyos colorantes se prepararon de acuerdo con el instructivo del mismo. Se estandarizaron los inóculos de *Escherichia coli* (cepa B766,  $1 \times 10^7$ ), *Pseudomonas aeruginosa* (cepa 2783,  $1 \times 10^8$ ) y *Listeria monocytogenes* (cepa LNSP 031212,  $1 \times 10^8$ ), cada una de las

cepas fueron expuestas a diferentes tipos y concentraciones de NM 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5 y 2 mg mL<sup>-1</sup>, después de 24 h se tomaron 100 µL de cada muestra y se mezclaron con 100 µL del colorante, se encubaron 15 min a 37 °C. Se determinó la intensidad de fluorescencia en una longitud de onda de 530 nm (células vivas) y 630 nm (células muertas) para ambos casos la longitud de onda de excitación fue de 485 nm. Se cuantifico con un equipo Tecan M1000 PRO (Austria). Las absorbancias fueron transformadas a la cantidad de bacterias vivas, para lo cual se elaboraron curvas estándar de cada especie de microorganismo, según el manual de operación del kit. Finalmente, se calculó el porcentaje de inhibición, con la siguiente fórmula (9.2), donde CB corresponde a la cantidad de bacterias vivas.

$$I\% = \frac{CB_{control} - CB_N}{CB_{control}} \times 100 \quad (9.2)$$

#### 9.1.1.1.5 Microscopía electrónica de barrido

Las bacterias fueron inoculadas en medio de cultivo control y con HNM, después de 24 h se centrifugaron (Thermo scientific, Lvegend XTR, USA) a 4000 rpm durante 5 min, al pellet obtenido se agregó glutaraldehído (Sigma-Aldrich, EE. UU.) 5% (v v<sup>-1</sup>) y se dejaron en refrigeración por 48 h, después se fijaron 2 h con OsO<sub>4</sub> 1% (p v<sup>-1</sup>). Las preparaciones se deshidrataron en una serie graduada de alcohol y se cubrieron con oro (Martínez-Castellanos *et al.*, 2009). Se observaron con el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Japón).

#### 9.1.1.1.6 Citotoxicidad

Se extrajo sangre periférica de 6 donadores de edad promedio de 25 años, esta fue sembrada en medio McCoy (In vitro, México) suplementado con heparina (1% p p<sup>-1</sup>), antibiótico (0.4% p p<sup>-1</sup>) y fitohemaglutinina (4% p p<sup>-1</sup>) (MicroLab, México) y se incubó a 37 °C. A las 24 h se formaron tres lotes: un control, sin tratamiento alguno; otro expuesto

a etanol (2 % v v<sup>-1</sup>) (ACS, Meyer) y el experimental expuesto a HNM. 48 h después se sacrificaron los cultivos. Cada lote constó de tres cultivos de cada donador en cada prueba.

#### 9.1.1.1.6.1 Recuento celular

Para las pruebas de viabilidad, antes de la cosecha se tomó una alícuota (10 µL) de cada lote que se diluyó 1:1000 con solución salina isotónica 0.85% (p v<sup>-1</sup>) de cada lote y se contaron cada uno de los elementos sanguíneos. Para la cuantificación de eritrocitos y plaquetas se tomaron 10 µL de sangre diluida y se adicionaron 190 µL de solución de Daice (99 mL Citrato de sodio (30% p p<sup>-1</sup>), 1mL formaldehído concentrado) y 190 µL de solución de oxalacetato (Oxalacetato de amonio 1% p p<sup>-1</sup>); se homogenizaron e incubaron en un ambiente húmedo (HR 95%; Higrometro Rye, México) por 2 y 10 min respectivamente. Se observaron al microscopio. Los eritrocitos se contaron en una cámara de Neubauer en forma de cruz considerando los cinco cuadros medios de la cámara; para las plaquetas se consideraron las que estaban en los cuadros extremos. Finalmente, para el conteo de linfocitos, se tomaron 15 µL de sangre diluida adicionando 15 µL de solución de Turk (1mL ácido acético glacial, 2 mL solución de violeta de genciana al (2% p p<sup>-1</sup>)), se homogenizó e incubó en un ambiente húmedo (HR 95%) por 5 min. Se observó al microscopio contando los cuadros extremos de la cámara de Neubauer (Ajeigbe *et al.*, 2013).

#### 9.1.1.1.6.2 Ensayos MTT y RN

Se procedió según las técnicas de Mosmman (1983) y Repetto *et al.* (2008), respectivamente Para el ensayo de MTT, para evaluar la actividad metabólica mitocondrial. Se centrifugaron los cultivos, se tomaron 75 µL de leucocitos, se lisaron los componentes sanguíneos y se recuperaron los linfocitos, los cuales se incubaron con 50 µL del reactivo de MTT a 37°C durante 2.5 horas, posteriormente se añadieron 50 µL de

isopropanol a cada tubo y se re-incubaron a 37 °C por 10 min. El ensayo de rojo neutro, para evaluar la actividad lisosomal. Se recuperaron los linfocitos de la misma manera, se incubaron con 100 µL del reactivo de rojo neutro a 37°C durante 2.5 horas, posteriormente se lavaron con PBS y se destiñeron con etanol : agua : ácido acético (5 : 5 : 1) a cada tubo y se re-incubaron a 37 °C por 10 min. Ambas muestras se transfirieron a una caja con pozos para ELISA y la densidad óptica se registró en una longitud de onda de 595 nm para MTT y 492 nm para rojo neutro.9.1.2 Obtención de CT y CS

La CT se obtuvo a partir de un proceso biológico-químico mediante una fermentación ácido-láctica donde 30 kg de desechos de camarón (obtenido de la Nueva Viga en Iztapalapa) previamente triturados en un molino industrial Thomas-Scientific EUA (tamaño de partícula de 0.3cm) fueron colocados en un reactor tipo columna, se adicionó 5% (v p<sup>-1</sup>) de inóculo de *Lactobacillus sp.* y 10% (p p<sup>-1</sup>) de azúcar de caña, durante 120 h a 30°C. 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.*, 2011). La CT cruda fue purificada, se despigmentó con acetona grado industrial a una concentración de 1g quitina cruda/15mL acetona, se desmineralizó empleando HCl (0.4 M) en relación 1g quitina/15mL ácido y se desproteinizó con una solución NaOH (0.4M), cada proceso se llevó a cabo durante 1 h, bajo agitación magnética constante a temperatura ambiente (25°C) y llevando a la neutralidad.

El CS se obtuvo por desacetilación termoquímica a partir de CT. La CT obtenida se desacetiló con solución de NaOH al 50 % (p v<sup>-1</sup>) 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, fue secado a 40 °C para su análisis y caracterización (Rocha- Pino *et al.*, 2008).

### 9.1.2.1 Caracterización de CT y CS

Para la CT, se determinó el porcentaje de desmineralización (%DM) mediante la calcinación de la muestra a 550 °C, el porcentaje de desproteínización (%DP) fue obtenida por el método de Kjeldahl (Buchi K-424 y B-339, Suiza), tal como se describe en Aranday-García *et al.* (2017), el contenido de grasa se determinó en un Soxhlet (Buchi Extraction Unit E-812, Alemania) por gravimetría.

Para CT y CS, se caracterizó su grado de acetilación (DA) utilizando espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (<sup>1</sup>H-NMR) en un Bruker (AC 200) a 200 MHz en HCl / D<sub>2</sub>O con ácido 3- (trimetilsilil) propiónico como referencia interna (Hirai *et al.*, 1991).

Finalmente, para CS, se determinó el peso molecular promedio viscosimétrico (M<sub>v</sub>) de C en solución tampón de acetato con viscosímetro capilar tipo Oswald usando la ecuación de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada. Se determinó la capacidad antimicrobiana de CS siguiendo la determinación realizada para el NM empleando el kit de viabilidad celular bacteriana L13152 (Molecular Probes, USA), solo que en este caso se evaluaron diferentes concentraciones de 1 a 10 g L<sup>-1</sup>.

## **9.2 ETAPA II. FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE EMULSIONES O/W**

### 9.2.1 Formulación NCH

Se formuló la matriz de encapsulamiento que consistió en el entrecruzamiento de CS y HPMC. Para ello, CS (5 g L<sup>-1</sup>) se disolvió en 0.1 M de ácido acético. 15 g de HPMC se disolvieron en 644 mL de agua destilada y se agitó durante 24 h, luego se agregaron 322 mL de etanol y 3.2 mL de polietilenglicol y se agitó por 2 h. Las soluciones de CS y HPMC se mezclan en una proporción de 1:1 (v v<sup>-1</sup>), se adicionó ácido cítrico (50 g L<sup>-1</sup>), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

(37.5 g L<sup>-1</sup>) y D-sorbitol (10 g L<sup>-1</sup>) como agente de reticulación, catalizador y plastificante, respectivamente. La mezcla se agito hasta su completa disolución. Luego, la mezcla reacciono a 70 ° C durante 3 min (Alonso *et al.*, 2009). Para determinar la relación molar de HPMC injertado en CS, se formó una película, se secó a 60 ° C durante 6 h, se purifico con metanol anhidro en una proporción de 1:10 durante 24 h, nuevamente se secó y se disolvió en HCl / D<sub>2</sub>O para caracterizarse por <sup>1</sup>H NMR, se integró la señal asignada de la masiva considerando la relación de acetilo a masiva de las señales de CS nativo en la <sup>1</sup>H-MR, tal como lo reporta Nicio (2011).

Para la formulación de la emulsión, la fase dispersa tuvo una fracción másica dispersa de 0.1 y consistió en tween 20 (0.9 g L<sup>-1</sup>), tween 80 (0.6 g L<sup>-1</sup>), PVA (polivinil alcohol, 10 g L<sup>-1</sup>), CNM (16 g L<sup>-1</sup> (Hernandez-Valencia *et al.*, 2016) y aceite mineral (72.5 g L<sup>-1</sup>). Esta fase se agregó por goteo a la fase continua CH (fracción másica continua 0.9), hasta su completa incorporación, finalmente se homogenizó en un Ultra Turrax Ika 25 (Janke and Kunkel GmbH and Co., Alemania) a 10.000 rpm durante 10 min para obtener NCH.

### 9.2.2 Formulación y caracterización de NCGM

La fase dispersa (fracción másica dispersa 0.1) consistió en la mezcla de CNM (16 g L<sup>-1</sup>) y aceite mineral (84 g L<sup>-1</sup>) se agregó por goteo en una solución acuosa de GM (10 g L<sup>-1</sup>, en agua), se homogenizo en un sonicador durante 10 min a 40 Hz (Hielscher hasta 400S, Alemania), esta mezcla se agregó por goteo a una solución de CS (5 g L<sup>-1</sup> en ácido acético (0.1 M). La fase continua (CS y GM) tuvieron una fracción másica continua de 0.9). El pH se ajustó a 4 con NaOH (0.1 N) para obtener NCGM.

El tamaño (D<sub>3,2</sub>) y distribución (Span) de gota se determinaron por difracción de rayo láser empleando un analizador de tamaño de gota Malvern serie 2000 (Malvern Instruments, Malvern, U. K.), la mulsión fue dispersada en agua destilada a 200 rpm.

<sup>1</sup>  $D_{3,2}$  es diámetro promedio volumétrico que se obtiene de la ecuación 9.3:

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (9.3)$$

Donde  $n_i$  es la gota  $i$ , y  $d_i$  es el diámetro de la gota  $i$ .

<sup>2</sup>Span es la dispersidad del sistema que se obtiene de la ecuación 9.4:

$$Span = \frac{d(90) - d(10)}{d(50)} \quad (9.4)$$

Donde  $d(90)$  es el diámetro del 90% de las gotas;  $d(10)$  es el diámetro del 10% de las gotas y  $d(50)$  es el diámetro promedio de las gotas.

<sup>3</sup>Pot  $\zeta$  es potencial zeta

El potencial zeta se determinó en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). La estabilidad de la emulsión se determinó midiendo la separación de las fases después de dejar reposar 30 mL de cada emulsión en tubos cónicos de tapón de rosca graduados y almacenados en posición vertical a  $25 \pm 1$  ° C. La formación de crema se observó cada 15 min durante las primeras 9 h, y luego cada 24 h durante dos semanas y luego una vez por semana.

### 9.2.3 Aplicación de emulsiones clásicas como recubrimiento para conservación

poscosecha de frutos de pitaya

Se realizaron 3 bioensayos para la evaluación de los recubrimientos sobre la fruta, cuyo diseño experimental fue:

	BIOENSAYO 1	BIOENSAYO 2	BIOENSAYO 3
TRATAMIENTOS	1) Control 2) CS 3) NCH	1) Control 2) CS 3) NCH 4) NCGM	1) Control 2) CS 3) CH 4) NCH 5) NCGM
VARIABLES RESPUESTA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PFP</li> <li>• Color</li> <li>• Inhibición fúngica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PFP</li> <li>• Color</li> <li>• Inhibición fúngica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PFP</li> <li>• pH, acidez total titulable (AT), azúcares totales (Brix)</li> <li>• Ángulo de contacto</li> <li>• Firmeza</li> <li>• Color</li> <li>• Betaláinas</li> <li>• Compuestos fenólicos</li> <li>• Ácido ascórbico</li> </ul>

- Inhibición fúngica
- Inhibición de bacterias mesófilas aerobias
- Análisis sensorial
- Liberación de N
- Microscopía electrónica de barrido

### 9.2.3.1 Fruta: Pitaya

Frutos de Pitaya se cosecharon de un huerto en la región mixteca de Puebla, México. Después de la cosecha, los frutos se dejaron en la sombra para reducir la temperatura del campo y facilitar la eliminación de las espinas. Posteriormente, se eligieron los frutos con pulpa roja porque esta variante contiene la mayor cantidad de betalaínas (García-Cruz *et al.*, 2016). Las frutas fueron clasificadas las de mejor calidad y distribuidas al azar. Los recubrimientos se aplicaron por inmersión durante 1 min seguido de secado a temperatura ambiente durante 1 h. Las unidades experimentales se guardaron en recipientes tipo clamshell (0.5 kg) por triplicado y se almacenaron a  $10 \pm 2$  °C y humedad relativa (HR) de  $80 \pm 5\%$ .

### 9.2.3.2 Evaluación de los tratamientos en los frutos

#### I. Pérdida fisiológica de peso

Se registró el cambio en el peso (por triplicado), de cada una las unidades experimentales cada 24 h durante el almacenamiento. Los datos fueron expresados como porcentaje, calculado con la ecuación 9.5.

$$PFP(\%) = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (9.5)$$

Dónde: Pi = peso inicial y Pf = peso final

#### II. pH, acidez total titulable y sólidos solubles totales

Se extrajo el jugo de la pulpa de los frutos de cada tratamiento y se determinó el pH con un potenciómetro (pH210 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, E.U.). Los sólidos

solubles totales (SST) en un refractómetro portátil (Atago Co., Tokio, Japón) en °Brix. La acidez titulable (AT) se hizo por medio de una titulación volumétrica con NaOH (0.01 N) (método AOAC).

### III. Determinación del ángulo de contacto

El ángulo de contacto se determinó colocando una gota de agua desionizada (2 µL) en diferentes puntos de la superficie del epicarpio, se realizó por triplicado para las pitayas recubiertas y control. Las imágenes se tomaron con un microscopio Intel Qx3 (Intel Corporation, Santa Clara, CA, E. U.) Y se procesaron mediante análisis de imagen, software ImageJ (versión 1.41o, NIH, Bethesda, MD, E. U.).

### VI. Firmeza

Se evaluó la firmeza de la pulpa de las frutas con un texturómetro (Brookfield CT3, U.S.A) empleando una sonda de 4 mm de diámetro, con una distancia de penetración de 5 mm a una velocidad de 1mm s<sup>-1</sup> (Ochoa-Velazco & Guerrero-Beltrán, 2013).

### V. Cambio de color

El cambio de color del epicarpio se evaluó con un colorímetro Chromameter CR200 (Minolta, Osaka Japón) en tres partes equidistantes ecuatoriales y longitudinales de cada fruto, y expresó como L\*, a\* y b\* de acuerdo con la Comisión Internacional de l'Eclairage (CIE). Se utilizó un estándar de referencia blanco para calibrar el instrumento. Se calcularon los índices de blancura (WI), enrojecimiento (RI) y amarillamiento (YI) (Pankaj *et al.*, 2012), con las ecuaciones 9.6, 9.7 y 9.8 respectivamente:

$$WI = \sqrt{(100 - L^{*2}) + a^{*2} + b^{*2}} \quad (9.6)$$

$$YI = \frac{142.86b^*}{L^*} \quad (9.7)$$

$$RI = \frac{a^*}{b^*} \quad (9.8)$$

## VI. Determinación de betalaínas totales, compuestos fenólicos y ácido ascórbico

Se pesaron 2 g de pulpa, se adicionaron 20 mL de metanol (80%), esta mezcla se sónico durante 10 min en un baño de ultrasonido (Branson, MO, E. U.), posteriormente esta mezcla se agito por 20 min a 25 °C, la mezcla se centrifugo (Thermo Scientific, Legend XTR, Waltham, MA, E. U.). El sedimento se sometió a una segunda extracción. Ambos sobrenadantes fueron mezclados y filtrados (Columbia Filtros, México). La concentración de betacianinas y betalaínas se determinaron mediante espectrofotometría, y se calcularon de acuerdo con la ecuación 9.9 y se expresó en mg por kg de peso fresco de pitaya.

$$B = \frac{A \times D_f \times W \times V}{\epsilon \times P \times l} \quad (9.8)$$

donde B es el contenido de betacianinas o betaxantinas, A es la absorbancia (538 nm y 483 nm para betacianinas y betaxantinas, respectivamente),  $D_f$  es el factor de dilución, W es el peso molecular (550 g · mol<sup>-1</sup> y 308 g · mol<sup>-1</sup> para betanina e indicaxantina, respectivamente),  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar (60,000 L · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> y 48,000 L · mol<sup>-1</sup> · cm<sup>-1</sup> para betanina e indicaxantina, respectivamente), P es el masa de la muestra (g), y l es la longitud de la celda (1cm) (Castellanos-Santiago *et al.*, 2008).

Los compuestos fenólicos se determinaron a partir de la reacción de 0.1 mL de los extractos metanólicos y 0.25 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido con agua destilada (1: 1). Después de 6 min, se agregaron 1.25 mL de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (190 g · L<sup>-1</sup>) y el volumen se ajustó a 3 mL con agua destilada. La mezcla se dejó en oscuridad a temperatura ambiente durante 90 min, se leyó la densidad óptica a 760 nm (Genesys 6, Thermo Scientific, Waltham, MA, E. U.). La concentración de compuestos fenólicos se

estimó a partir de la curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar y se expresó como ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) (García-Cruz *et al.*, 2013).

Para la determinación del ácido ascórbico (AsA), se maceraron 2 g de pulpa con 5 mL de ácido tricloroacético (5%), se sonicaron durante 10 min, seguido de agitación durante 20 min y centrifugación (2200 g durante 10 min). 1 mL del sobrenadante, 0.5 mL de ácido tricloroacético, 1 mL de etanol, 0.5 mL de ácido fosfórico (0.4%), 1 mL de 1,10-fenantrolina (0.5%) y 0.5 mL de  $\text{FeCl}_3$  (0.03%). La mezcla se incubó durante 1 h para medir la absorbancia a 534 nm (Genesys 6, Thermo Scientific, Waltham, MA, E. U.). El contenido se determinó mediante una curva de calibración del estándar AsA y se expresó como  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (Li *et al.*, 2018).

## VII. Porcentaje de inhibición por cuenta en placa de hongos y bacterias mesofílicas aerobias

Se pesaron 10 g de epicarpio de cada tratamiento y se homogenizó en 90 mL de solución salina isotónica 0.9 % ( $\text{p v}^{-1}$ ). De la suspensión se elaboraron diluciones seriadas y cada una se inoculó por superficie en cajas Petri, para el conteo de hongos se empleó el medio de agar papa dextrosa (PDA) acidificado a pH de 3.5 con ácido tartárico, de acuerdo a la NOM-111-SSA1-1994. Se contaron las colonias a las 96 h de la inoculación. Mientras que para las bacterias mesofílicas aerobias se empleó el medio agar para métodos estándar. Por otro lado, se adiciono ácido acético como controles en cada medio a concentraciones 0.1, 0.05, 0.044 y 0.044M que corresponden a las concentraciones de los recubrimientos CS, CH, NCH y NCGM respectivamente. Se calculó el porcentaje de inhibición con la ecuación 9.9:

$$I\% = \frac{UFCmL^{-1}_{control} - UFCmL^{-1}_{recubrimiento}}{UFCmL^{-1}_{control}} \times 100 \quad (9.9)$$

## VIII. Liberación de CNM de las emulsiones

La concentración de CNM se analizó durante el almacenamiento, para ello se lavaron los frutos de cada tratamiento con metanol, este se evaporó y el concentrado se inyectó en UPC<sup>2</sup> a las mismas condiciones que la técnica empleada para la determinación de azadiractina (sección 9.1.1.1.2).

## IX. Análisis sensorial

La evaluación sensorial se realizó con un jurado no entrenado (50 consumidores). Los panelistas calificaron a la pulpa según su apariencia, aroma, sabor y consistencia con una escala hedónica de 7 puntos, desde 1 extremadamente desagradable hasta 7 extremadamente agradable.

## X. Microscopía electrónica de barrido

Los epicarpios de las muestras se cortaron y se fijaron en glutaraldehído 5% (v v<sup>-1</sup>) por 24 h, y luego con OsO<sub>4</sub> 1% (p v<sup>-1</sup>) por 2 h. Las preparaciones se deshidrataron en una serie graduada de alcohol y se cubrieron con oro antes de observarlas en el microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-5900 LV, Japón) (Martínez-Castellanos *et al.*, 2009).

## **9.3 ETAPA III. FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE EMULSIONES PICKERING**

### 9.3.1 Caracterización de NF

1% (p p<sup>-1</sup>) de CT fue disuelto en ácido acético 0.5 % (p p<sup>-1</sup>) por 1 h en agitación constante. Después se trató en un molino (MKCA6-3; Masuko Sangyo) a 1500 rpm por 2, 3, 6 y 8 ciclos. El tratamiento de molienda se realizó con un calibre de holgura de -1.5 (correspondiente a un desplazamiento de 0.15 nm) desde la posición cero, que se determinó como el punto de contacto ligero entre las piedras de molienda (Ifuku *et al.*, 2011).

Para caracterización de las NF se observaron por microscopia electrónica de barrido (SEM), para ello las suspensiones de nanofibrillas se diluyeron con etanol y se secaron. Las muestras secas fueron recubiertas con una capa de platino de aproximadamente 2 nm usando una máquina de recubrimiento por pulverización iónica, las observaciones se realizaron en un equipo JSM-6700F; JEOL, operando a 2 kV. La viscosidad de CT se determinó con un equipo digital Brookfield DV-E utilizando un eje LV-3 (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA) a una temperatura de  $10 \pm 1^\circ\text{C}$ . Se registraron los espectros infrarrojos con un espectrofotómetro FT-IR (Spectrum 65, Perkin-Elmer Japón) equipado con un archivo adjunto ATR. Y finalmente, se determinaron los perfiles de difracción de rayos-X (Ultima IV, Rigaku con Ni-filtrado  $\text{CuK}\alpha$ , operando a 40 kV y 40 Ma). Los perfiles de difracción se detectaron usando un goniómetro de rayos X, escaneando desde  $5-45^\circ$ . El índice de cristalinidad (CI) de cada muestra se estimó según lo reportado por Focher *et al.* (1990) usando las intensidades de los picos (110) alrededor de  $20^\circ$  (correspondientes a la zona cristalina) y  $110^\circ$  (zona amorfa) de acuerdo con la ecuación 9.10.

$$IC_R(\%) = \frac{I_{110} - I_{am}}{I_{110}} \times 100 \quad (9.10)$$

El tamaño de cristal aparente  $D_{app}$  de la quitina del plano (110) fue determinado por la ecuación de Scheerrer (ecuación 9.11):

$$D_{app} = \frac{k\lambda}{\beta_0 \cos \theta} \quad (9.11)$$

Donde,  $\beta_0$  (en radianes) es el ancho medio de la reflexión corregida para el ensanchamiento instrumental; k es una constante, indicativo de la perfección cristalina fue asumido como 0.9;  $\lambda$  es la longitud de onda de la radiación utilizada;  $\theta$  es la mitad del Angulo de Bragg (Focher *et al.*, 1990).

### 9.3.2 Formulación y caracterización de Cg

Se emplearon las metodologías propuestas por Casimiro *et al.* (2005) y Radhakumary *et al.* (2003), con algunas modificaciones. El CS y HEMA (relación molar 1:4) (Sigma-Aldrich, E. U.) fueron colocados en un matraz donde se agregaron las diferentes concentraciones de fotoiniciador nitrato de cerio amonio (NCA a 1, 3, 5, 8 y 10%) (Meyer, México), la reacción se llevó a cabo a 70°C durante 4h con agitación constante y bajo radiación UV (365nm). Después la reacción se detuvo en un baño de hielo y las muestras fueron centrifugadas a 8000rpm por 10 min, el pellet fue secado a 40°C. Se purificaron en un soxhlet con acetona (Meyer, México) por 8h y nuevamente se secaron para posteriores análisis.

Para la caracterización se obtuvieron los parámetros de injerto utilizando las siguientes expresiones:

Conversión del injerto (ecuación 9.12)

$$\text{Conversión}(\%) = \frac{\text{Peso de injerto} - \text{Peso de CS}}{\text{Peso de monomero}} \times 100 \quad (9.12)$$

Rendimiento del injerto (ecuación 9.13)

$$\text{Rendimiento}(\%) = \frac{\text{Peso de injerto}}{\text{Peso de CS} + \text{Peso de HEMA}} \times 100 \quad (9.13)$$

Eficiencia del injerto (ecuación 9.14)

$$\text{Eficiencia}(\%) = \frac{\text{Peso de injerto} - \text{Peso de CS}}{\text{Peso de CS}} \times 100 \quad (9.14)$$

Se realizaron espectros de absorción IR de las muestras por FTIR (Perkin Elmer 100, USA) antes y después de la purificación, a 25°C, 120 veces, en un intervalo de número de onda de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>. Por la técnica colorimétrica con ninhidrina (Sigma-Aldrich, E. U.) reportada por Chung *et al.* (1998) se determinó el contenido de nitrógeno, como grupos amino libres del CS. Las muestras obtenidas fueron pulverizadas manualmente,

entonces 1mL de agua destilada fue agregada a 0.01g muestra y 1mL de solución de ninhidrina a pH 5.8. La mezcla fue hervida en agua por 10 min, y puestas en un baño de agua con hielos. Finalmente, se agregaron 5 mL de etanol (50% v v<sup>-1</sup>) a cada muestra y se agitaron en un vórtex por 5 seg. La absorbancia se determinó a una longitud de onda de 570 nm, usando C como estándar (Alonso *et al.*, 2010). Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado.

### 9.3.3 Formulación y caracterización de emulsiones pickering

Se formularon emulsiones en cuatro etapas, las fases dispersas para la primera fue HNM (0.25mg mL<sup>-1</sup>), la segunda fue CNM (2mg mL<sup>-1</sup>), para la tercera y cuarta fue HNM+CNM en todos los casos se completó la fase dispersa al 10% (p p<sup>-1</sup>) con aceite de soja (SO) (Ajinomoto, Japón) , para las primeras tres etapas la fase continua fue la mezcla de Cg, empleando una concentración final de CS a 5 g L<sup>-1</sup> y NF en concentraciones 0.5, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8% (p p<sup>-1</sup>), para la cuarta fase la fase dispersa fue Cg y NF (0.4 y 0.6%) a pH 2.2, 3.5, 4.5 y 5.5. La fase dispersa fue goteada a la fase continua y homogenizada a 9500 rpm por 7 min y 13500 rpm por 3 min en un homogeneizador Ultra Turrax T-25 (Janke and Kunkel GmbH and Co., Alemania).

Se caracterizó la viscosidad de las emulsiones un equipo digital Brookfield DV-E utilizando un eje LV-3 (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA) a una temperatura de 10±1°C. La estabilidad gravitacional fue determinada por la inspección visual a lo largo de 8d. Mientras que la estabilidad acelerada fue determinada transfiriendo 15 g de emulsión a un tubo cónico y centrifugado (AS ONE AS185, Japan) a 4000g por 5 min (Zhang *et al.*, 2015). El aceite flotante, la fase de cremado y el sobrenadante fueron observados y se determinaron sus volúmenes a partir de su espesor, que se midió con un calibrado digital (Mitutoyo, absolute digimatic, Japón). Estos

volúmenes se usaron para determinar la eficiencia de encapsulado (EE) (ecuación 9.15), el porcentaje de aceite en la parte cremada (ecuación 9.16) (Jia *et al.*, 2015).

$$EE(\%) = \frac{\text{volumen de creamado}}{\text{volumen de la emulsion}} \times 100 \quad (9.15)$$

$$\text{Aceite en creamado (\%)} = \frac{\text{volumen de aceite}}{\text{volumen de creamado}} \times 100 \quad (9.16)$$

El tamaño de partícula se determinó por microscopía óptica, tomando fotografías de las emulsiones diluidas (1:10) y se capturaron en un microscopio (Olympus BX53, Japón) equipado con una cámara digital (Olympus U-TV1XC, Japón) y un software CellSens Standard, 2009. Los diámetros de los encapsulados se determinaron mediante el software Image J 1.51k (USA) tomando el promedio de 300 encapsulados. El potencial zeta ( $\zeta$ ) de las emulsiones se determinó en un equipo ELSZ-1000 (Otsuka Electronics Co., Ltd, Osaka, Japan). Finalmente, las muestras se colocaron en una cámara de vacío para retirar las burbujas de aire y se determinó su viscosidad con un equipo digital Brookfield DV-E utilizando un eje LV-3 (Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, MA) a una temperatura de  $10 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $28 \pm 2\%$  HR. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

#### 9.3.4 Aplicación de emulsiones pickering como recubrimiento para conservación poscosecha de frutos de pitaya

Se realizaron 2 bioensayos para la evaluación de los recubrimientos sobre la fruta, cuyo diseño experimental fue:

	BIOENSAYO 1	BIOENSAYO 2
TRATAMIENTOS	1) Control 2) Cg 3) NF 4) NNCg  pH recubrimientos en 5.5 Temperatura: 10±2°C Humedad relativa: 80±5%HR	1) Control 2) CS 3) Cg  pH recubrimientos en 5.5 Temperatura: 10±2°C y 25±3°C Humedad relativa: 80±5%HR
VARIABLES RESPUESTA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PFP</li> <li>• pH, acidez total titulable (AT), azúcares totales (Brix)</li> <li>• Ángulo de contacto</li> <li>• Firmeza</li> <li>• Espesor de epicarpio</li> <li>• Color en pulpa y epicarpio</li> <li>• Betalaínas</li> <li>• Compuestos fenólicos</li> <li>• Ácido ascórbico</li> <li>• Inhibición fúngica</li> <li>• Microscopia electrónica de barrido</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PFP</li> <li>• pH, acidez total titulable (AT), azúcares totales (Brix)</li> <li>• Ángulo de contacto</li> <li>• Firmeza</li> <li>• Espesor de epicarpio</li> <li>• Color en pulpa y epicarpio</li> <li>• Betalaínas</li> <li>• Compuestos fenólicos</li> <li>• Ácido ascórbico</li> <li>• Inhibición fúngica</li> <li>• Microscopia electrónica de barrido</li> </ul>

#### 9.3.4.1 Evaluación de los tratamientos en los frutos de pitaya

I. Pérdida fisiológica de peso

II. pH, acidez total titulable y sólidos solubles totales

III. Determinación del ángulo de contacto

VI. Firmeza

Se evaluó la firmeza de la pulpa de las frutas con un texturómetro manual (TR, Italia).

III. Espesor del epicarpio

Se determinó el espesor del epicarpio a lo largo del almacenamiento, empleado un calibrador análogo vernier (Metro Mex, México).

IV. Cambio de color

VI. Determinación de betalainas totales, compuestos fenólicos y ácido ascórbico

V. Porcentaje de inhibición por cuenta en placa de hongos

VI. Microscopía electrónica de barrido

Todos los análisis siguieron el procedimiento de la sección 9.2.3.2.

#### **9.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para los experimentos se utilizó un diseño completamente al azar. Los datos experimentales se sometieron a análisis de varianza (ANOVA), para la formulación de NF y emulsiones pickering los grupos fueron comparados con prueba de comparación múltiple de medias Tukey-Kramer ( $p < 0.05$ ), para la aplicación de recubrimientos sobre pitaya se compararon con una prueba de comparación múltiple de medias de la prueba de LSD de Fisher ( $p < 0.05$ ), solo los datos de evaluación sensorial que se analizaron mediante de la prueba de Friedman para datos no paramétrico ( $p < 0,05$ ). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico NCSS.

### **9 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **10.1 ETAPA I. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NEEM, QUITINA Y QUITOSANO**

##### 10.1.1 Caracterización de NM

###### *10.1.1.1 Actividad antiradicalaria*

La actividad antirradical de NM se determinó con el método DPPH, con el que la concentración necesaria para disminuir la actividad del 50% de radical DPPH ( $IC_{50}$ ) se estimó en  $0.0178 \pm 0.0006 \text{ g L}^{-1}$  para CNM, mientras que para HNM fue  $0.034 \pm 0.002 \text{ g L}^{-1}$  y  $0.175 \pm 0.080 \text{ g L}^{-1}$  para ENM, todos los valores fueron inferiores a los reportados anteriormente  $0.039 \text{ g L}^{-1}$  (Nahak & Sahu, 2010),  $0.115 \text{ g L}^{-1}$  y  $0.944 \text{ g L}^{-1}$  (Sithisarn *et*

*al.*, 2005) respectivamente. Esta variación se atribuye a la presencia de otros compuestos fenólicos, alcaloides y derivados presentes en la muestra de NM.

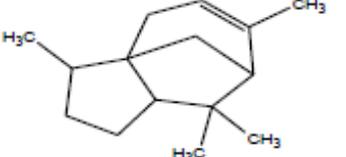
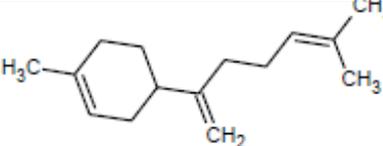
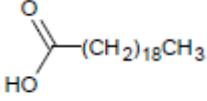
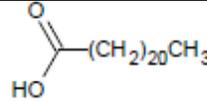
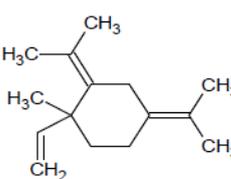
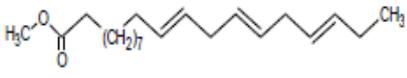
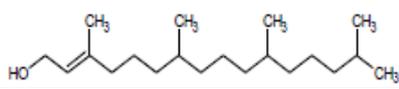
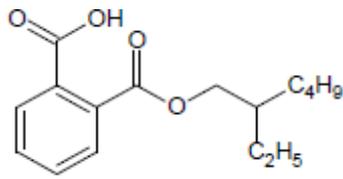
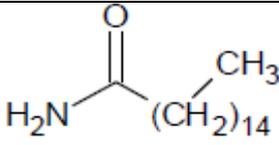
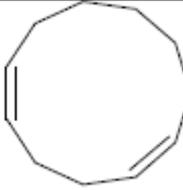
#### *10.1.1.2 Caracterización por cromatografía de convergencia de alta presión (UPC<sup>2</sup>)*

Se determinó la concentración de la Azadiractina porque además de ser considerado el principio activo, ha sido reconocida por su actividad inhibitoria sobre el crecimiento de microorganismos e insectos, se ha observado que tiene efectos en el proceso de muda y la esterilidad debido al bloqueo en la formación de microtúbulos en células en división. El modo de acción de la azadiractina en el protozoo *Tetrahymena thermophila* también se ha reportado sobre la proliferación celular e interfiere la síntesis de ARN (Morgan, 2009). Por la técnica de UPC<sup>2</sup> obtuvieron las diferentes concentraciones de azadiractina: CNM tuvo 3382 ppm, ENM tuvo 477ppm y HNM tuvo 1762 ppm. Lee *et al.* (2013), analizaron alrededor de 60 aceites comerciales encontraron que concentraciones entre 41.6 a 3440 ppm logran tener propiedades antimicrobianas; por esta razón se decidió hacer análisis microbiológicos con las muestras de NM.

#### *10.1.1.3 Caracterización por Cromatografía de Gases acoplada a Masas (GC-MS)*

A pesar de que la Azadiractina es un limonoide sumamente importante, existe la presencia de otros compuestos que pueden afectar la respuesta antimicrobiana, por ello se determinaron los compuestos volátiles presentes en las muestras por GC-MS, con lo cual se encontró un total de 21 compuestos con diferentes características, principalmente agrupados en dos clases: las antimicrobianas (Tabla 10.1) y los posibles promotores de crecimiento (Tabla 10.2).

Tabla 10. 1 Compuestos identificados mediante GC-MS del aceite comercial (CNM) y extractos de semillas (ENM) y hojas (HNM) con propiedades antimicrobianas y/o antifúngicas.

Nombre común	Nombre de IUPAC	Estructura	CNM	ENM	HNM	Propiedad (Referencias)
<i>Di-epi-alfa-cedreno</i>	2,6,6,8-Tetrametiltricyclo [5.3.1.0 (1,5)] undec-8-eno		X			AM y AF (Mostafa <i>et al.</i> , 2011; Al-Rahmah <i>et al.</i> , 2013)
1-metil-4- (5-metil-1-melineno-4-hexenil) -ciclohexano	1-metil-4- (5-metil-1-melineno-4-hexenil) -ciclohexano		X			AN (Uribe <i>et al.</i> , 1990)
Ácido araquidónico	Ácido eicosanoico		X			AN y AF (Akpuaka <i>et al.</i> , 2013)
Ácido beenico	Ácido docosanoico		X			AN (Akpuaka <i>et al.</i> , 2013)
Gama- <i>Elemene</i>	(-) - $\gamma$ : (3R, 4R) -1-Isopropil-4-metil-3- (prop-1-en-2-il) -4-vinilciclohex1-ene			X		AN (Akpuaka <i>et al.</i> , 2013)
Metil homogamma linolenato	11,14,17-Metil eicosatrienoato			X		AN (Akpuaka <i>et al.</i> , 2013)
Fitol	((2E, 7R, 11R) - 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol			X		AC y AF (Helmy <i>et al.</i> , 2007; Akpuaka <i>et al.</i> , 2013)
Ácido 1,2-bencenodicarboxílico, mono (2-etilhexil éster)	Ácido 2- (2-etilhexiloxycarbonyl) benzoico			X		AN (Akpuaka <i>et al.</i> , 2013)
Hexadecanamida	Hexadecanamida			X		AF (Varshney <i>et al.</i> , 2014)
1,5-ciclododecadieno	(1E, 5E) -1,5-ciclododecadieno				X	AN (Oloyede, 2016)

Ácido pentadecílico	Ácido pentadecílico				X	AF (Akpuaka <i>et al.</i> , 2013)
Metil octadecadienol	2-metil-3,13-octadecadienol				X	AN (Kolayli <i>et al.</i> , 2009)
Octadeceno Aldehído	9-Octadecen Aldehído		X		X	AN (Vandenhoff <i>et al.</i> , 1975)

Símbolos: AN= antimicrobiano, AF= antifúngico, AC= anticancerígeno.

Tabla 10. 2 Compuestos identificados mediante GC-MS del aceite comercial (CNM) y extractos de semillas (ENM) y hojas (HNM) con propiedades promotoras del crecimiento.

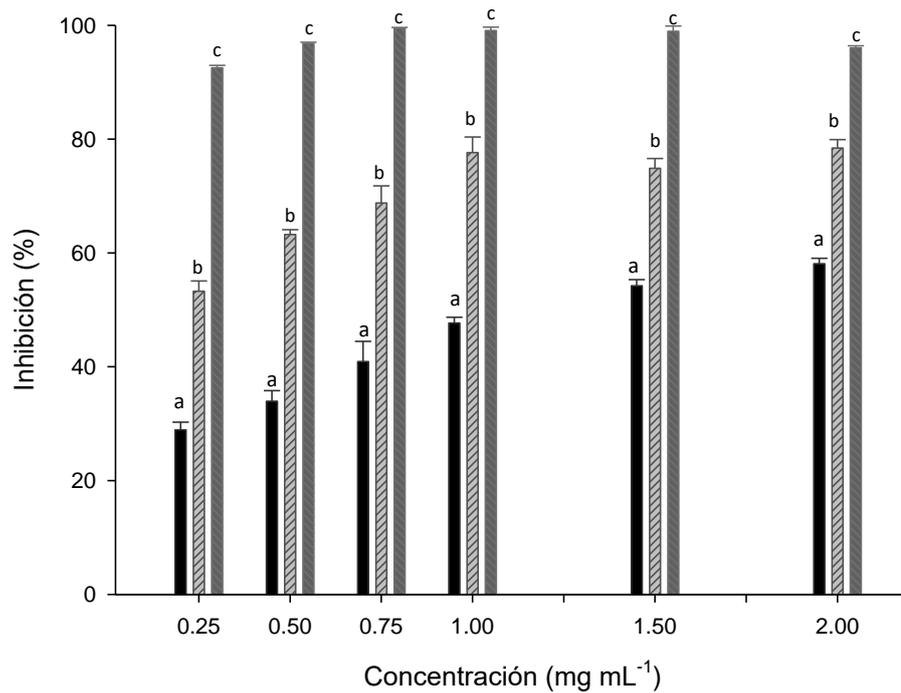
Nombre común	Nombre de IUPAC	Estructura	CNM	ENM	HNM	Referencias
Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico		X			(Kaneda, 1991)
Ácido octadecatrienoico	9,12,15 ácido octadecatrienoico			X		(Agilent, 2016)
Ácido oleico	Ácido cis-9-octadecenoico		X		X	(Williams <i>et al.</i> , 1947)
Octadecanoato de metilo	Ácido octadecanoico			X	X	(Kaneda, 1991)
Oleamida	(Z)-Octa-9-decenamida			X	X	(Williams <i>et al.</i> , 1947)
Octadecenoato de metilo	9-octadecenoato		X	X	X	(Agilent, 2016)
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico		X	X	X	(Kaneda, 1991)
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico		X	X	X	(Kaneda, 1991)

#### 10.1.1.4 Capacidad antimicrobiana y Microscopía electrónica de barrido

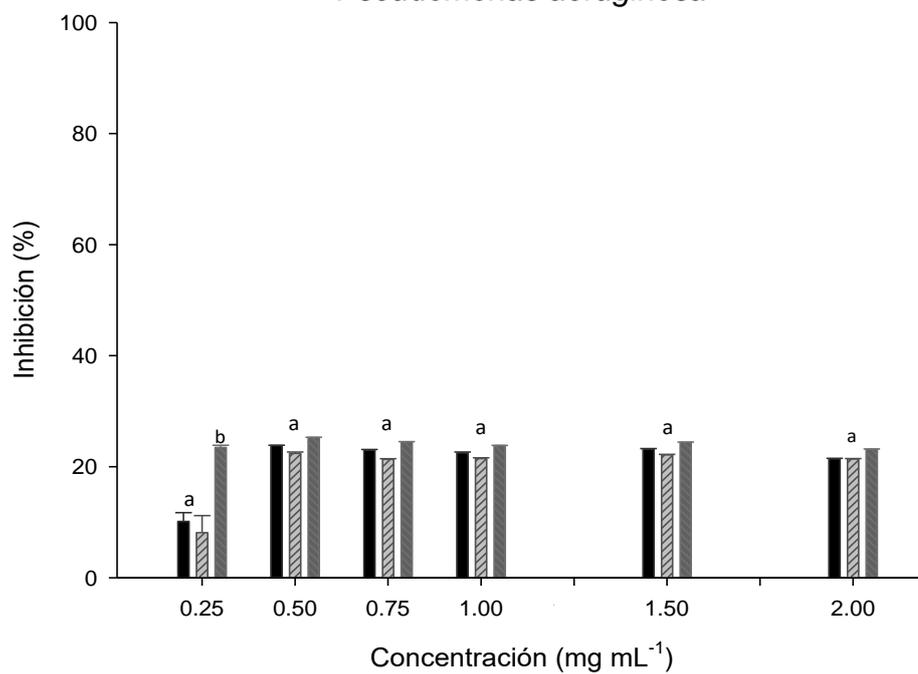
Se determinó la inhibición de bacterias patógenas al ser humano, de los tres tipos de NM, observándose que CNM y ENM lograron el menor porcentaje de inhibición; este

fenómeno lo podemos atribuir a los promotores de crecimiento proporcionados por GC-MS, que pudieron haber estimulado la proliferación. HNM logró un efecto inhibitorio sobre dos de las bacterias (*Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*), fenómeno ya reportado por Raja *et al.* (2013), quienes demostraron que extractos de hoja de NM exhibieron la mayor actividad antimicrobiana comparada con los de corteza y la semilla. En la Figura 10.1, se puede observar que la menor concentración analizada ( $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ) logró inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* en un  $96.0 \pm 0.3\%$  y de  $74.6 \pm 0.1\%$  en el caso *Listeria monocytogenes*, estos resultados coinciden con los de Maguna *et al.* (2006), quienes determinaron que las bacterias gram-negativas son más sensibles a la presencia de terpenoides presentes en aceites esenciales en comparación con bacterias gram-positivas. Sin embargo, esto no sucedió con *Pseudomonas aeruginosa* lo que se puede interpretar a la cepa que resultó ser la más resistente a la presencia del NM. Trabajos previos han reportado que concentraciones desde  $8 \text{ mg mL}^{-1}$  (Okemo *et al.*, 2001) hasta  $6.25 \text{ mg mL}^{-1}$  (Mohammed & Omer, 2015), son capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; mientras que  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  es capaz de inhibir a *Listeria monocytogenes* (Yehia, 2016); todas estas concentraciones son mayores a las probadas en este trabajo. Posiblemente esta diferencia se deba al método de análisis empleado por estos autores, difusión en agar, mientras que el análisis por fluorescencia es más sensible y permite cuantificar las bacterias viables y no viables, por lo que los cálculos resultan más precisos.

*Escherichia coli*



*Pseudomonas aeruginosa*



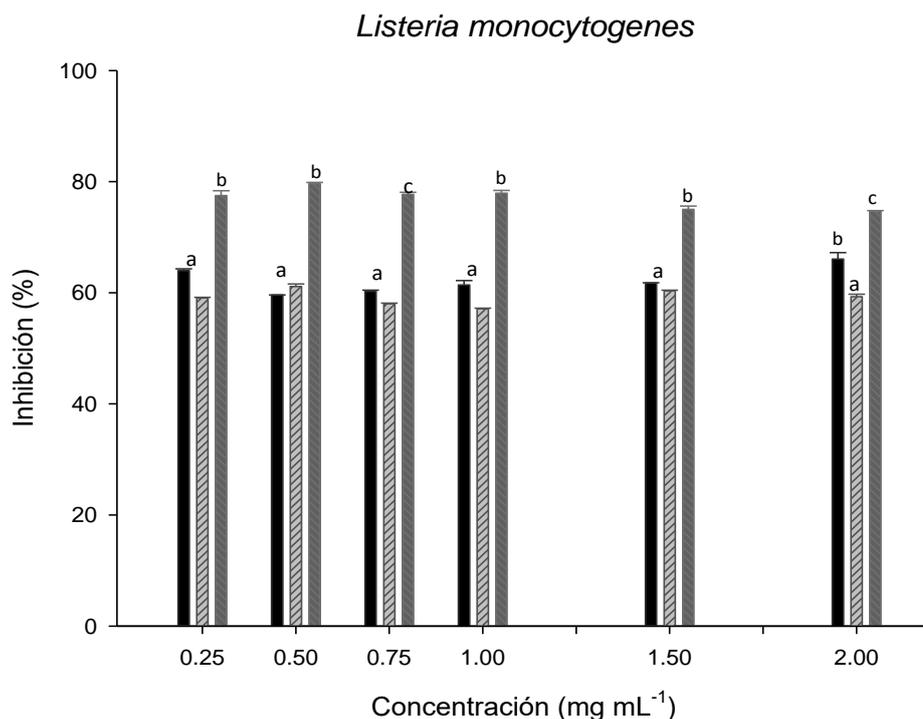
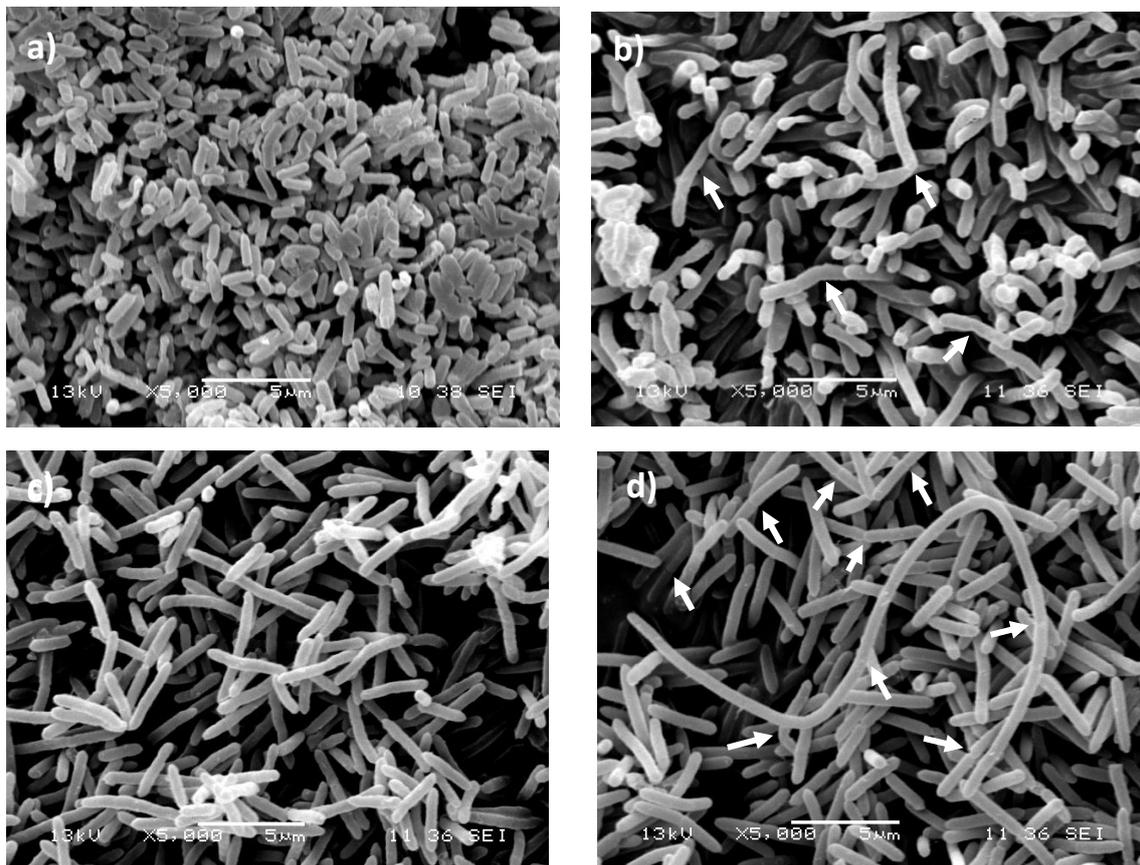


Figura 10. 1 Capacidad antimicrobiana, expresada en porcentaje de inhibición empleando diferentes concentraciones de CNM (■), ENM (▨), HNM (■) sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Listeria monocytogenes*. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

No se sabe exactamente cómo el HNM puede inhibir el crecimiento bacteriano, pero, de acuerdo con las micrográficas tomadas en el microscopio electrónico se observan cambios morfológicos que sufrieron las bacterias (Figura 10.2). Los microorganismos presentaron la formación del tabique transversal pero el proceso división celular no se llevó a cabo cuando las bacterias fueron expuestas a HNM (0.25 mg mL<sup>-1</sup>). De manera general, este proceso está regulado por una serie de proteínas entre ellas la FtsZ, cuyo papel es central dado que es la encargada de formar el anillo citocinético en la mitad de la célula y reclutar la maquinaria de división para orquestar la división celular (Hurley *et al.*, 2016). Reportes previos han propuesto el efecto antimicrobiano que algunos terpenoides que exhiben sobre varias especies. Anderson *et al.* (2012) observaron que el totarol inhibe la actividad de la GTPasa y la polimerización de los protofilamentos FtsZ provocando que las células

tratadas con este compuesto vuelven filamentosas y muestran el anillo-Z mal ubicado. Šarac *et al.* (2014) encontraron que Germacrene-D y germacrene D-4-ol aislados del aceite esencial de pino, sugieren un sitio de unión entre los compuestos y FtsZ, sin embargo, la evidencia cristalográfica de esta interacción aún no está determinada. Con base en estos antecedentes y los resultados obtenidos, es probable que la azadiractina afecte la función de la proteína FtsZ, inhiba la citocinesis y, en consecuencia, la proliferación bacteriana. La proteína FtsZ es un blanco importante para inhibir el crecimiento bacteriano y el efecto que el HNM tiene sobre esa molécula podría ser una alternativa adicional a la de los antibióticos en el campo de la medicina.



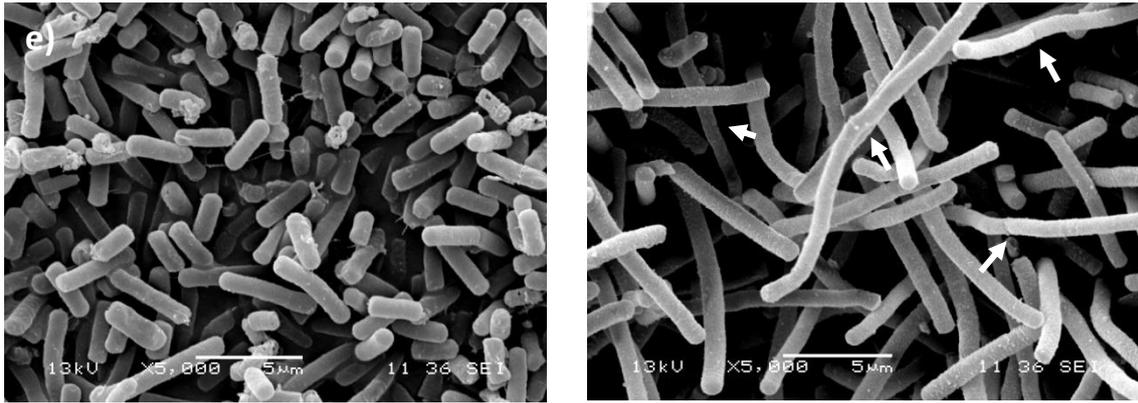
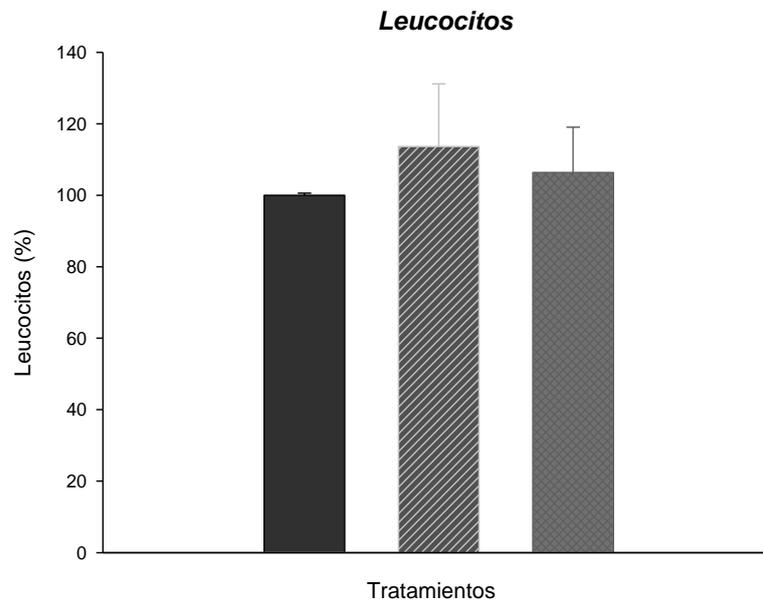
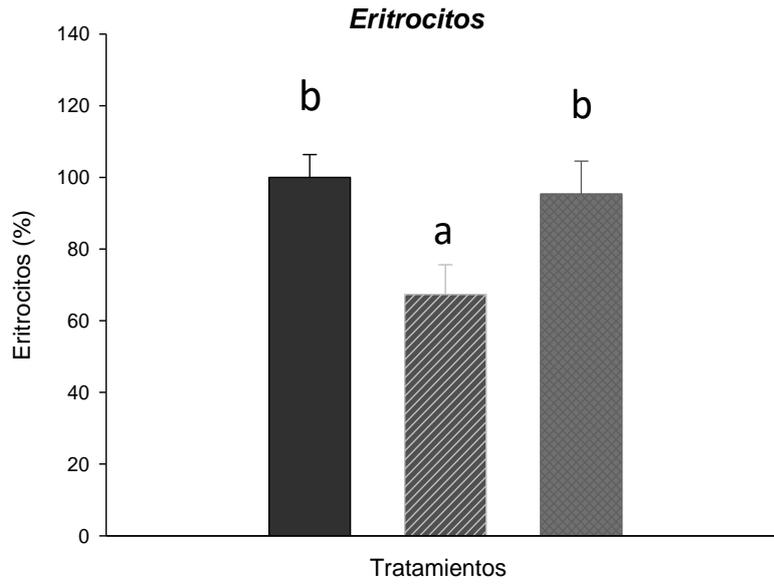


Figura 10. 2 Micrografías de *Escherichia coli*: control (a) y expuestas con NHM (b); *Pseudomonas aeruginosa*: control (c) y expuestas con NHM (d); *Listeria monocytogenes*: control (e) y expuestas con NH (f). Las flechas indican la formación del tabique transversal.

#### 10.1.1.5 Citotoxicidad

##### 10.1.1.5.1 Recuento celular

Los estudios *in vitro* que varios autores han realizado para evaluar la citotoxicidad del HNM han sido sobre líneas celulares, pero en este trabajo el modelo de estudio fue el de cultivo primario de sangre periférica humana y se empleó la mínima concentración con efecto antibacteriano ( $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Se contabilizó cada tipo celular presente en la sangre periférica al inicio del cultivo. Es bien sabido, que el empleo de etanol puede causar daños a las células y dado que este se usó como disolvente de HNM, se analizó también su efecto. Al concluir el experimento, la cantidad de leucocitos en los cultivos tratados con el etanol, control y HNM fue similar sin registrar diferencia significativa entre ellos. Este resultado coincide con el reportado por Cohen *et al.* (1996) e Ilio *et al.* (2005), quienes mencionan que concentraciones hasta el 2% de etanol no altera las membranas celulares de los glóbulos blancos. En cambio, en el recuento de eritrocitos y plaquetas sí hubo diferencia significativa, pues disminuyeron los eritrocitos y aumentaron las plaquetas en presencia de etanol, pero también se pudo observar que este efecto prácticamente desapareció por la presencia de HNM que no muestra diferencia significativa con el control (Figura 10.3).



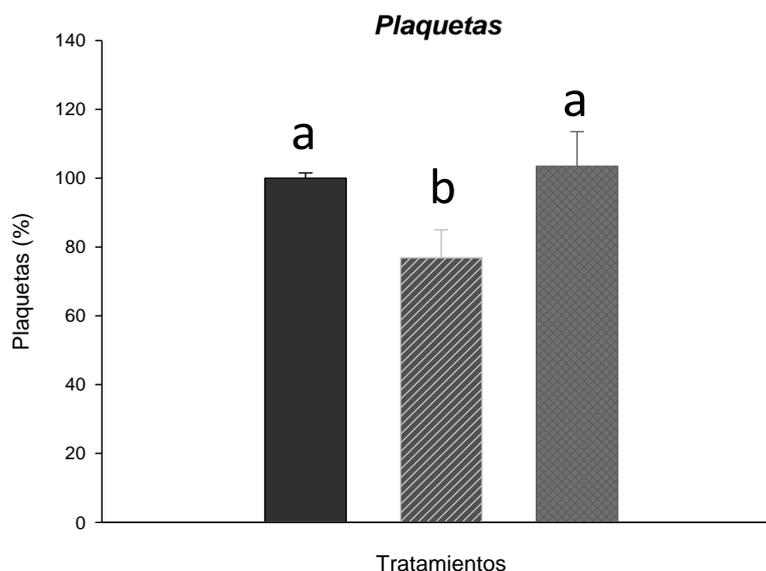


Figura 10. 3 Recuento celular de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, control (■), etanol (▨) y expuestas a HNM (▩). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

#### 10.1.1.5.2 Ensayos MTT y RN

La viabilidad celular es un parámetro importante para la administración de compuestos antimicrobianos como el HNM (Figura 10.4). Se determinó un incremento en la actividad mitocondrial de los linfocitos expuestos al etanol efecto se vio reducido por la presencia de HNM lote que no tuvo diferencia significativa con el control. El resultado obtenido concuerda con el de Sharma *et al.* (2014), quienes reportaron que los extractos de hoja de NM en concentraciones de 0.01-0.50 g mL<sup>-1</sup>, no tienen efecto sobre la función mitocondrial de linfocitos de humanos de donadores sanos no fumadores. Se puede concluir que el HNM no tiene efecto citotóxico en la concentración de inhibición.

Con el fin de contar con otro marcador de citotoxicidad, se realizó el ensayo de incorporación de RN por los lisosomas. En la Figura 10.4, se observó que hubo diferencia significativa entre los tratamientos, siendo el HNM que mostró un incremento significativo en la actividad comparado con el etanol y control; debido a que el conteo de linfocitos se mantuvo sin alteraciones con respecto al control, posiblemente este

incremento sea debido a que el ingreso de una sustancia o molécula ajena a la célula activa a los lisosomas cuya función, entre otras, es degradar esos compuestos.

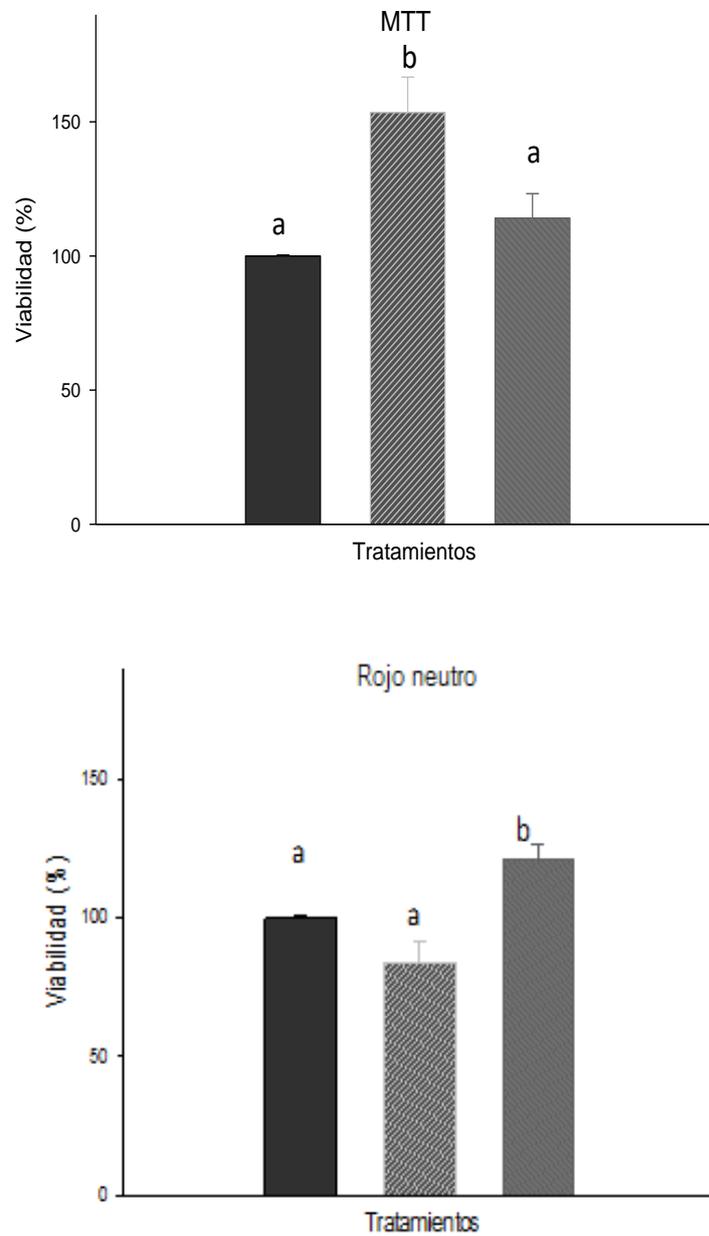


Figura 10. 4 Citotoxicidad sobre linfocitos humanos: control (■), etanol (▨) y HNM (■). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

## 10.2 Caracterización de CT

La fermentación es el proceso por el cual las proteasas de los microorganismos provocan la hidrólisis de las proteínas (desproteínización) mientras que la producción de ácido láctico de los microorganismos contribuye a la desmineralización por remoción del  $\text{CaCO}_3$ . Por esta razón la purificación de la CT usada fue con ácidos y bases en bajas concentraciones. La caracterización que se obtuvo fue  $0.34 \pm 0.04\%$  DM,  $1.01 \pm 0.3\%$  DP,  $0.16 \pm 0.02\%$  de grasa y  $91.1 \pm 1.21\%$  DA.

### 10.2.1 Caracterización de CS

El CS empleado que se obtuvo por desacetilación termoquímica de CT tuvo un peso molecular medio ( $M_v = 285.55 \pm 0.19$  kDa) y DA de  $9.91 \pm 0.21\%$ . Estos parámetros podrían definir las potenciales aplicaciones de CS, pues existen reportes acerca de que altos pesos moleculares pueden mejorar la adhesión y retención de humedad, mientras que un bajo DA, tiene mayor capacidad antimicrobiana debido al mecanismo de acción más aceptado, que propone la interacción iónica de grupos de amino cargados positivamente con los fosfolípidos negativos de la membrana celular. Aunque la actividad antimicrobiana aumenta con el CS de bajo peso molecular, un alto peso molecular es eficaz contra la germinación de esporas (Verlee *et al.*, 2017).

Por esta razón, se evaluó la actividad antimicrobiana de CS (Figura 10.5) sobre las mismas bacterias patógenas al ser humano que se evaluaron con el NM, observando que el CS tiene efecto sobre el crecimiento bacteriano, ya que a partir del  $3 \text{ g L}^{-1}$  inhibe más del 90% de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*. Ninguna de las CS logró inhibir más del 32% del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Hernández-Valencia (2014), evaluaron diferentes concentraciones de CS como recubrimiento de pitaya, encontraron que la concentración de  $2.5 \text{ g L}^{-1}$  no fungía como barrera protectora que evitara la pérdida fisiológica de peso, mientras que  $5 \text{ g L}^{-1}$  resultó ser la concentración óptima para este uso.

En virtud de que el CS empleado en este trabajo en esta concentración (5 g L<sup>-1</sup>) inhibió en 91 y 97% el crecimiento de *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* respectivamente, en los bioensayos que se realizaron posteriormente se trabajó con esta concentración.

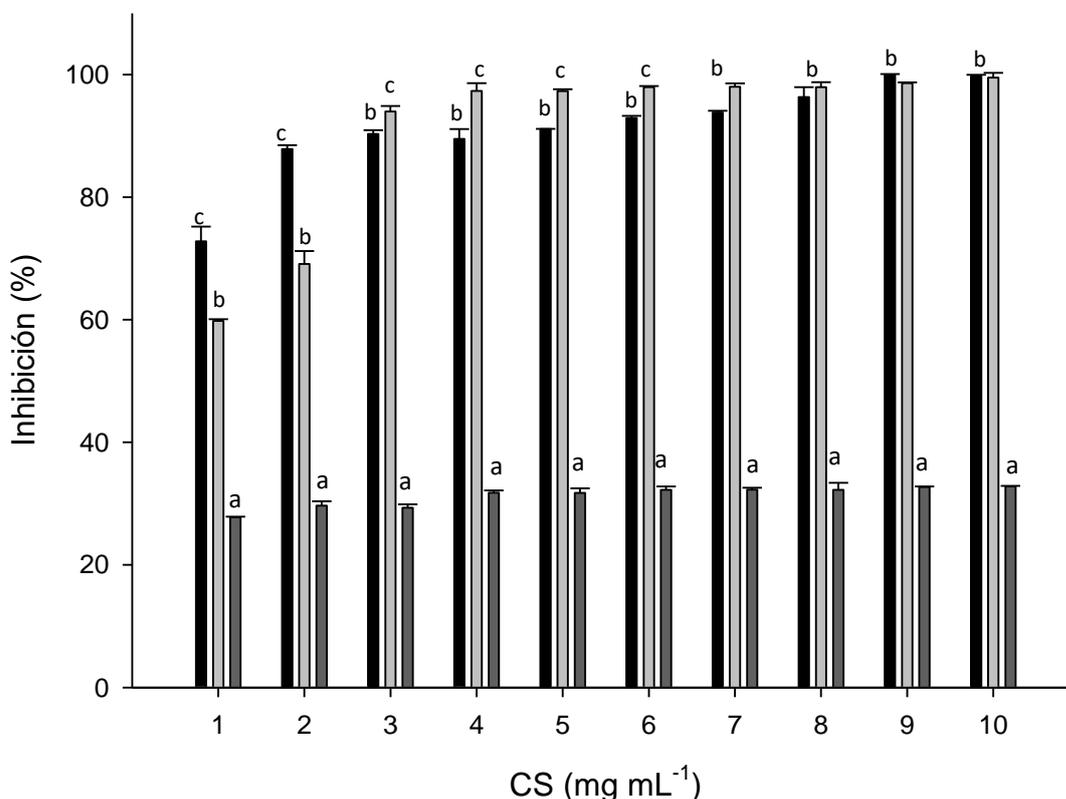


Figura 10. 5 Capacidad antimicrobiana, expresada en porcentaje de inhibición empleando diferentes concentración de CS sobre el crecimiento de *Escherichia coli* (■), *Listeria monocytogenes* (□) y *Pseudomonas aeruginosa* (▒). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

## 10.2 ETAPA II. FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE EMULSIONES O/W

### 10.2.1 Caracterización de matriz de encapsulamiento NCH

La producción de CH se realizó empleando como agente de entrecruzamiento al ácido cítrico, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> como catalizador, además se incorporó polietilenglicol y D-sorbitol como plastificantes. El esquema de reacción se muestra en la Figura 10.6, este proceso se

lleva a cabo en de dos pasos: la formación de un anhídrido cíclico a partir del ácido tiene lugar en el primer paso, entonces el entrecruzante puede reaccionar vía apertura del anillo con los grupos alcohol de los polisacáridos que forman el grupo de unión al éster resultante (Yang, 1993; Alonso *et al.*, 2009). Yang (1993), reportó que el pH de la solución que contiene los ácidos policarboxílicos debe mantenerse en un rango de 1.5 a 4.5 de pH para llevar a cabo la reacción; en este trabajo la reacción se efectuó con  $\text{pH } 2.60 \pm 0.18$ . Los análisis de  $^1\text{H-RMN}$  mostraron un  $74.12 \pm 5.41\%$  de HPMC incorporado al CS (Anexo A1).

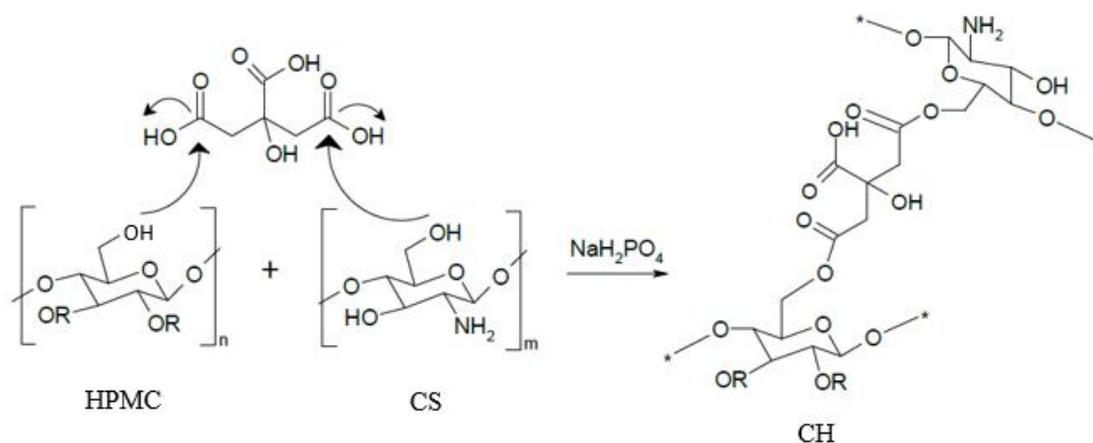


Figura 10. 6 Esquema de reacción del entrecruzamiento entre HPMC y CS, empleando ácido cítrico como agente de reticulación (Alonso *et al.*, 2009). Donde  $\text{R}=\text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ .

### 10.2.2 Caracterización de emulsiones NCH y NCGM

Para mantener la estabilidad de las emulsiones empleó tween 20, tween 80 y alcohol polivinílico para la emulsión NCH y GM para NCGM. En la Tabla 10.3 se observa que la emulsión NCH presentó un  $D_{3,2}$  significativamente mayor que la de NCGM, lo cual puede ser atribuido al efecto de la reacción de entrecruzamiento entre CS y HPMC, limitando la actividad superficial del material biopolimérico y por ende también su capacidad para adsorberse en la interfase aceite-agua y así estabilizar la emulsión. Por el contrario, puede observarse que en NCGM el diámetro  $D_{3,2}$  se vio influenciado por el

efecto de la GM y su excelente actividad superficial como agente estabilizante. Uno de los mecanismos de estabilización de las emulsiones se basa en evaluar la carga superficial de las gotas, estas cargas están en función de los grupos funcionales presentes en los biopolímeros (Anexo A2) el  $\zeta$  para NCH presentó una carga superficial positiva, debido a los grupos amino presentes en CS, mientras que en el sistema NCGM la carga superficial fue negativa debido a la presencia de los grupos carboxílicos de la GM. Finalmente, la evaluación de la estabilidad contra el cremado mostró que NCH presentó desestabilización por cremado después de 45 min; en NCGM fue de 1 año 3 meses, tomando como criterio el tiempo necesario para que el 50% del volumen de la emulsión se encuentre separada.

Tabla 10. 3 Caracterización de las emulsiones NCH y NCGM

Emulsión	D <sub>3,2</sub> ( $\mu\text{m}$ )	Span	$\zeta$ (mV)
NCH	451.22±1.03 b	0.78±0.01 a	20.26±0.91 b
NCGM	1.87±0.87 a	2.53±0.41 b	-15.3±1.11 a

Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

### 10.2.3 Evaluación de recubrimientos en conservación postcosecha de pitaya

#### 10.2.3.1 Bioensayo 1 y 2

##### I. Pérdida fisiológica de peso

La temperatura de refrigeración ( $10 \pm 2$  °C) y alta HR ( $80 \pm 5\%$ ) se eligieron como condiciones de almacenamiento para reducir la deshidratación de las frutas, debido a que son escasos los reportes del efecto de la temperatura sobre este tipo de fruta; sin embargo, Nerd *et al.* (1999) reportaron que la pitaya del género *Hylocereus undatus* y *Hylocereus polyrhizus*, son frutas de cactáceas no-climatéricas. Que conservan sus características de calidad a 14 °C por 2 semanas; en temperaturas superiores (20 °C) se preservan solo por

una semana; temperaturas inferiores (6°C) resultan ser contraproducentes debido a que se pierde la firmeza cuando la fruta alcanza la temperatura ambiente.

Otros trabajos también han reportado el efecto de la temperatura sobre la pérdida de peso de frutas de cactáceas, ya que este proceso está relacionado con el déficit de la presión de vapor entre la superficie de la fruta y la atmosfera, pues se establece un gradiente de vapor de agua que finalmente conduce a la pérdida de peso. Ali *et al.* (2013) reportaron que la PFP alcanzó 27.8% después de 28 d de almacenamiento a 10 ° C y 80% de HR en fruto de dragón (*Hylocereus polyrhizus* (Weber)), mientras que en frutos recubiertos con quitosano y dispersiones de quitosano fue de 15% a 18% respectivamente. La pitaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) y el nopal (*Opuntia ficus-indica*) son otras cactáceas que se han almacenado entre 5 y 10 °C con 70% de HR para extender su vida postcosecha con pérdidas de peso del 8% y 18.3% después de 30 y 15 d respectivamente (Nerd & Mizrah, 1999; Pinedo *et al.*, 2010). Sin embargo, pitaya (*Stenocereus spp.*) parece ser más delicada y difícil de preservar su buena calidad ya que perdió peso rápidamente (8%) después de solo 8d cuando se almacenó a 7 ° C y 85% HR (Armella *et al.*, 2003). En este trabajo las frutas de pitaya sin recubrir perdieron peso rápidamente con respecto a las que fueron recubiertas. La menor pérdida de peso se registraron con NCH, aproximadamente 4%, después de 15 días de poscosecha, como se puede ver en la Figura 10.7.

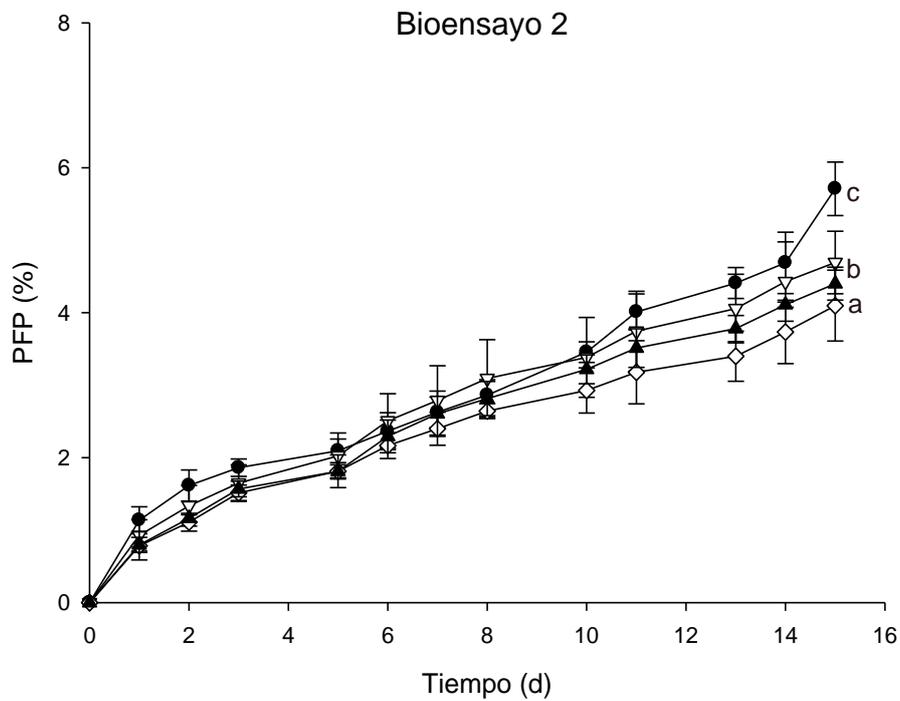
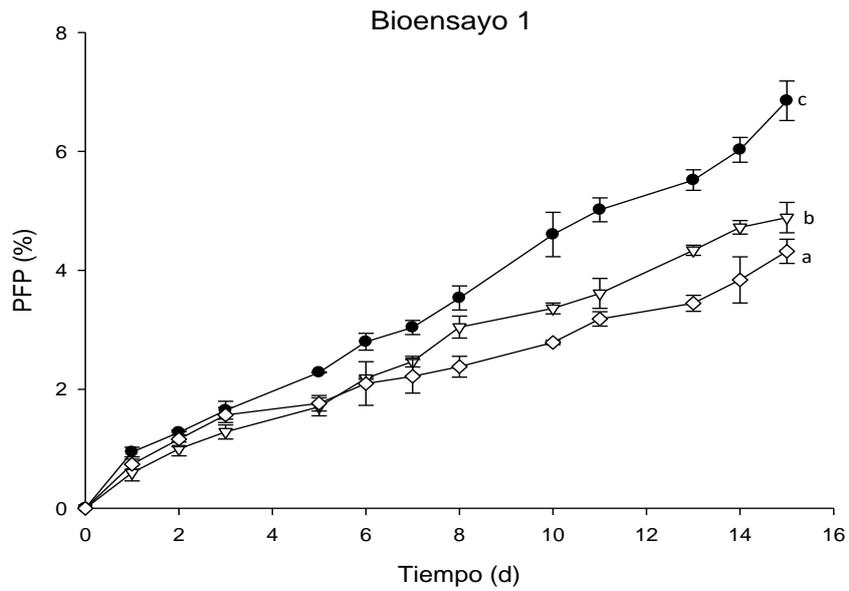


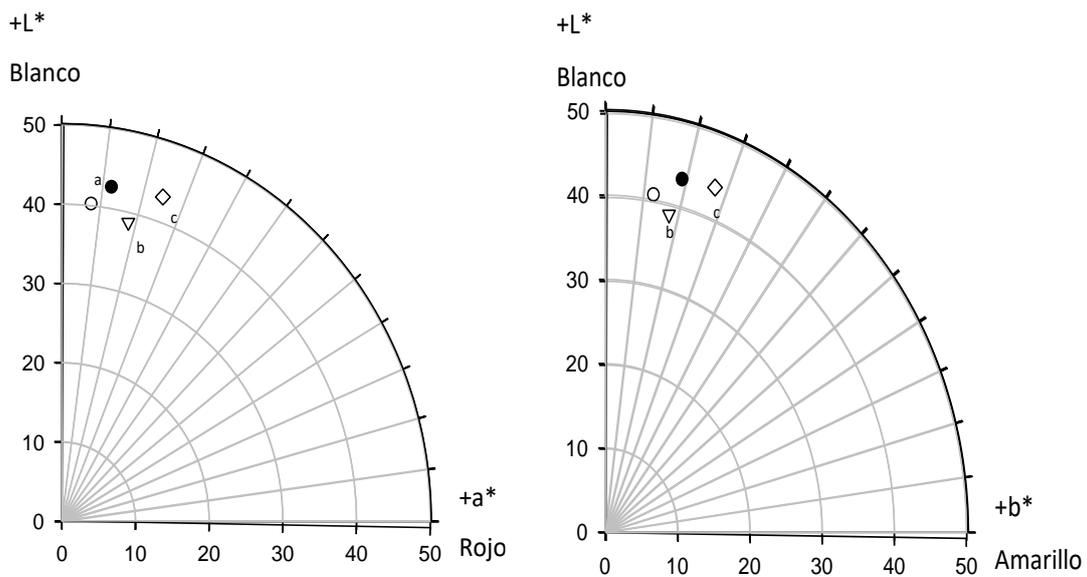
Figura 10. 7 Pérdida Fisiológica de Peso de pitaya (*Stenocereus pruinosus*). Control (●), CS (▽), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

## II. Cambio de color

El color es el principal atributo considerado por los consumidores, este afecta la apariencia y la aceptabilidad de un fruto (Moreno-Castillo *et al.*, 2005). La apariencia de

oscurecimiento en los alimentos está directamente relacionada con los valores bajos de  $L^*$ . En el bioensayo 1, NCH logró mantener la luminosidad igual que de a la del control en el tiempo cero además de haber sido el tratamiento que preservó los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ ; es decir, que al final del bioensayo tuvo mayores tonalidades rojas y amarillas; en el bioensayo 2,  $L^*$  al final del almacenamiento se conservó en los frutos recubiertos, dado que el control sufrió de oscurecimiento. Los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  las emulsiones y CS lograron mayores tonalidades rojas y amarillas (Figura 10.8).

### Bioensayo 1



## Bioensayo 2

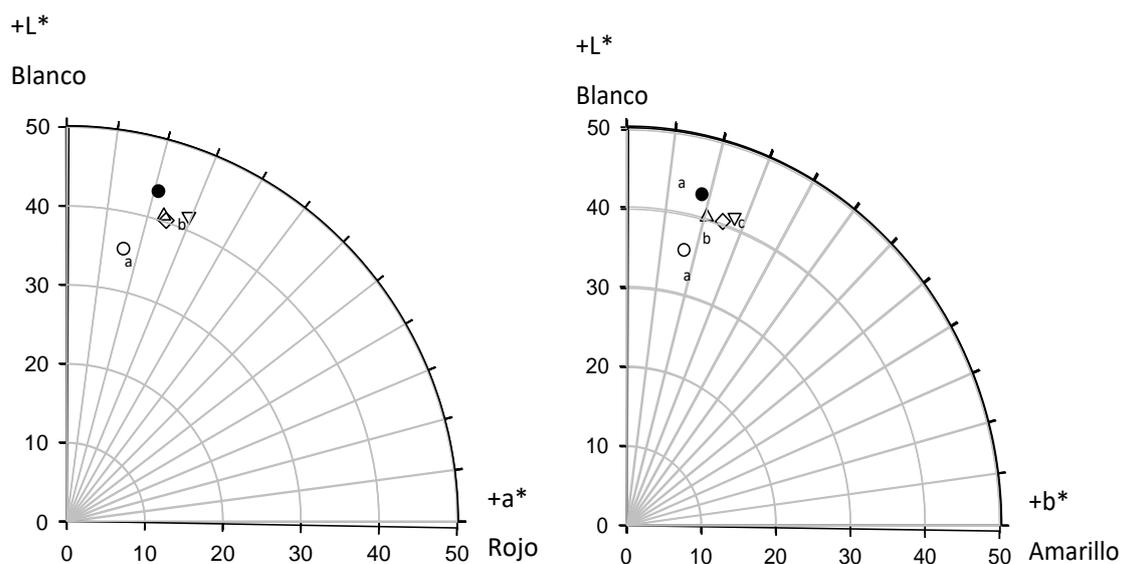


Figura 10. 8 Color en epicarpio Control (●) al 0 d, Control (○), CS (▽), NCH (◇), NCGM (△) a los 15 d. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

### II. Porcentaje de inhibición por cuenta en placa de hongos

La infección por hongos sobre el epicarpio de la fruta es el principal problema al que se enfrenta la baja vida de anaquel. En ambos bioensayos que los recubrimientos tuvieron un efecto  $<75\%$ ; y que los frutos recubiertos con NCH fueron los que tuvieron menor grado de contaminación (Figura 10.9).

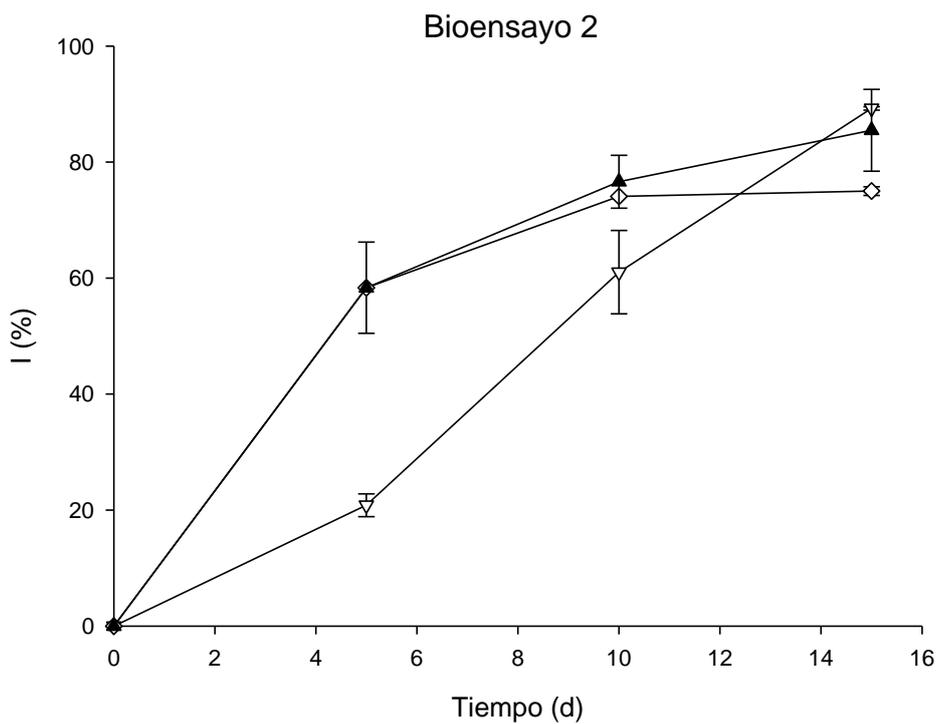
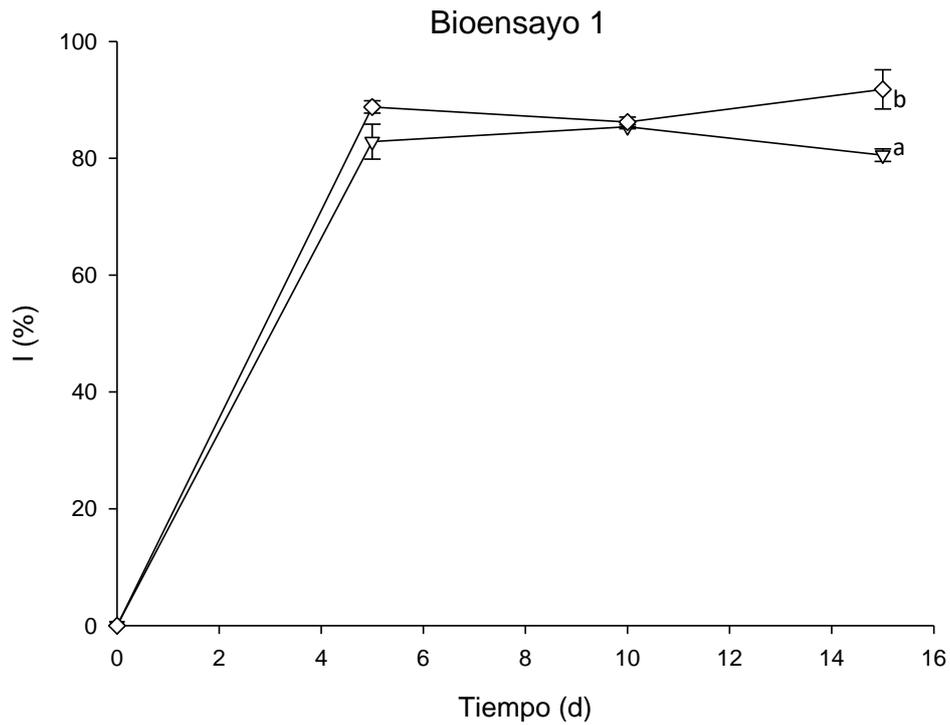


Figura 10. 9 Porcentaje de inhibición fúngica. CS (∇), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

### 10.2.3.2 Bioensayo 3

#### I. Pérdida fisiológica de peso

NCH redujo la pérdida de peso ( $4.42 \pm 0.09\%$ ) en relación con el control y otros tratamientos después de 15 días de poscosecha, como se aprecia en la Figura 10.10, y que es comprable con los bioensayos anteriores; la pérdida de agua se encuentra asociada al número de areolas presentes en la fruta y que incrementa la evaporación de agua (García-Cruz *et al.*, 2016). El recubrimiento con NCH resultó ser efectivo para evitar este proceso. Armella *et al.*, informaron que después de 14 días a la temperatura de  $7 \pm 1^\circ\text{C}$  las pitayas pierden aproximadamente el 8% de su peso, el presente trabajo los controles perdieron solo  $6.85 \pm 0.23\%$ , posiblemente por la alta humedad relativa empleada.

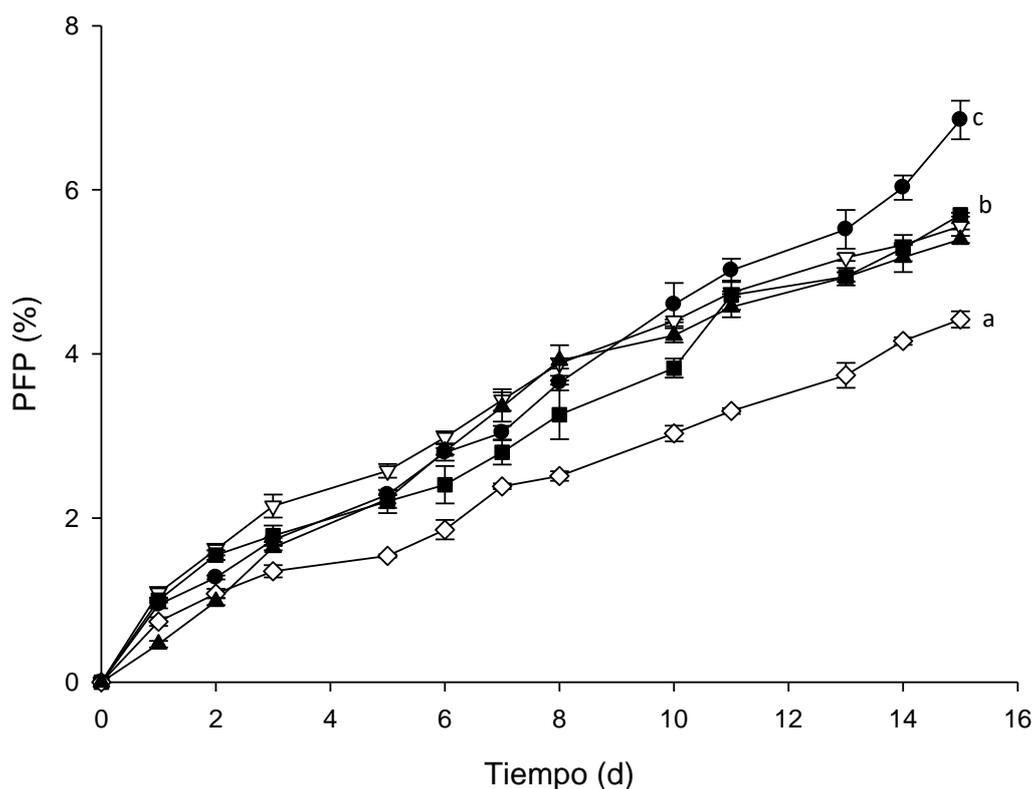
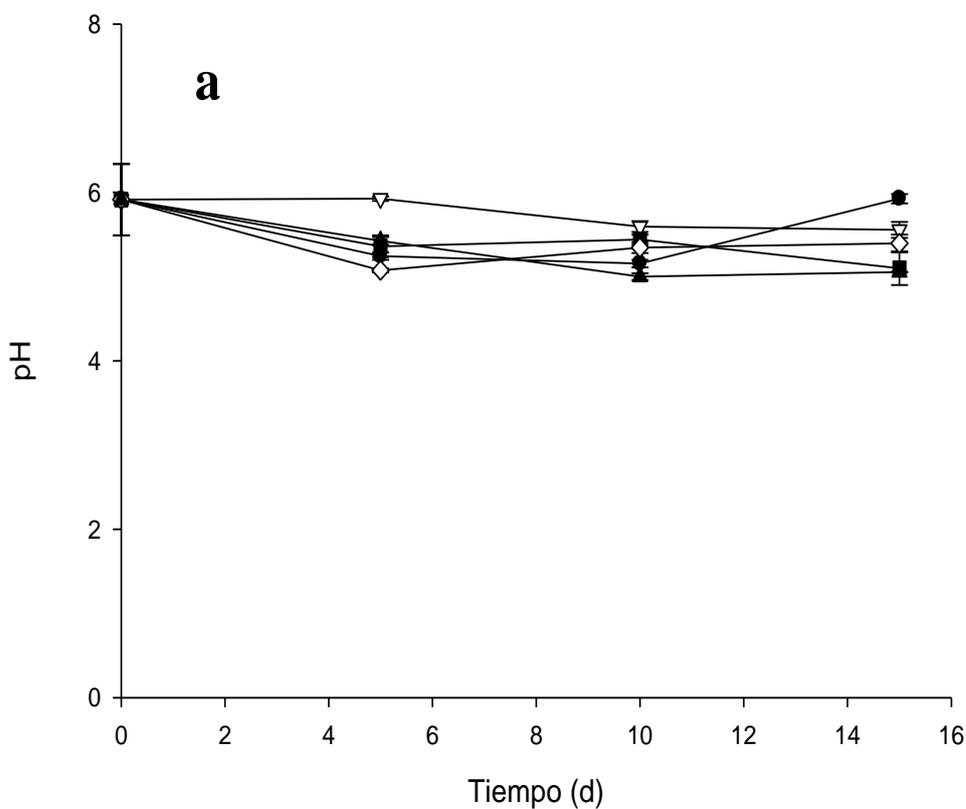
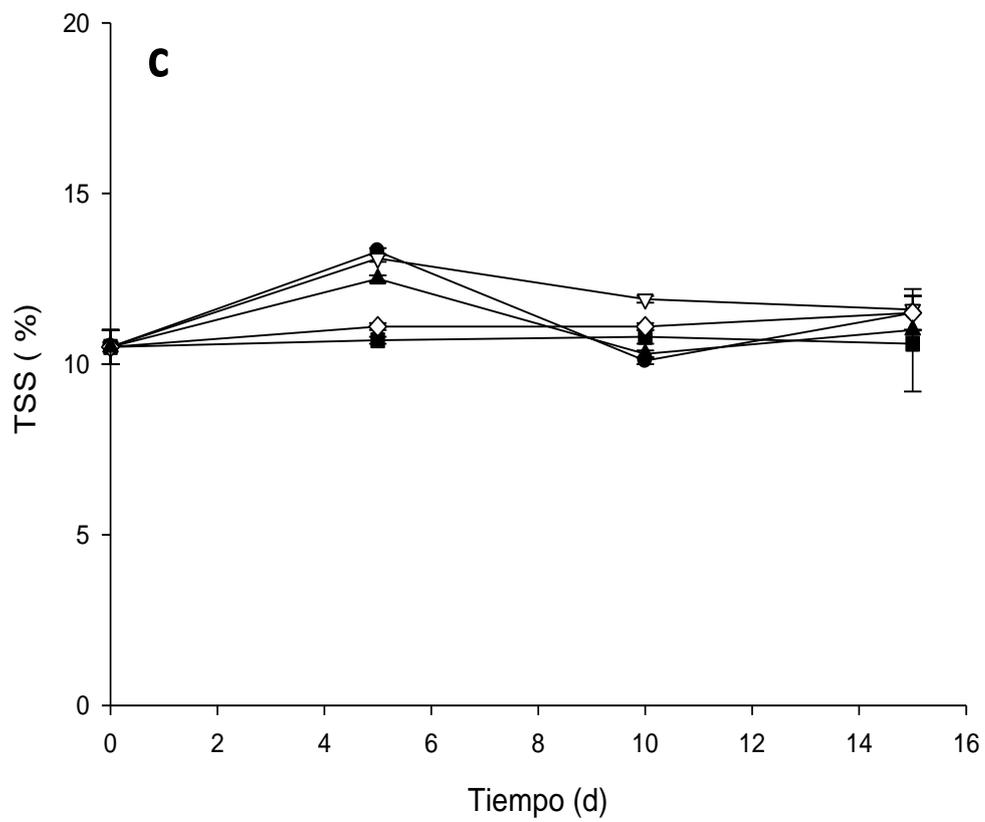
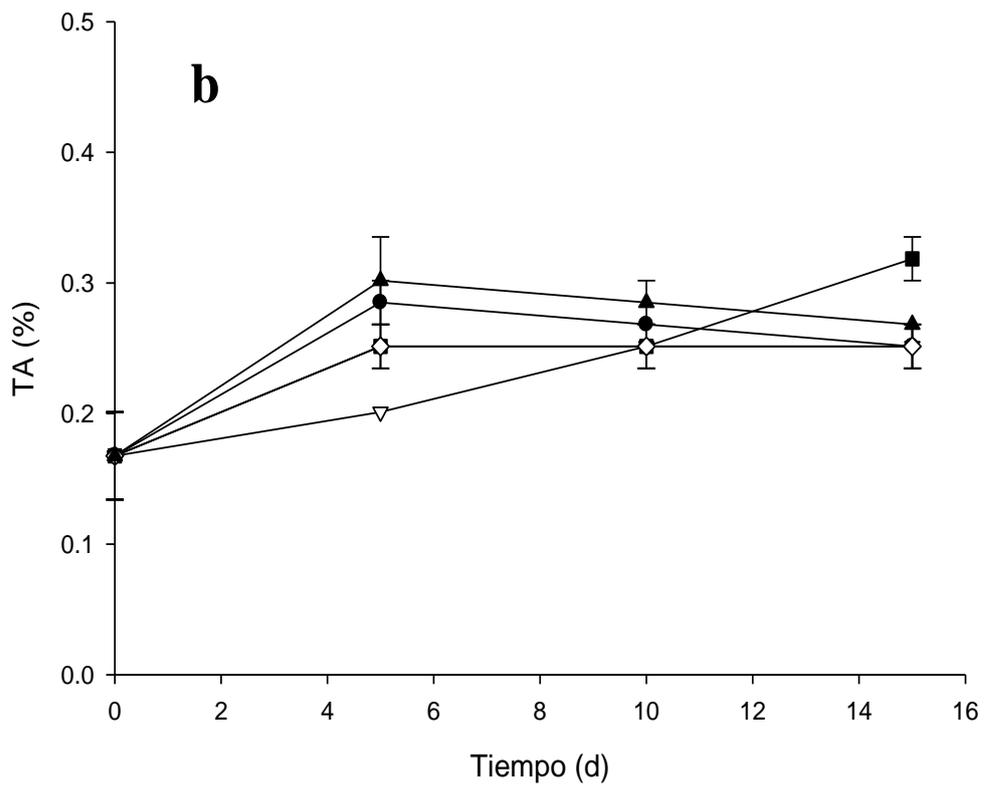


Figura 10. 10 Pérdida Fisiológica de Peso de pitaya (*Stenocereus pruinosus*). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

## II. pH, acidez total titulable y sólidos solubles totales

La acidez en las frutas es debido a la presencia de ácidos orgánicos, como el málico, ascórbico, cítrico, tartárico, láctico y oxálico. En trabajo la TA se expresó como el porcentaje de ácido málico, ya que es el principal en frutos de *Hylocereus* (Li et al., 2018) y, a lo largo del almacenamiento no se registró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en este parámetro, dado que en todos los grupos se mantuvo entre 0.16 – 0.30% (Figura 10.11b). El pH y sólidos solubles totales (TSS) también permanecieron constantes, entre 5-5.9 y 10-12.5 ° Brix respectivamente (Figura 10.11 a y c). Todas estas mediciones concuerdan con lo reportado por García-Cruz *et al.* (2016). Finalmente, el índice TSS TA<sup>-1</sup> (Figura 10.11d) que nos da indicio del dulzor o la acidez de los frutos, mostraron diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), siendo los grupos control y CS los más dulces, mientras que CH y NCGM los más ácidos.





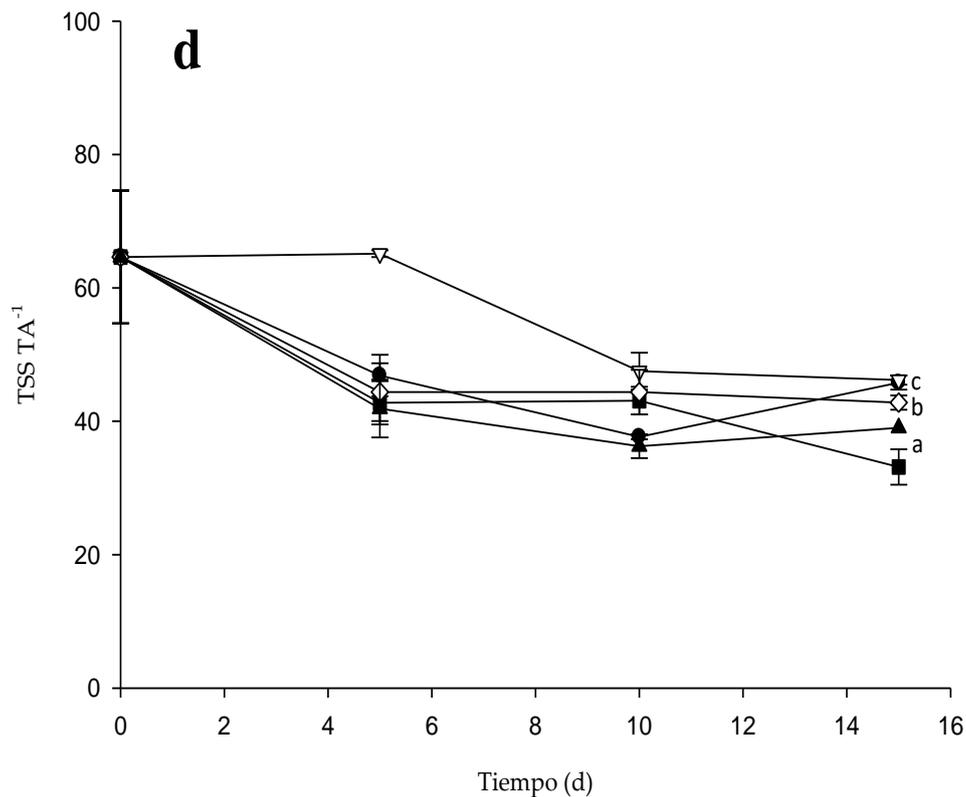


Figura 10. 11 pH (a), TA(b), TSS (C) y TSS TA<sup>-1</sup> (d) de pitaya (*Stenocereus pruinosus*). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

## VII. Determinación del ángulo de contacto

El ángulo de contacto del epicarpio de pitaya (control) indica hidrofiliidad ( $61.25 \pm 0.33$  °), por lo que al aplicar todos los recubrimientos en la fruta, mantuvieron su naturaleza hidrofílica de la fruta, sin embargo, NCH fue capaz de modificar el ángulo de contacto a ligeramente hidrofóbico ( $76.47 \pm 0.45$  °), debido a la presencia de la fase oleosa en la emulsión y la liberación de ésta puede explicar que este recubrimiento mejoró la barrera contra la humedad, restringiendo así la reducción de peso durante el almacenamiento.

El ángulo de contacto disminuyó con los tratamientos CS y NCGM,  $50.04 \pm 0.48$  y  $50.01 \pm 0.32$  °, respectivamente, por lo que tuvieron una mayor hidrofiliidad que en la fruta de control. CH, no difirió significativamente en el ángulo de contacto ( $61.79 \pm 0.53$  °) con

respecto al control; esto podría deberse a que en el entrecruzado se usó ácido cítrico que disminuye los grupos hidroxilo de CS, lo que reduce la hidrofiliidad, este fenómeno ya ha sido observado por Moller *et al.* (2004).

#### IV. Firmeza

La firmeza de la pulpa de los grupos control y recubiertos durante el almacenamiento no mostraron diferencias significativas, pero hubo pérdida de firmeza de la pulpa en todos los frutos, asociada con el proceso de senescencia por la degradación de los polisacáridos de las paredes celulares de las frutas debido a reacciones enzimáticas, como la pectina metilesterasa y la poligalacturonasa que conduce al ablandamiento de la pulpa (Paul *et al.*, 2012) (Figura 10.12).

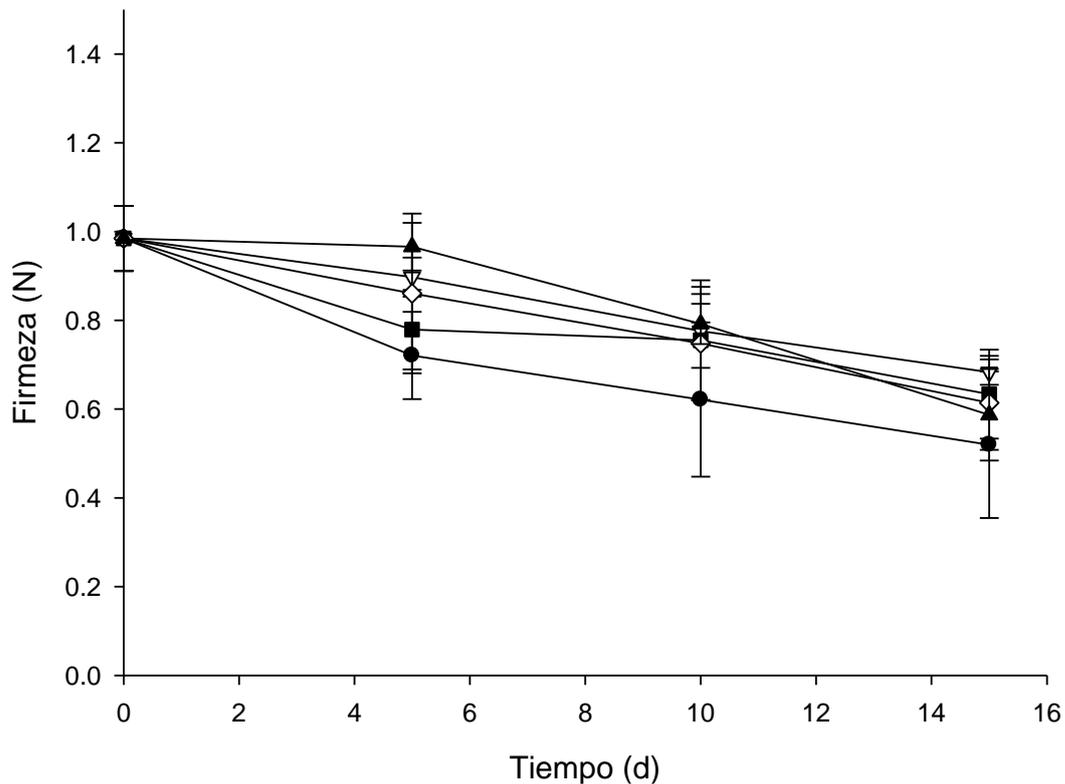


Figura 10. 12 Firmeza de pitaya (*Stenocereus pruinosus*). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲).

## V. Cambio de color

El color también tuvo diferencias significativas entre los tratamientos para  $a^*$  y  $b^*$  ( $p < 0.05$ ); el tratamiento con CS tiene mayor coloración roja y la menor fue el control. La coloración amarilla de la fruta recubierta con CS y CH muestra diferencias significativas en comparación con otros recubrimientos y el control (Figura 10.13). Según García-Cruz *et al.* (2013), los cambios en el color se deben al contenido de betalaínas en el epicarpio de *S. prinosus*. Se calcularon los índices de color y se observó que después de 15 días de almacenamiento, el índice de blanqueamiento (WI) aumentó en los frutos recubiertos, mientras que el control se redujo significativamente. En cuanto a los índices de amarillamiento (YI) y enrojecimiento (RI), también en las frutas recubiertas fueron significativamente mayores (Tabla 10.4); por esta razón podemos atribuir a la capacidad antioxidante del NM, aunado al pH de los recubrimientos el retraso de la degradación de los pigmentos.

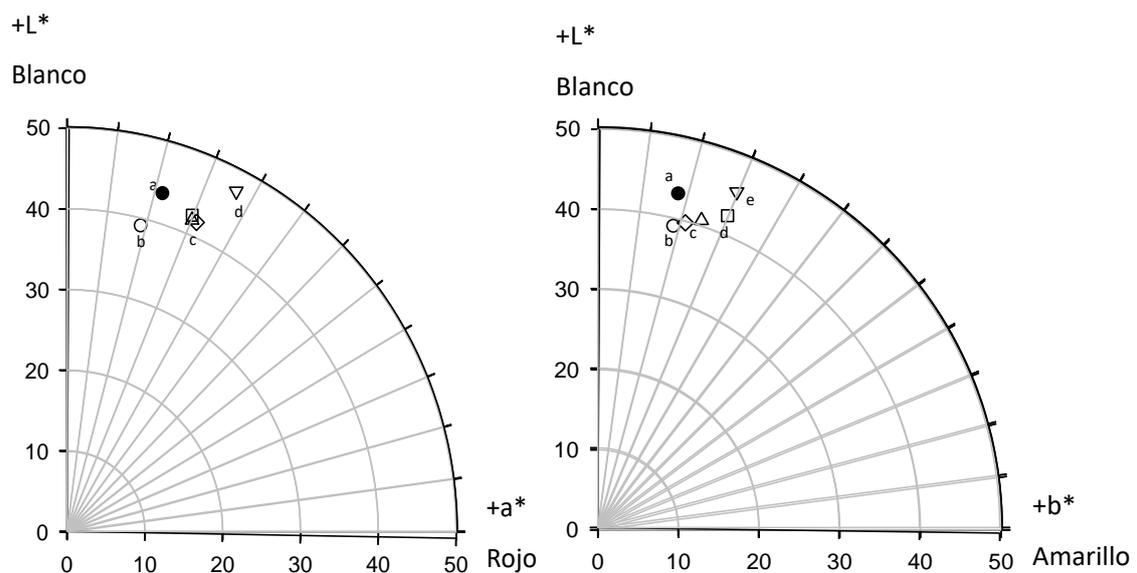


Figura 10. 13 Cambio de color en fruta Control (●) a 0 d, Control (○), CS (▽), CH (□), NCH (◇), NCGM (△) a los 15 d. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

Tabla 10. 4 Índices de color al inicio y final del almacenamiento

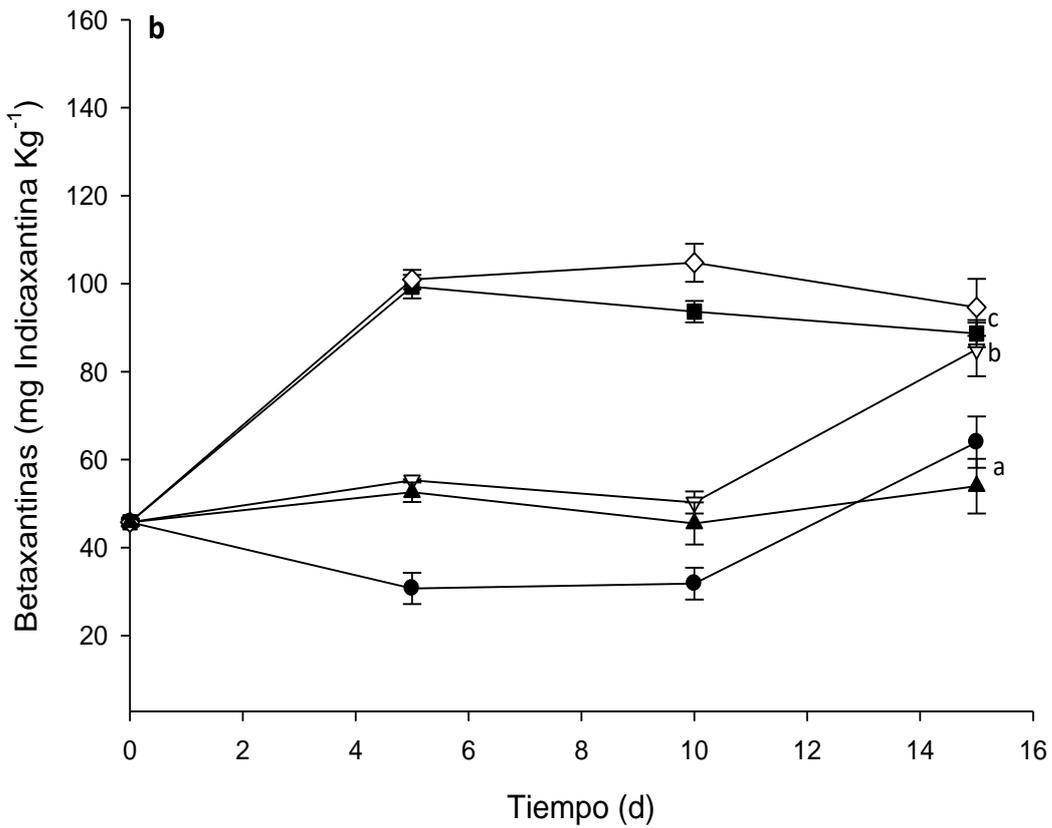
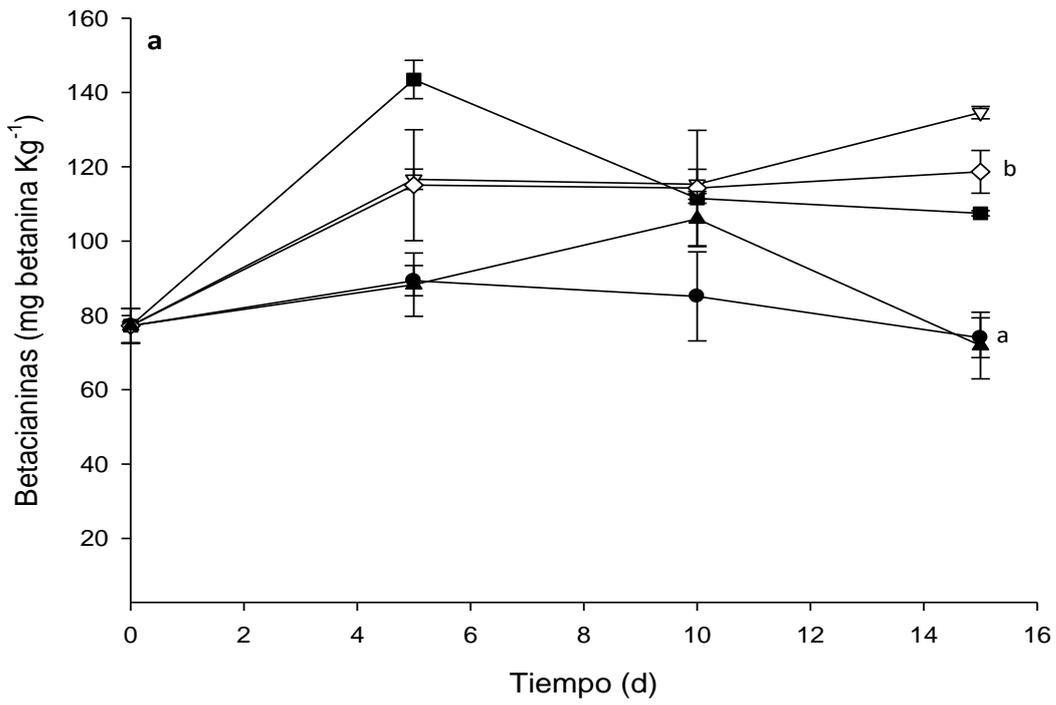
Tratamientos	Índices de Color			
	Tiempo (d)	WI	RI	YI
Control	0	60.53 ± 0.63 a	1.35 ± 0.11 c	33.83 ± 2.05 a
	15	60.34 ± 0.65 a	0.56 ± 0.05 a	41.09 ± 1.98 b
CS	15	66.57 ± 0.63 c	1.57 ± 0.08 d	42.82 ± 1.87 b
CH	15	66.88 ± 0.52 c	1.55 ± 0.06 d	46.95 ± 1.45 c
NCH	15	65.80 ± 0.37 c	1.54 ± 0.10 d	46.38 ± 1.84 c
NCGM	15	64.19 ± 0.48 b	1.25 ± 0.12 b	48.95 ± 2.05 c

Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Fisher's LSD.

#### VI. Determinación de betalaínas totales, compuestos fenólicos y ácido ascórbico.

Se determinó la concentración de betacianinas (Figura 10.14 a), betaxantinas (Figura 10.14 b) y la suma de estas expresada como betalaínas totales (Figura 10.14 c) en la pulpa de la fruta control y recubierta, observando diferencia significativa ( $p < 0.5$ ) a lo largo del almacenamiento; las pulpas de los frutos recubiertos con NCH y CS contuvieron mayor cantidad de estos compuestos por lo que se puede afirmar que además de mantener el color del epicarpio también conservan el de la pulpa. Existen escasos reportes sobre estos compuestos en esta clase de cactáceas, pero García-Cruz *et al.* (2016) reportaron que *Stenocereus pruinusus* almacenadas durante 6 d a 24 °C no sufren cambios en la concentración de betalaínas totales ( $559.9 \pm 65.1 \text{ mg Kg}^{-1}$ ); este valor es mayor al obtenido en este trabajo en el grupo control lo que puede atribuirse a los factores ambientales de crecimiento de la fruta. En otros frutos de cactáceas como *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw, Betancourt *et al.* (2017), han reportado máximas de concentraciones de betacianinas: 166.3 mg betanina  $\text{Kg}^{-1}$  y de betaxantinas 75.5 mg indicazantina  $\text{Kg}^{-1}$  de fruta fresca, por lo que el contenido total es de 241.8 mg betalaínas totales  $\text{Kg}^{-1}$ , los valores obtenidos para *Stenocereus pruinusus* son mayores, por lo que se confirma el carácter benéfico para la salud humana como se mencionó anteriormente. Además de

estos compuestos se destacan otros antioxidantes como compuestos fenólicos y ácido ascórbico (AsA), que también resultan cruciales en la nutrición humana (Li *et al.*, 2018). Los compuestos fenólicos totales solubles en frutos control y recubiertos no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.5$ ) durante el almacenamiento (Figura 10.15 a) encontrándose en concentración  $497.10 \pm 96.79$  mg EAG Kg<sup>-1</sup>, resultado comparable con el de García-Cruz *et al.* (2016), quienes después de 6 d de almacenamiento a 24 °C reportaron  $535.9 \pm 69.8$  mg EAG Kg<sup>-1</sup>; otras cactáceas de género *Hylocereus* tienen una concentración mayor, de 690 a 780 mg EAG Kg<sup>-1</sup> (Li *et al.*, 2018); aunque estas variaciones podrían atribuirse a que en este método colorimétrico, la presencia de compuestos como azúcares y el ácido ascórbico pueden reducir el reactivo Folin-Ciocalteu (Georgé *et al.*, 2005). La determinación de la concentración de AsA es importante dado que se puede degradar por el estrés oxidativo ocasionado por heridas en el epicarpio (Toivonen & DeEll, 2002), por ello la correcta selección de los frutos fue necesaria. En nuestro estudio, no hubo diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre la concentración del AsA a lo largo del almacenamiento entre los frutos control y los recubiertos (Figura 10.15 b), este comportamiento fue observado por Li *et al.* (2018) en frutos de *Hylocereus andatus* durante 2 d de almacenamiento, cuya concentración de AsA fue de  $0.140 \pm 0.002$  g Kg<sup>-1</sup>. Por otro lado, y a pesar de que no se tiene estudios relacionados con *Stenocereus pruinusus*, Beltrán-Orozco *et al.* (2009) reportan que pitaya del género *Stenocereus stellatus* tienen en promedio una concentración de  $0.10 \pm 0.02$  g Kg<sup>-1</sup> que es comparable con la obtenida en este estudio ( $0.10-0.17$  g Kg<sup>-1</sup>). De acuerdo con Muñoz *et al.* (2002), un adulto tiene como ingesta recomendada de AsA de 60 mg d<sup>-1</sup>, por lo que consumir 100 g de *S. pruinusus* representaría entre el 16-28% de este consumo y de aquí otra de sus propiedades más importantes para la preservación de esta fruta.



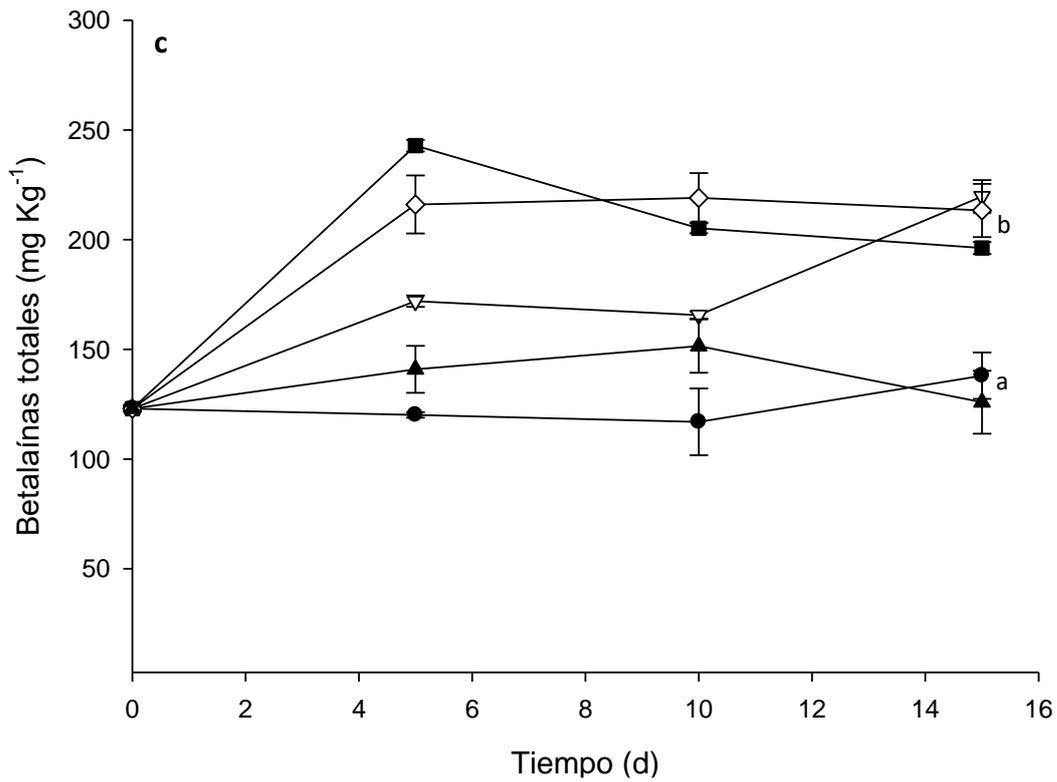
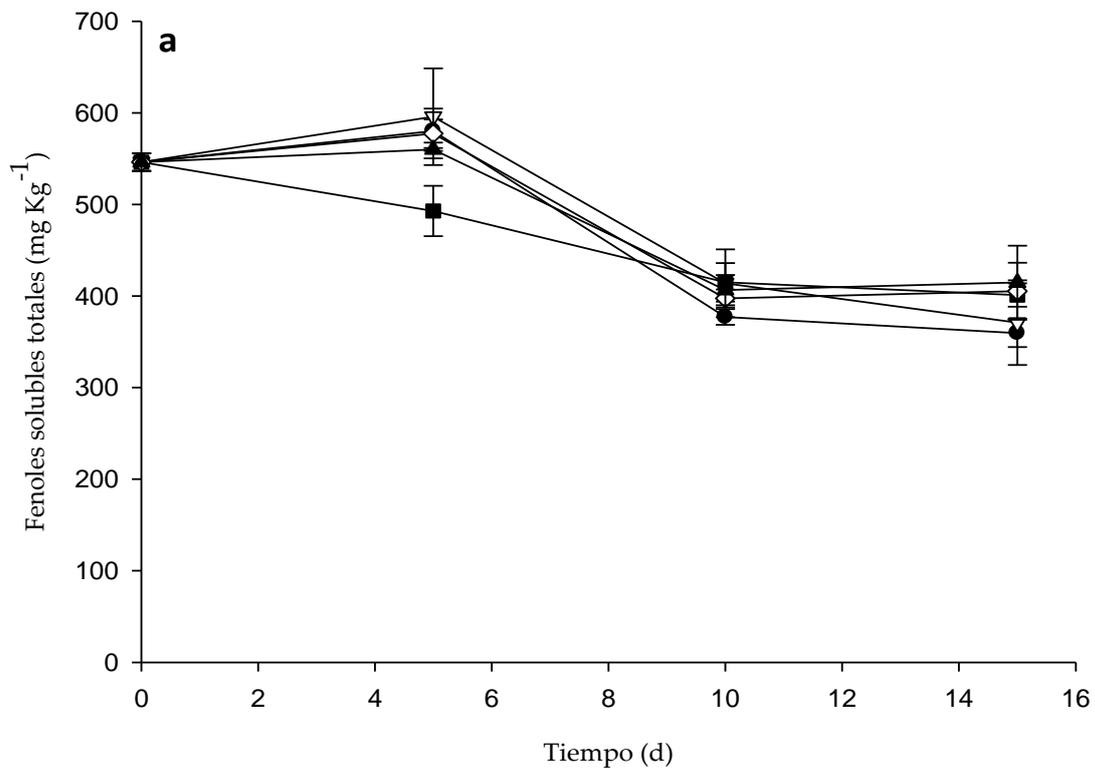


Figura 10. 14 Contenido de betacianinas (a), betaxantinas (b) y betalaínas totales (c) en pitaya (*Stenocereus pruinosus*). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.



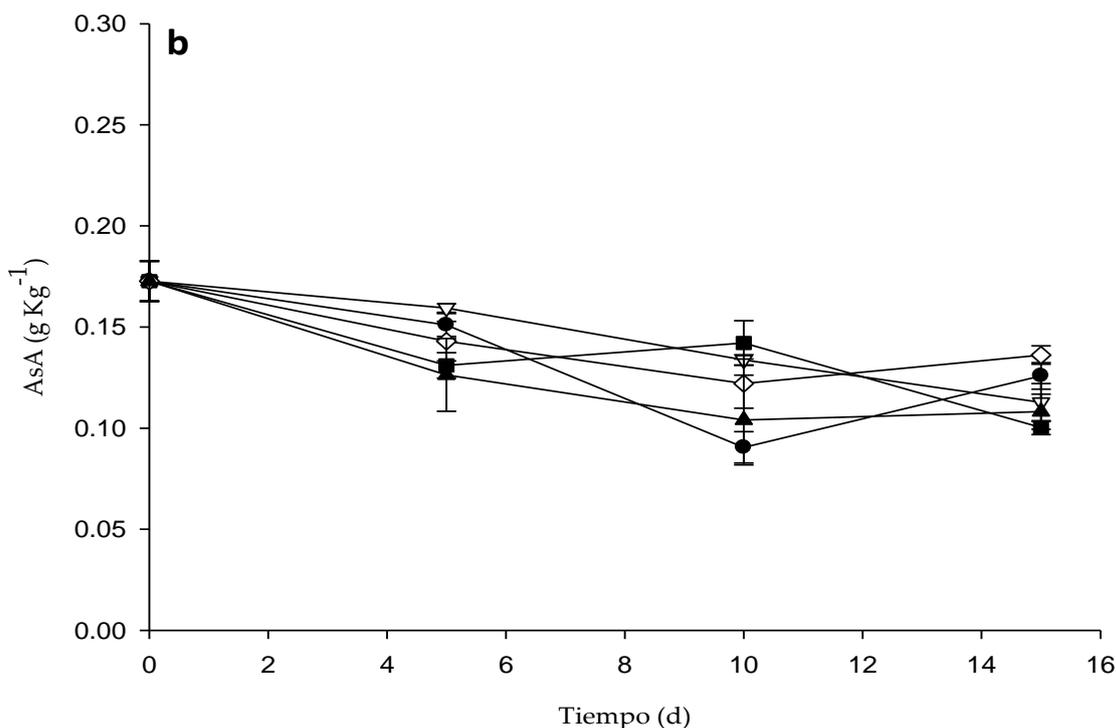
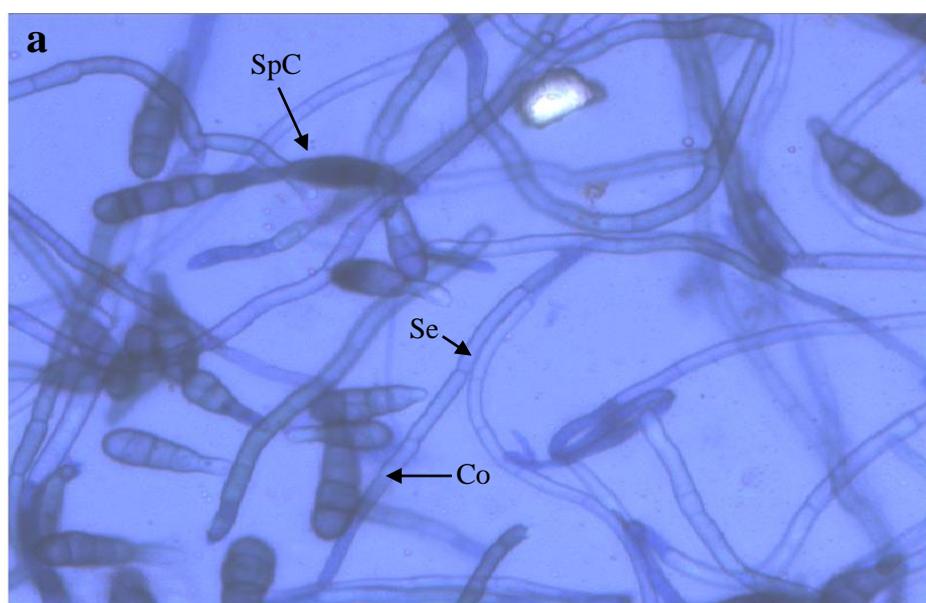


Figura 10. 15 Compuestos fenólicos solubles totales (a) y ácido ascórbico (b) en pitaya (*Stenocereus pruinosus*). Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

## VII. Porcentaje de inhibición por cuenta en placa de hongos y bacterias mesofílicas aerobias

Debido a que uno de los principales problemas es la contaminación microbiana (Armella *et al.*, 2003), en este trabajo se determinó la inhibición de hongos y bacterias aerobias mesófilas. Sin embargo, observamos un mayor crecimiento de hongos, en particular identificamos el crecimiento de *Alternaria spp.*, este microorganismo se identifica debido a la presencia de conidios organizados en cadenas (Hoog y Horré, 2002), como lo observamos en un microscopio óptico (Figura 10.16a), donde podemos identificar las hifas septadas (Se), los conidióforos (Co) y la cadena de esporas (SpC). El recubrimiento con NCH tuvo mayor inhibición fúngica y bacteriana aerobia mesófila durante el almacenamiento siendo de  $96.2 \pm 1.1$  y  $93.9 \pm 1.1\%$ , respectivamente, mientras que los

recubrimientos CH ( $78.0 \pm 2.2$  y  $80.5 \pm 1.4\%$ ) y C ( $76.1 \pm 3.8\%$  y  $88.3 \pm 2.0\%$ ) presentaron menor actividad antimicrobiana. El recubrimiento con NCGM mostró una actividad antimicrobiana moderada ( $51.8 \pm 7.8\%$  y  $46.1 \pm 3.6\%$ ) a pesar de la presencia de CS y NM (Figura 10.16); este resultado se podría atribuir a la presencia de la GM, una poli (1–3)  $\beta$ -D-galactosa con (1–6) ramificación de L-arabinosa, L-ramnosa,  $\beta$ -D-glucuronato y 4-O-metil-  $\beta$ -D-glucuronato (Vernon-Carter, 2000), que puede estimular el crecimiento de hongos.



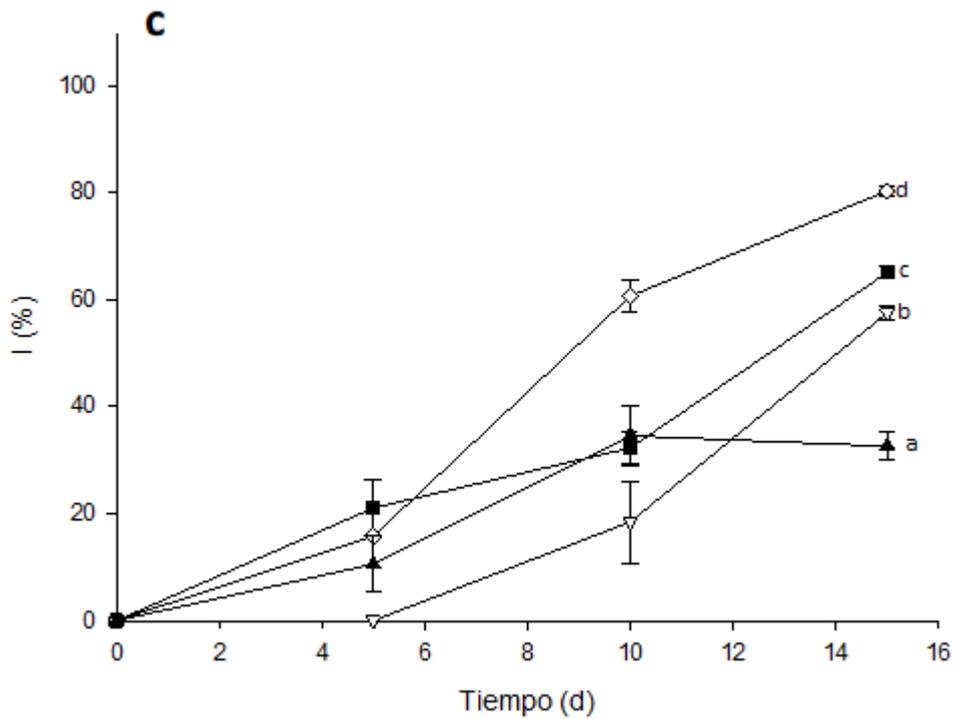
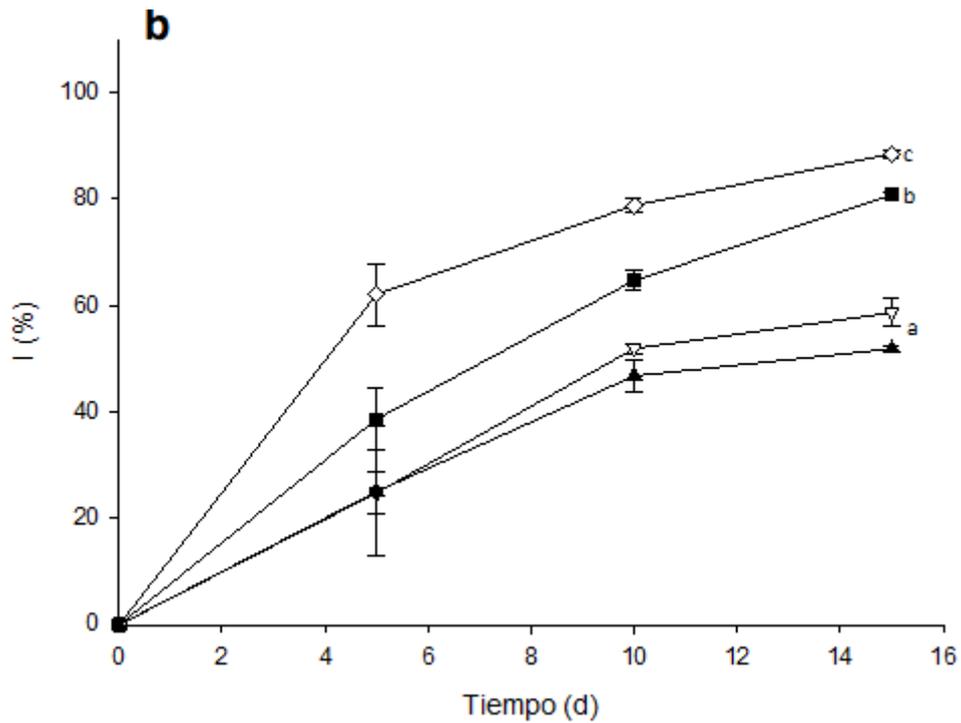


Figura 10. 16 Fotografía de microscopía óptica de un aislado de hongos teñidas con azul de metileno a 100x (a). Porcentaje de inhibición de hongos (b) y bacterias mesófilicas aerobias (c) CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

### VIII. Liberación de NM de las emulsiones

La determinación de azadiractina por UPC<sup>2</sup> evidenció la liberación de NM de las emulsiones (Figura 10.17). La concentración de azadiractina aumentó significativamente durante el almacenamiento de pitayas recubiertas con NCH. El recubrimiento de NQGM no liberó NM en condiciones de almacenamiento, lo cual podría atribuirse a la estabilidad de la emulsión al pH del epicarpio ( $5.2 \pm 0.1$ ) y a las condiciones de almacenamiento como la temperatura y humedad relativa. La concentración inicial de azadiractina al inicio es diferente en cada uno de los recubrimientos debido a que la estabilidad de NCH es baja y el NM empieza a liberarse a los 45 min.

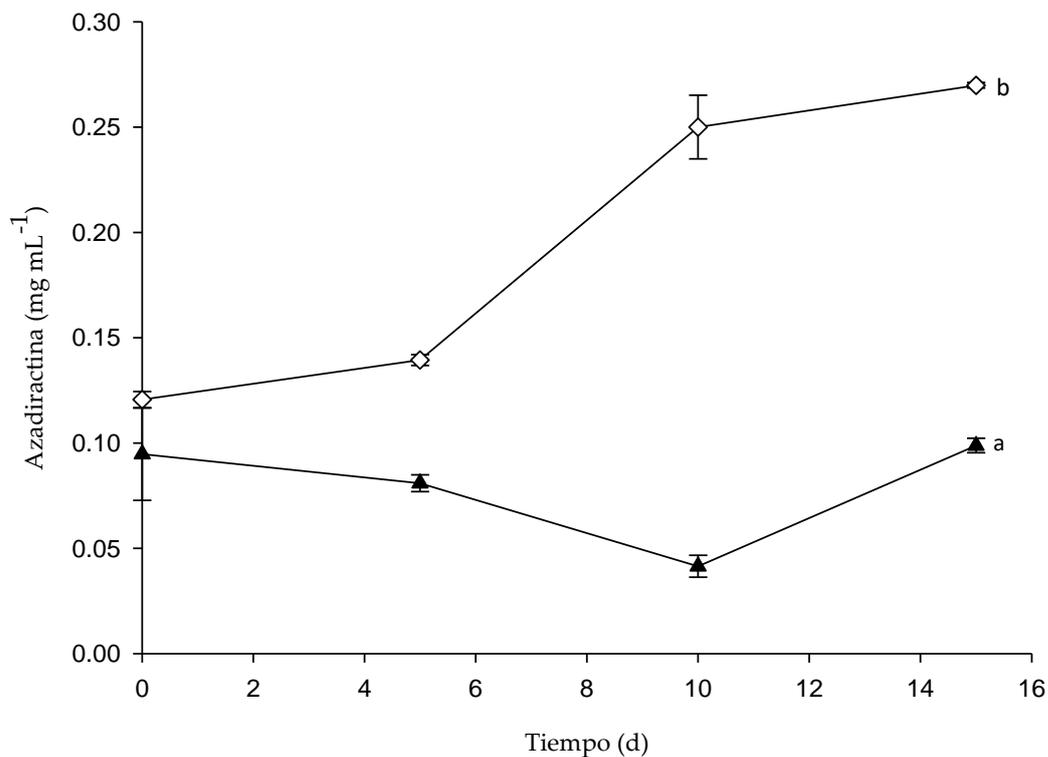


Figura 10. 17 Liberación de azadiractina en fruta recubierta con NCH ( $\diamond$ ) y NCGM ( $\blacktriangle$ ). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

### IX. Análisis sensorial

Se determinaron las características sensoriales de la fruta al inicio y final del bioensayo (Figura 10.18 y 10.19), y se pudo comprobar que NCH no afectó la aceptabilidad de la

fruta en ninguna de las variables respuesta, pero sí conservó las características del control desde el día cero. El recubrimiento CS mejoró la apariencia general, el aroma y la consistencia de la fruta, pero afectó el sabor dado que a los consumidores lo ubicaron en la escala de indiferente. Este último resultado también se observó con los frutos recubiertos con NCGM. Finalmente, CH mejoró la apariencia general, pero disminuyó en la consistencia de la pulpa.

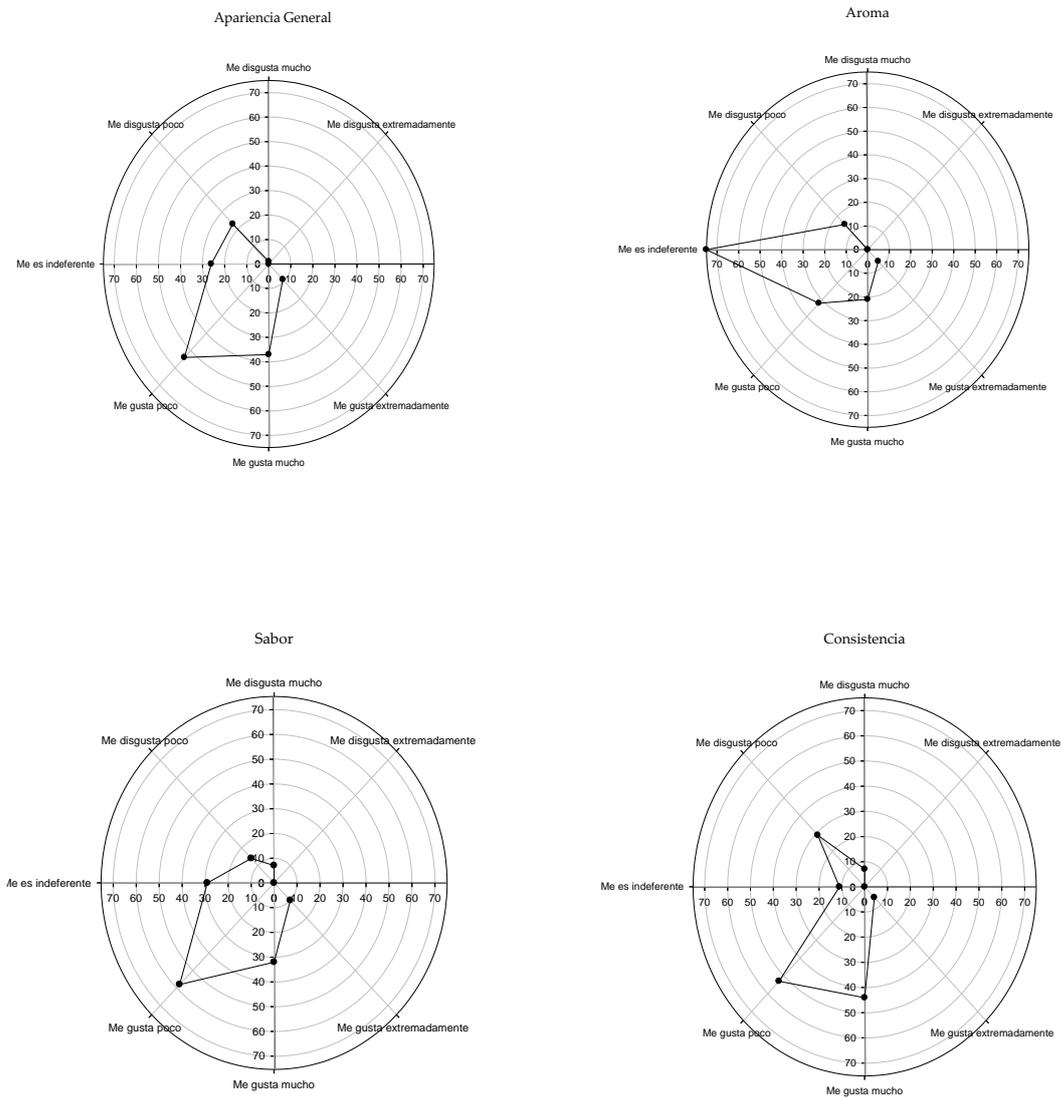


Figura 10. 18 Análisis sensorial de Pitaya Control (●) a 0 d.

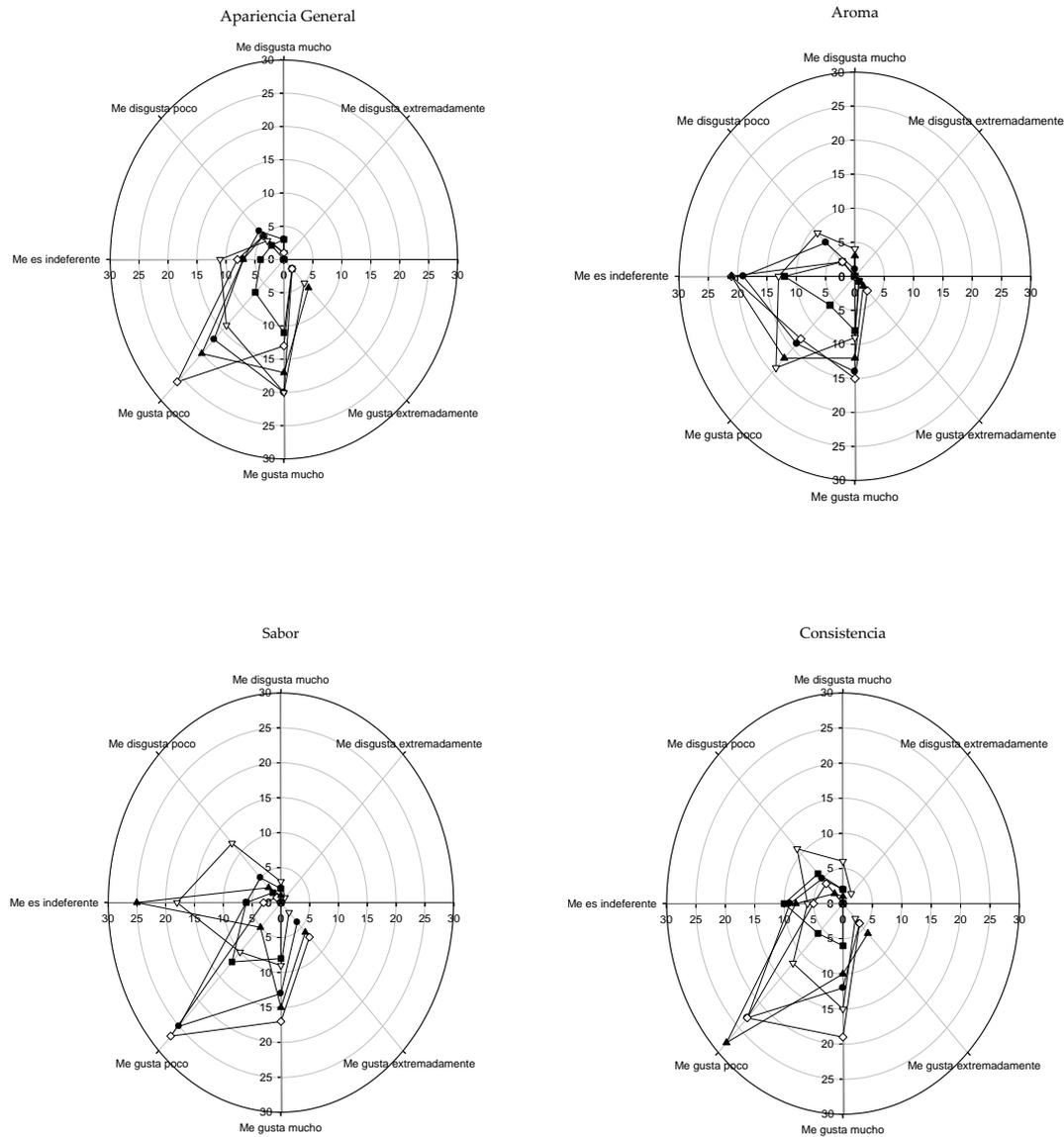


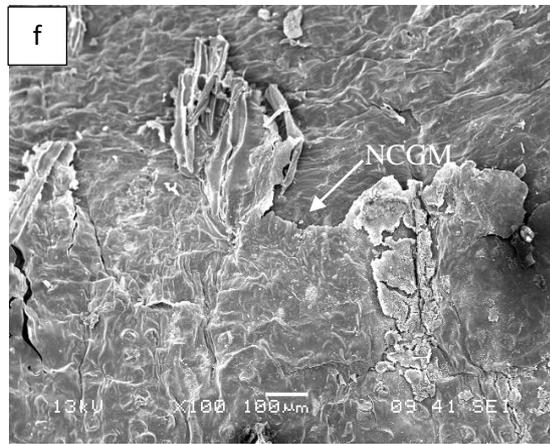
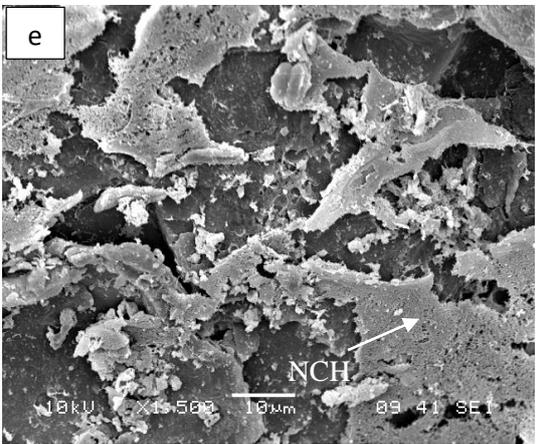
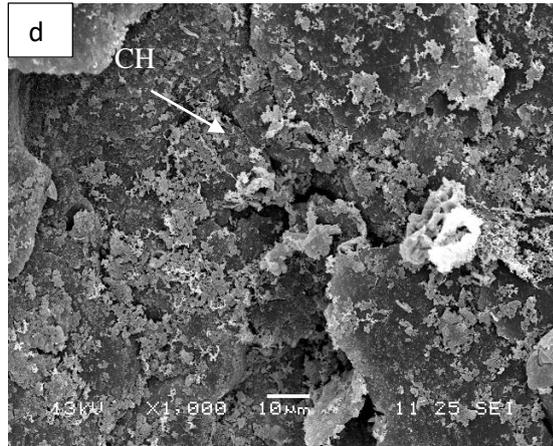
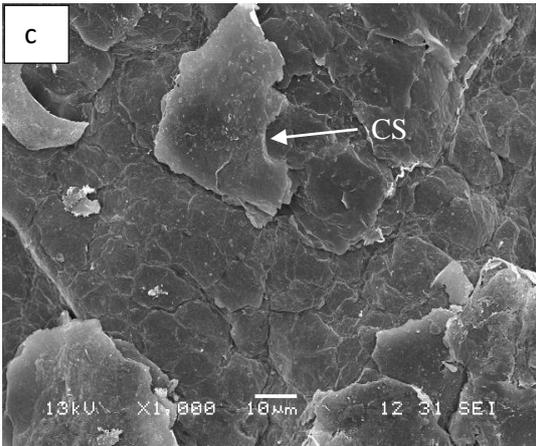
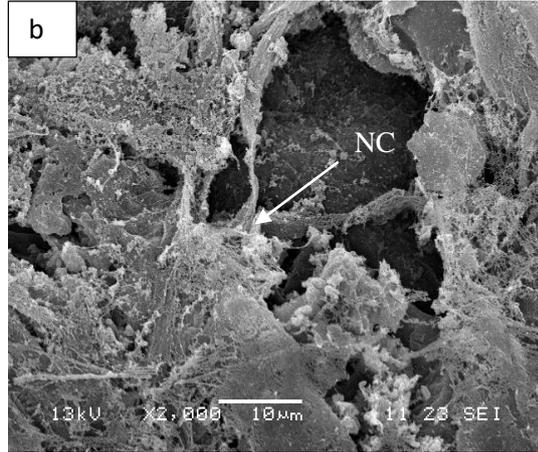
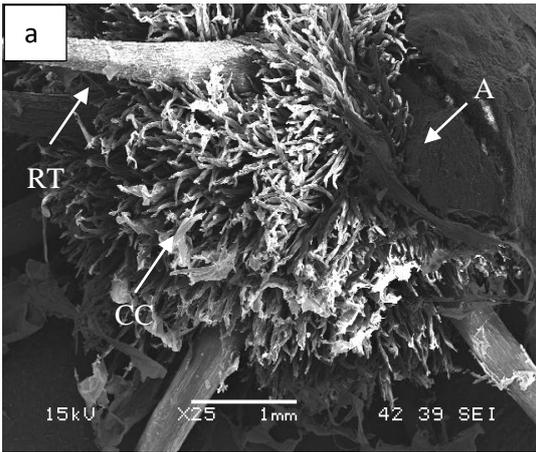
Figura 10. 19 Análisis sensorial de Pitaya Control (●), CS (▽), CH (■), NCH (◇), NCGM (▲) a 15 d de almacenamiento.

### X. Microscopía electrónica de barrido

La areola de pitaya se observa en la Figura 10.20 a, con una estructura formada por una serie de espinas radiales y centrales, las cuales tienen la función de capturar agua del ambiente. Durante el proceso de postcosecha, las areolas se retiran para la venta de frutas, lo que ocasiona pérdida de peso rápida. De acuerdo con García-Cruz *et al.* (2016),

*Stenocereus pruinosus* presenta en promedio de 24 a 28 areolas y el número de areolas es proporcional a la pérdida de agua. La Figura 10.20b muestra que las ceras de pitaya actúan como un recubrimiento natural, como en la mayoría de los cactus, además de darles brillo y resistencia a los factores ambientales (Ayala-Cordero *et al.*, 2006). El recubrimiento con CS formó una superficie lisa y homogénea a pesar de la morfología irregular del epicarpio de la pitaya (Figura 10.20c) mientras que los recubrimientos de CH y NCH sobre el epicarpio fueron heterogéneos (Fig. 10.20d-e). NCGM formó una estructura de red sobre el epicarpio y en otras áreas se mostró como aglomeraciones, debidas, posiblemente, a la hidrofiliidad de GM (Figura 10.20f).

Al final del bioensayo, en el control (g) observamos la presencia de hongos que es una característica que indica el fin de su vida de anaquel (Figura 10.20g), CS (Figura 10.20h) había permanecido en el epicarpio del fruto igual que al principio, pero CH (Figura 10.20i), NCH (Fig. 10.20j) y NCMG (Fig. 10.20k) presentaron aglomeraciones. El proceso de maduración de la pitaya no se ha caracterizado aún, pero, con base en las observaciones realizadas, aparentemente ninguno de los recubrimientos lo afectó. Finalmente, *Alternaria* se inoculó en los epicarpios de la pitaya para distinguir las estructuras fúngicas, además de hifas septadas, así como observaciones de la cadena de conidios (Figura 10.20l).



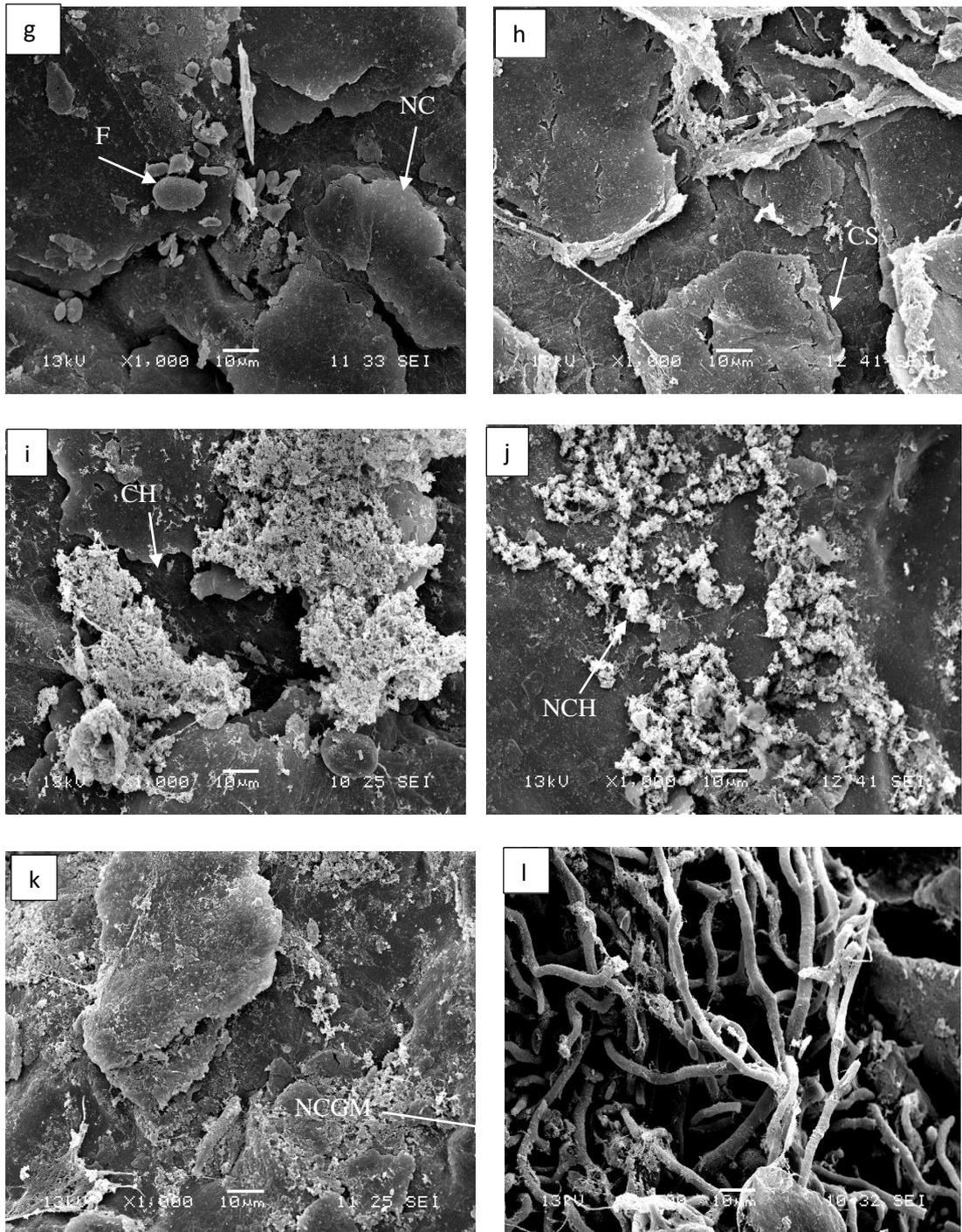


Figura 10. 20 Micrografías por SEM de recubrimientos al tiempo inicial y después de 15 d de almacenamiento, areola (a), control (b y g), CS (c y h), CH (d y i), NCH (e y j) y NCGM (f y k), inoculación de *Alternaria* (l). RT son espinas radiales, CC son espinas centrales, A es la aerola, F es hongos y NC es la cera natural.

### 10.3 ETAPA III. FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE EMULSIONES PICKERING

#### 10.3.1 Caracterización de NF

El diámetro de las fibras obtenidas por el método mecánico fue determinado por SEM (Figura 10.21), observando que el tamaño disminuyó con el incremento de los ciclos en el molino de  $69.8 \pm 6.5$  nm hasta  $10.88 \pm 0.9$  nm después de 8 ciclos (Tabla 10.5). Este fenómeno ha sido atribuido a que bajo condiciones ácidas se propicia las repulsiones electrostáticas entre las fibras, es decir, que estas cationizan los grupos amino C2 en la superficie de CT; estas cargas correspondieron aproximadamente al 9% de la estructura de acuerdo con el DA obtenido y fueron suficientes para romper los fuertes enlaces de hidrógeno entre las fibras, facilitando la fibrilación (Ifuku *et al.*, 2011; 2014). Ifuku *et al.* (2010) obtuvieron NF de cangrejo con un tamaño de 10-20 nm después de un ciclo en el molino, mientras que la muestra del presente trabajo requirió 8 ciclos (Figura 10.21) y puede atribuirse a que esos autores, previo al tratamiento mecánico realizaron una trituración con una licuadora, mientras que nuestra CT se procesó en escamas. Kumar *et al.* (2013) reportaron que las NF de menor longitud y grosor pueden enredarse más fácilmente e incrementar la viscosidad, pero, cuando la longitud es muy corta, como el caso de los CNM, sus NF no pueden enredarse y en consecuencia la viscosidad suele ser menor. Este fenómeno fue confirmado por Larbi *et al.* (2018). En la tabla 10.5 se puede observar diferencia significativa entre la viscosidad donde a mayor número de ciclos, se obtiene menor tamaño pero suficiente para que las NF de CT incrementen la viscosidad. Las estructuras cristalinas de las fibras de CT después del tratamiento mecánico con el molino, se examinaron las fibras obtenidas, mediante difracción de rayos X. Todas las muestras mostraron el mismo patrón, la mayor reflexión a aproximadamente  $2\theta = 9.1^\circ$  y  $19^\circ$ ; estos picos corresponden a los planos 020 y 110 de la unidad cristalina y amorfa,

respectivamente (Zhang *et al.*, 2015). En la Tabla 10.5, se muestra que la estructura cristalina de las fibras de CT originales (%IC=80.68) no se modificó durante el proceso de nanofibrilación por efecto de la molienda (%IC=80.13-82.91); tampoco se observó cambio en el tamaño aparente de cristal por lo que estos resultados indican que el tratamiento mecánico no dañó la estructura.

Tabla 10. 5 Caracterización de NF después de los diferentes ciclos en el molino, donde 0 ciclos refiere a la CT previo a la fibrilación.

Ciclos	Tamaño (nm)	Viscosidad (cP)	IC (%)	Dapp (110) (nm)
0	69.8±2.7 d	ND	80.68	12.44
2	25.2±1.2 c	3337.1±26.0 a	80.13	12.59
4	18.3±0.8 b	3771.4±17.6 b	82.16	12.14
6	15.0±0.5 a,b	3974.3±26.6 c	81.64	12.23
8	10.8±0.6 a	4328.6±10.3 d	82.91	12.73

Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer. ND es no determinado.

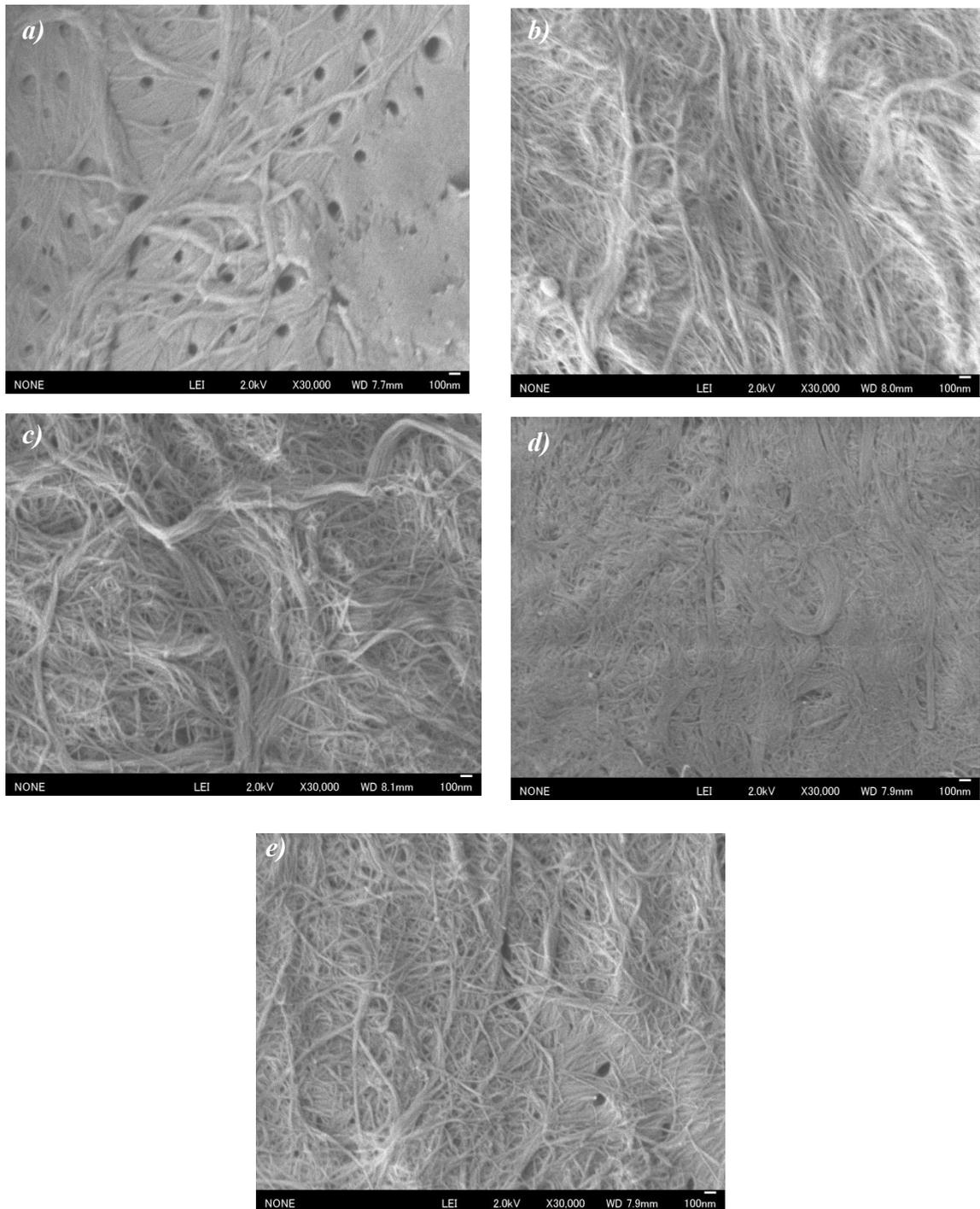


Figura 10. 21 SEM de CT (a) y NF después de 2 (b), 4 (c), 6 (d), 8 (e) ciclos en el molino.

En los espectros IR (Figura 10.22) se observan para CT y las NF a los diferentes ciclos de molienda. La banda de estiramiento del grupo OH a  $3420\text{ cm}^{-1}$ , la banda de estiramiento simétrico de NH a  $3160\text{ cm}^{-1}$  y asimétrico a  $3250\text{ cm}^{-1}$ , banda de amida I se

observa en el doblete 1652 y 1621  $\text{cm}^{-1}$ , y banda de amida II a 1554  $\text{cm}^{-1}$ . El estiramiento de CO está en 1085,1125 y 1160  $\text{cm}^{-1}$  (Ifuku *et al.*, 2009; Aranday-García *et al.*, 2017). La presencia de estos grupos sugiere que el método de obtención de NF no afecta la estructura.

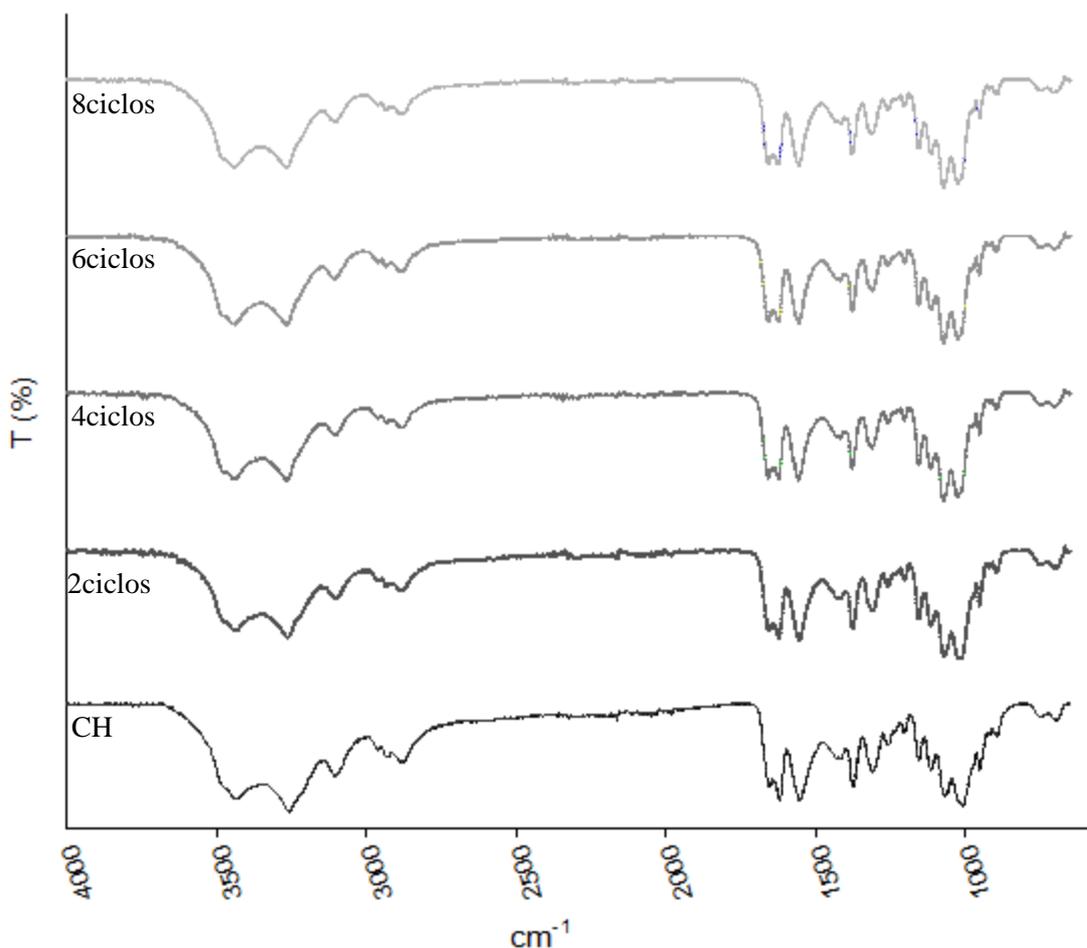


Figura 10. 22 Espectro FTIR de NF con diferentes ciclos de molienda.

### 10.3.2 Caracterización de Cg

Con el objeto de formular emulsiones tipo Pickering monodispersos Yin *et al.* (2018) introdujeron a sus formulaciones el monómero HEMA, debido a que dotó a las partículas de hidrofiliidad superficial para estabilizar los sistemas, además de que estas partículas se prefieren para encapsular aceite en agua. Es bien sabido que el CS se disuelve en soluciones ligeramente ácidas y que al subir el pH puede precipitar por esta razón además de que el HEMA incrementar la hidrofiliidad de las emulsiones Pickering, también

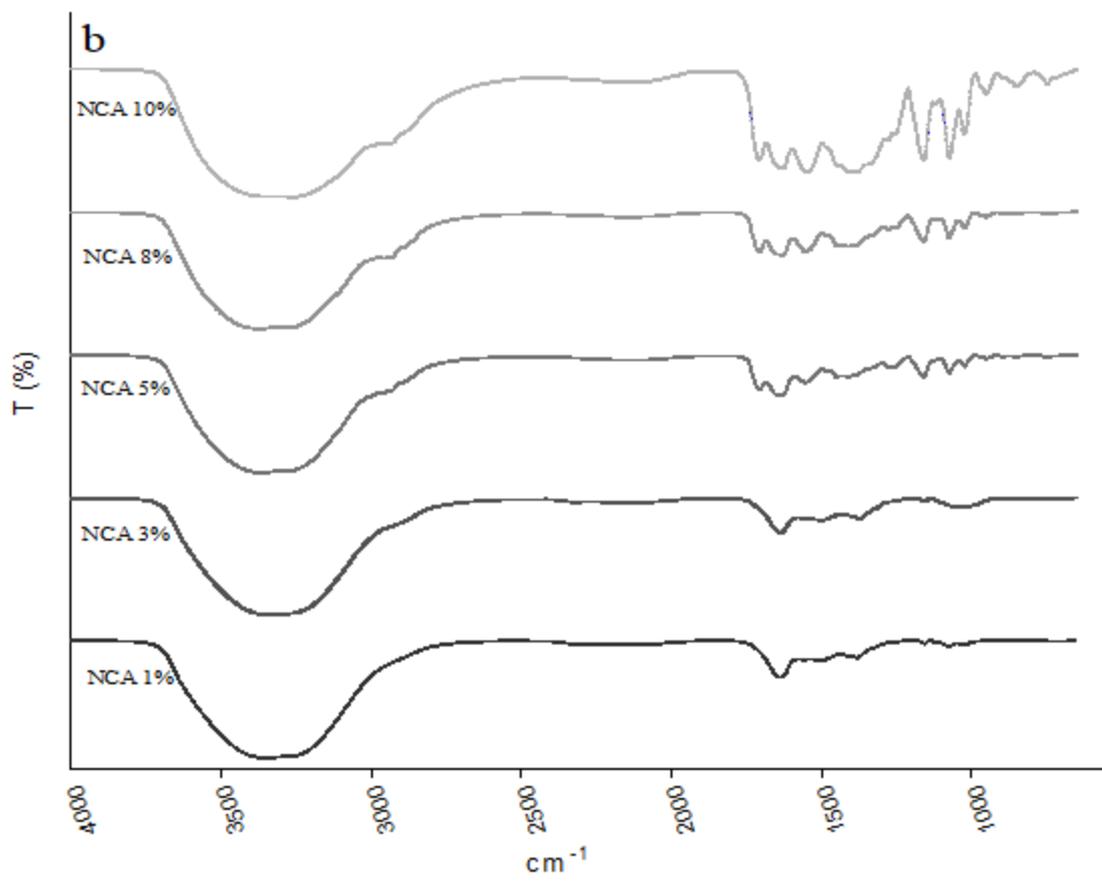
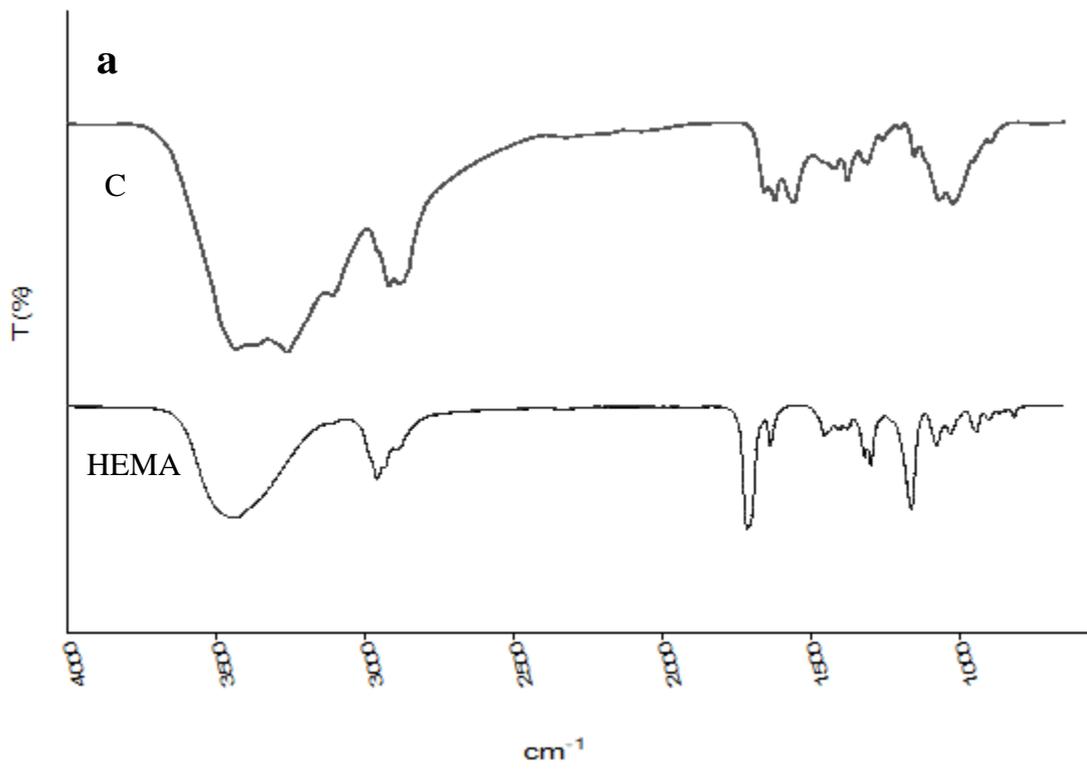
puede aumentar la solubilidad a pH neutro. El injerto de HEMA en CS se realizó empleando diferentes concentraciones de nitrato cerio amonio (NCA), que es el iniciador redox para efectuar el injerto de una variedad de monómeros de vinilo en biopolímeros. El mecanismo por el cual Ce (IV) interactúa con el biopolímero para formar radicales libres implica la formación de un complejo de coordinación entre el Ce (IV) y el grupo hidroxilo del CS que luego se desproporciona formando un radical libre en la cadena de biopolímero y Ce (III) (Manoj & Nayak, 2012). En la tabla 10.6, se obtuvo diferencia significativa en todas las determinaciones, observando que las concentraciones 5, 8 y 10% de NCA tuvieron mayores valores que los obtenidos en las concentraciones 1 y 3%. Radhakumary *et al.* (2003), quienes emplearon una relación 2:5 p p<sup>-1</sup> de CS:HEMA y realizaron el injerto con 5.4% de NCA en una temperatura de 70°C por 5 h, obtuvieron un 63.3% de rendimiento, 121% de entrecruzado y 48% de conversión; estos valores fueron menores a los que obtuvimos con el empleo del 5% de NCA y 4 h de reacción, lo que atribuimos a la influencia de la luz UV, dado que el NCA puede ser un iniciador químico o fotoiniciador, y en este trabajo se combinan ambas funciones. Reportes previos solo han evaluado la polimerización de CS y HEMA con iniciadores de cerio bajo condiciones UV o químicas (Casimiro *et al.*, 2005), determinando que la exposición a rayos UV obtiene mayores rendimientos. En la tabla 10.6 se muestra el peso de CS por peso del injerto, relación de suma importancia dado que mediante la modificación de la técnica colorimétrica con ninhidrina reportada por Chung *et al.* (1998), es posible determinar la concentración de grupos amino libres del CS presente en el injerto, a los que se les atribuye la capacidad antimicrobiana. En la misma tabla 10.6, se aprecia que las concentraciones 1 y 3% de NCA tienen la mayor concentración de grupos amino libres, mientras que en el resto de las concentraciones disminuyeron.

Tabla 10. 6 Caracterización de Cg

Concentración NCA (%)	Rendimiento (%)	Entrecruzado (%)	Conversión (%)	Grupos amino libre (%)
1	67.61 ± 0.33 a	102.83 ± 0.91 a	34.28 ± 0.33 a	82 ± 3.1 a
3	69.88 ± 0.11 a	104.60 ± 0.71 a	36.55 ± 0.114 a	80 ± 4 a
5	83.81 ± 0.24 b	151.43 ± 0.521 b	50.475 ± 0.24 b	35 ± 1 b
8	82.15 ± 0.17 b	146.45 ± 0.15 b	48.82 ± 0.97 b	33 ± 1.1 b
10	80.71 ± 0.14 b	149.05 ± 0.97 b	47.38 ± 0.14 b	32 ± 0.9 b

Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

La determinación de los grupos amino libres indican que el injerto se llevó a cabo en los enlaces amino, lo que concuerda con Dos Santos *et al.* (2006) quienes mencionan es que las cadenas de HEMA pueden estar unidas covalentemente al azar a los grupos amino libres de C2 en unidades desacetiladas o a los grupos hidroxilo en los carbonos C3 y C6, bien de unidades acetiladas o desacetiladas de CS, esto se puede corroborar con los espectros de absorción IR por FTIR obtenidos, en los que se identificaron los grupos del CS y HEMA nativos encontrando que a los 1715 cm<sup>-1</sup> está el grupo carbonilo, mientras que en 1655 y 1620 cm<sup>-1</sup> se encuentran los grupos amino y en 950 cm<sup>-1</sup> los grupos hidroxilo del CS (Figura 10.23a). Las muestras también fueron analizadas antes (Figura 10.23b) y después (Figura 10.23c) de la purificación; en el primer caso se observa que la banda de los grupos carbonilos del HEMA disminuye de intensidad mientras que de las bandas de los grupos amino no está bien definida y los grupos hidroxilo en la mayor concentración de NCA no se detecta. Después de la purificación se observa que estas bandas se ven más definidas, por lo que podemos asumir que el injerto fue al azar se llevó en los sitios ya mencionados. Por lo tanto, dadas estas evidencias se decidió trabajar con la concentración de 1% de NCA.



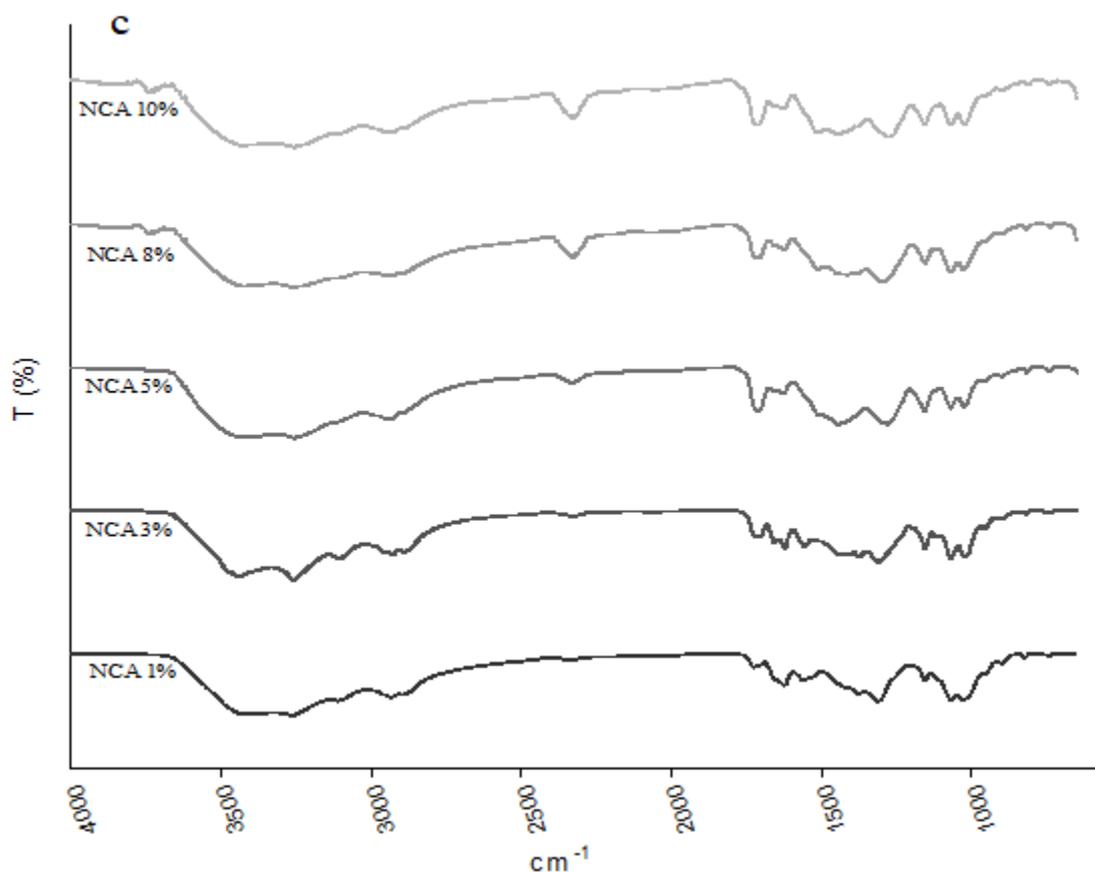


Figura 10. 23 a) Espectros de absorcion FTIR de CS y HEMA. Injerto Cg en diferentes concentraciones de NCA sin purificar (b) y purificado (c).

#### 10.3.4 Caracterización de emulsiones Pickering

La fase dispersa consistió en HNM y/o CNM debido a las propiedades ya mencionadas, y, para completar el 0.1 de fracción másica dispersa se empleó aceite de soja (SO), debido a que este tiene amplios usos en alimentos (Kinney, 2003), debido a sus propiedades farmacológicas contra enfermedades del corazón, cáncer y osteoporosis (Messina *et al.*, 2002) y también se ha usado en agricultura como protector de granos (Khalequzzaman *et al.*, 2007).

De acuerdo con la ley de Stoke, la estabilidad de la emulsión se puede mejorar reduciendo el tamaño de las gotitas, aumentando la viscosidad de la fase continua o minimizando las

diferencias de densidad entre las gotitas y la fase continua (Jia *et al.*, 2015). Por ello y dada la importancia del aumento de la viscosidad en este tipo de emulsiones, en la Figura 10.24 se determinó este parámetro en las matrices de Cg y Cg-NF, observando que en esta última se incrementa de manera proporcional a la concentración de NF. Con esto se comprueba que la viscosidad se incrementa debido a que las NF se enredan entre ellas, lo que no ocurre con Cg, aunque se mantiene una solución homogénea después de solubilizarlo en agua.

Con la incorporación de la fase dispersa CNM - SO la viscosidad es mayor lo que se atribuye a la incorporación de ambos aceites, sin embargo, cuando la fase dispersa es HNM - SO no se observa diferencia significativa con respecto a las matrices solas posiblemente porque el HNM fue previamente disuelto en etanol lo que provoca que las NF se disgreguen; este efecto que se ve reducido cuando se emplea el 0.8% de NF. Por último, cuando la fase dispersa que combina HNM - CNM - SO el efecto del etanol se ve disminuido.

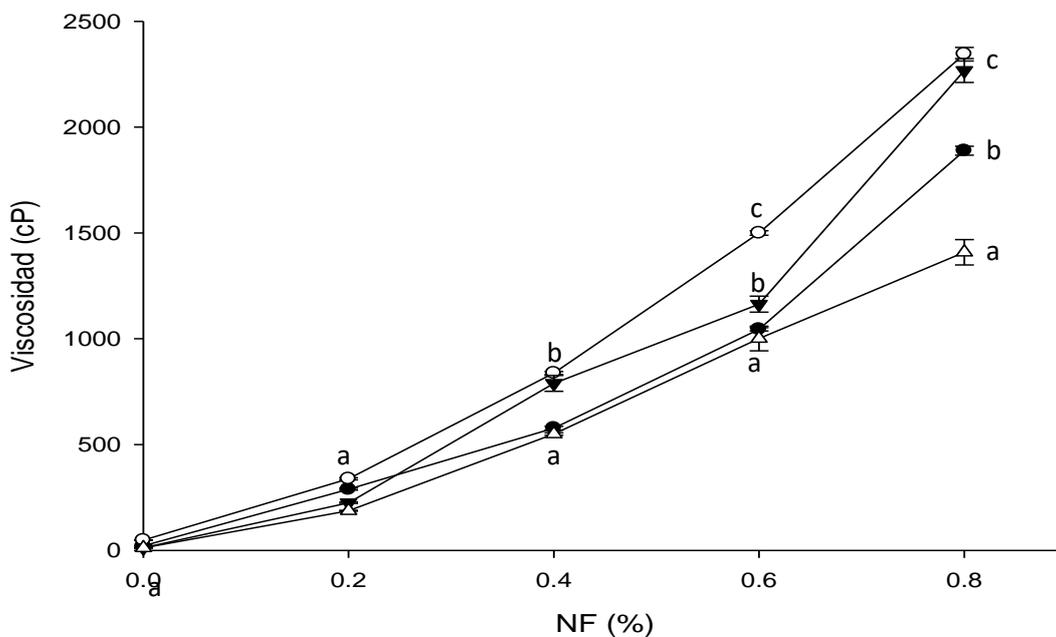
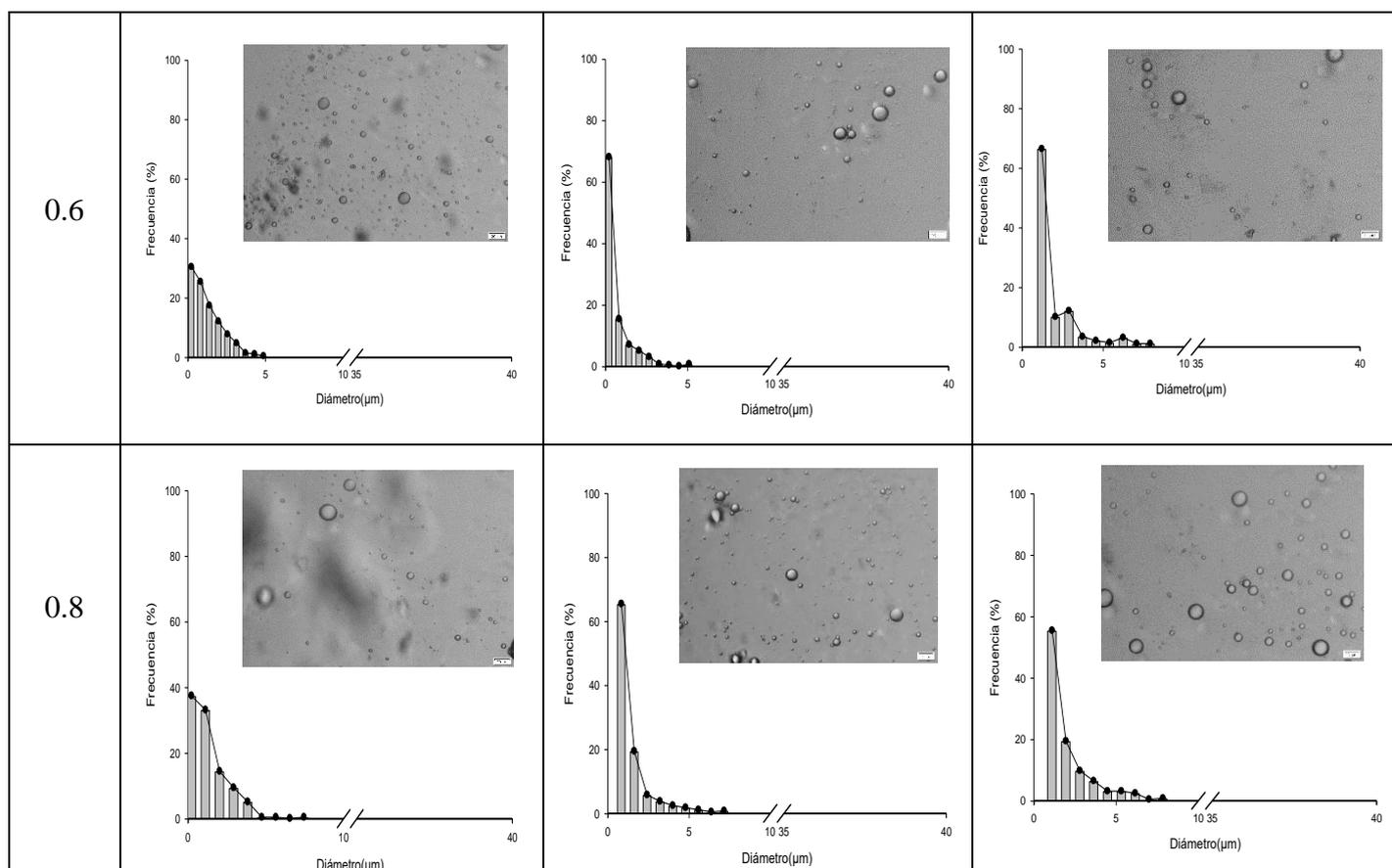


Figura 10. 24 Viscosidad de Cg-NF ( $\Delta$ ), HNMMSO+Cg-NF ( $\bullet$ ), CNMSO+ Cg-NF ( $\circ$ ) y HNMNCSO+Cg-NF( $\blacktriangledown$ ). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

El tamaño y distribución de las gotas en las emulsiones juegan un papel predominante en la estabilidad. En la Tabla 10.7 se puede observar la distribución del tamaño de las gotas, estando todas ellas en escala micrométrica. Este fenómeno es común de acuerdo con Kalashnikova *et al.* (2013), quienes afirman que el tamaño de las gotas de emulsión es inversamente proporcional al área superficial de nanopartículas accesibles a la interfaz O/W, lo que puede deberse a un proceso de aglomeración de las NF que rodean a la fase dispersa. Sin embargo, en las fases 1 a 3 podemos observar que los sistemas son polidispersos y diámetros promedios mayores cuando la matriz de encapsulamiento es solo Cg, pero en la fase 1, que incluye HNM se observa que la distribución es homogénea cuando se emplean concentraciones de 0.6%. En la fase 2 las concentraciones 0.2 a 0.6% tuvieron menores diámetros. En la fase 3 los diámetros se incrementaron debido, posiblemente a la interacción con el etanol. De acuerdo a Barkhordari & Fathi (2018), con el incremento de concentración de las nanopartículas decrece el tamaño de las gotas; en nuestro estudio en las 3 fases se observa que 0.8% de NF incrementan su tamaño y polidispersión, lo que se puede atribuir a la alta viscosidad de los componentes dispersos, así como al proceso de homogenización que fue menos potente lo que dificultando el proceso de homogenización; este fenómeno también fue observado por Jia *et al.* (2015), aunado a esto observamos que la naturaleza de la fase dispersa también afecta el tamaño y la homogeneidad.

Tabla 10. 7 Tamaño de encapsulado (dilución 1:10) empleando SO y diferentes tipos de N en la fase dispersa: HNM (hoja de neem), CNM (neem comercial) y una mezcla de estos (HNM-CNM) y como fase continua solo Cg y en combinación con diferentes concentraciones de NF (0, 2, 4, 6 y 8%).

Tipo de NM NF (%)	HNM	CNM	HNM-CNM
0			
0.2			
0.4			



La estabilidad de un sistema es importante para las aplicaciones en la industria, para que resista los cambios fisicoquímicos a lo largo del almacenamiento (Dickinson, 2017). En las Figuras 10.25 y 10.26, se determinó la separación gravitacional y acelerada de las emulsiones formuladas. Para la separación gravitacional se monitoreo la separacion de la crema del suero cada 24 h, pero el sistema de encapsulamiento solo constituido solo por Cg resultó inestable debido a que a las 2 h se había separado el 50%. En todas las fases dispersas, después de 8 d se observó cremado en las concentraciones de 0 al 0.4% de NF, pero en concentraciones de 0.6 y 0.8% se mantuvieron estables. De acuerdo con Tzoumaki *et al.* (2011), Pang *et al.* (2017) y Larbi *et al.* (2018) la estabilidad al cremado se incrementa en función de la concentración de los nanomateriales; que fue lo que se observó en el presente trabajo, ya que se logró la estabilidad en concentraciones incluso menores a las empleadas por estos autores (mayores al 0.8% de NC y NF) para evitar la

separación de las fases. En la Figura 10.24 se observa la separación acelerada de las emulsiones; en la 10.26a se aprecia que la EE se incrementa en función de la concentración de NF y por ende el aceite presente en la fase cremada disminuye (Figura 10.26b); este fenómeno fue reportado por Mikulcová *et al.* (2016) quienes evaluaron nanofibrillas de celulosa que encapsulan diferentes aceites en ellas, observando que independientemente de la fase oleosa la eficiencia se incrementa proporcionalmente a la concentración de nanofibrillas, razón por la que el aceite libre en la fase de cremado disminuye.

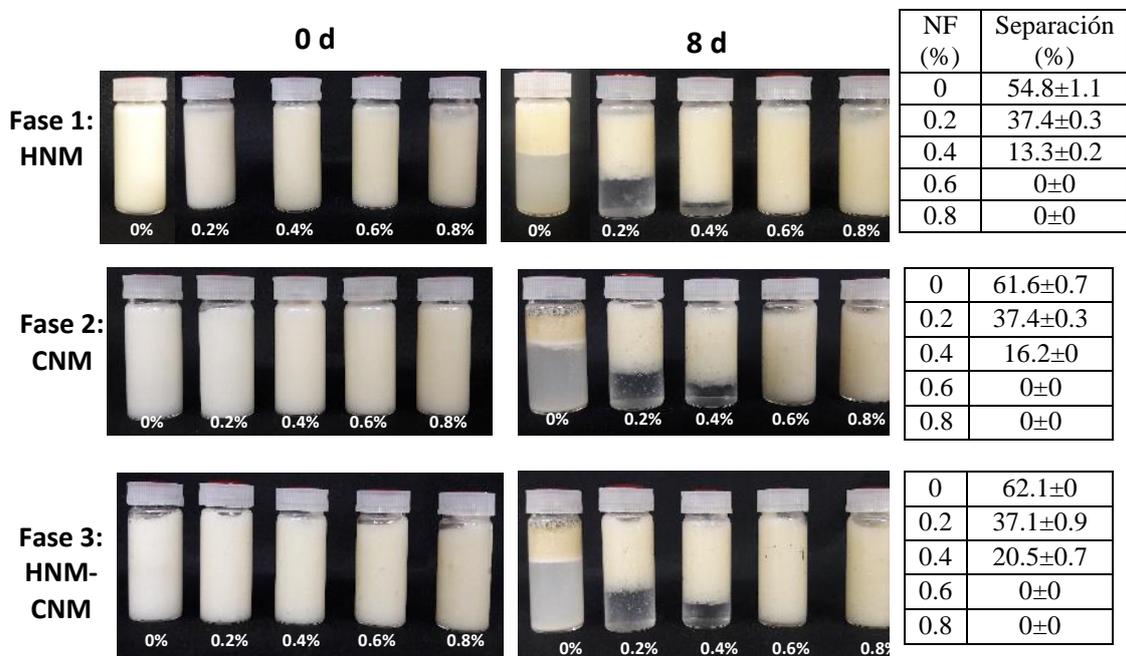


Figura 10. 25 Separacion gravitacional de emulsiones en las diferentes fases, en la tabla se muestra el porcentaje de separacion de la fase cremosa de la acuosa.

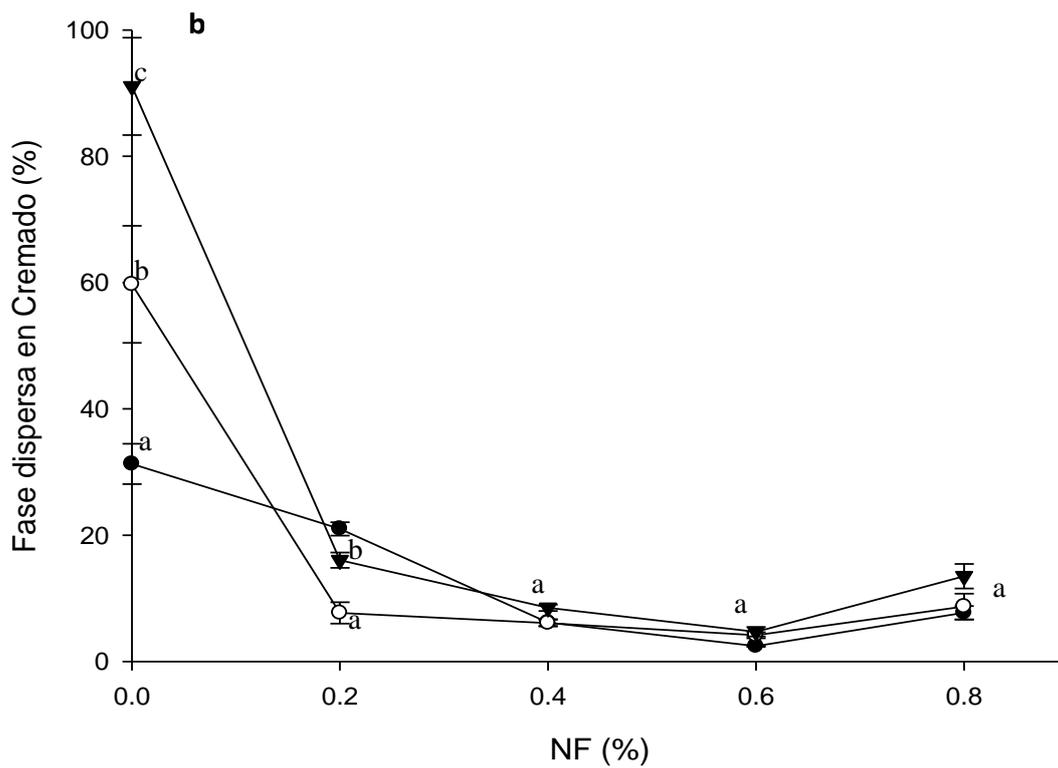
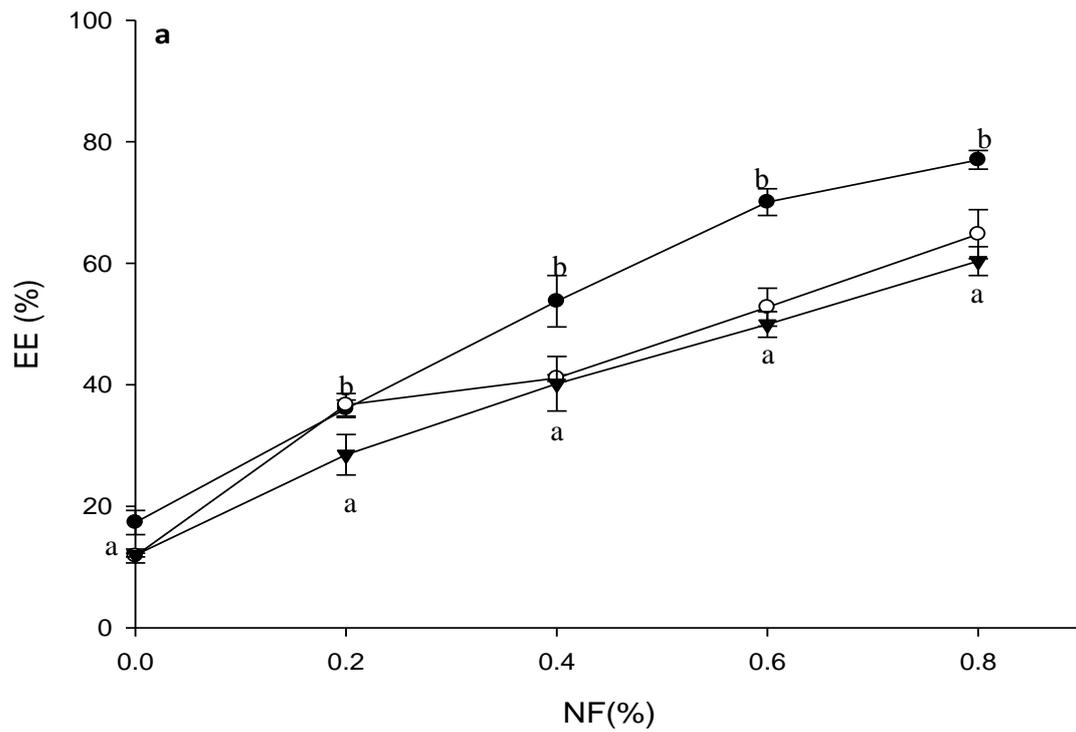


Figura 10. 26 Eficiencia de encapsulación y aceite en cremado de HNM+Cg-NF (●), CNMSO+ Cg-NF (○) y HNM-CNM-SO+Cg-NF(▼). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

También se evaluó la concentración de 0.6% de NF que resultó ser estable y se comparó con la concentración de 0.4%, para determinar los parámetros de estabilidad en diferentes pH. En la Figura 10.27 se muestra que en ambas concentraciones de NF la viscosidad disminuye conforme se incrementa el pH; en 0.4%NF el cambio de viscosidad fue de  $939 \pm 9.8$  a  $389.6 \pm 4.0$  cP, mientras que en 0.6% NF fue de  $2220.7 \pm 21.6$  a  $514.8 \pm 5.3$  cP cuando el pH 2.5 se incrementó a pH 5.5 en ambos casos. Este comportamiento puede ser atribuido a la orientación estructural que sufren las NF para poder fungir como estabilizantes en este tipo de emulsiones.

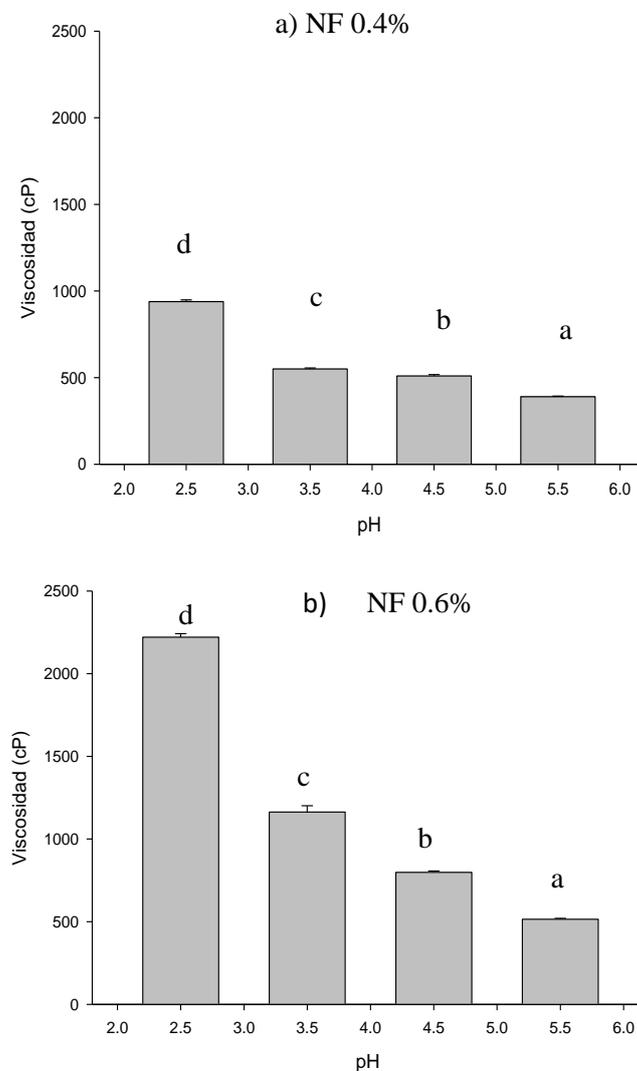
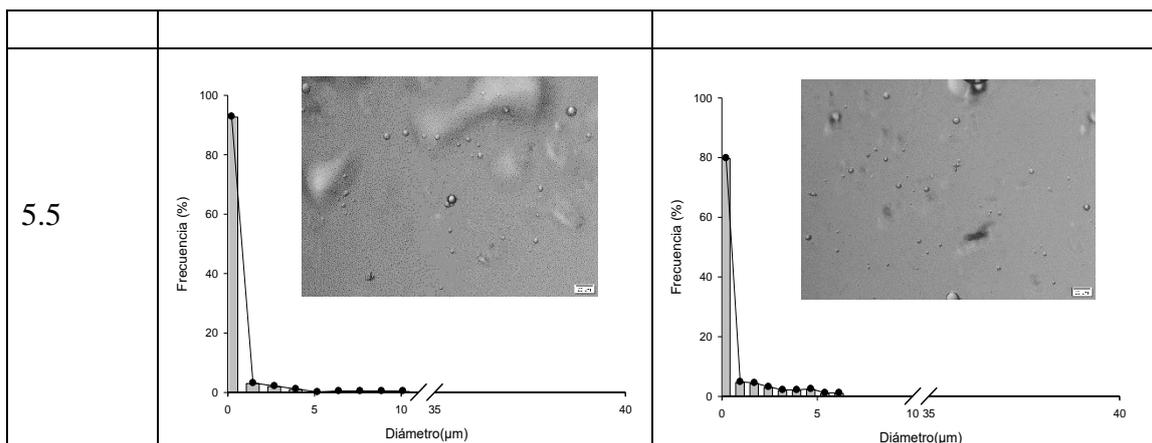


Figura 10. 27 Viscosidad empleando 0.4% (a) y 0.6% (b) de NF. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

En la Tabla 10.8, se observa que se obtuvieron sistemas con diámetros polidispersos y que estos no incrementan o disminuyen el tamaño de gota con el cambio de pH; sin embargo, sí se aprecia, de manera general que la concentración de 0.4% tiene mayores tamaños que 0.6%, lo que concuerda con lo mencionado anteriormente en la Tabla 10.7.

Tabla 10. 8 Tamaño de partícula de emulsiones (dilución 1:10) con 0.4 y 0.6% de NF en diferentes pH, empleando como fase dispersa HNM-CNM-SO.

NF (%) pH	0.4	0.6
2.5		
3.5		
4.5		



La separación gravitacional se observó cada 24 h y puso de manifiesto que las emulsiones con 0.4% de NF sufren separación de las fases, excepto la que estuvo en pH 5.5, lo que se puede atribuir a que está cercano al punto isoeléctrico que para nuestras NF fue pH 6 (Anexo A3), por lo tanto, las fuerzas electrostáticas repulsivas se ven disminuidas, es decir, las fibrillas se mueven menos. Otros autores ya han registrado también este fenómeno, pero con diferentes pH isoeléctricos; Tzoumaki *et al.* (2011) y Pang *et al.* (2017), ubican este punto en pH 6.3 y 8 respectivamente. El uso de 0.6% NF fue suficiente para mantener estables las emulsiones en todos los pH (Figura 10.28). El punto isoeléctrico también repercute en la EE (Figura 10.29) que disminuye conforme se incrementa el pH para ambas concentraciones de NF, debido a la disminución de los movimientos de las cargas, con respecto a la concentración de aceite en la fase cremosa no hubo diferencia significativa.

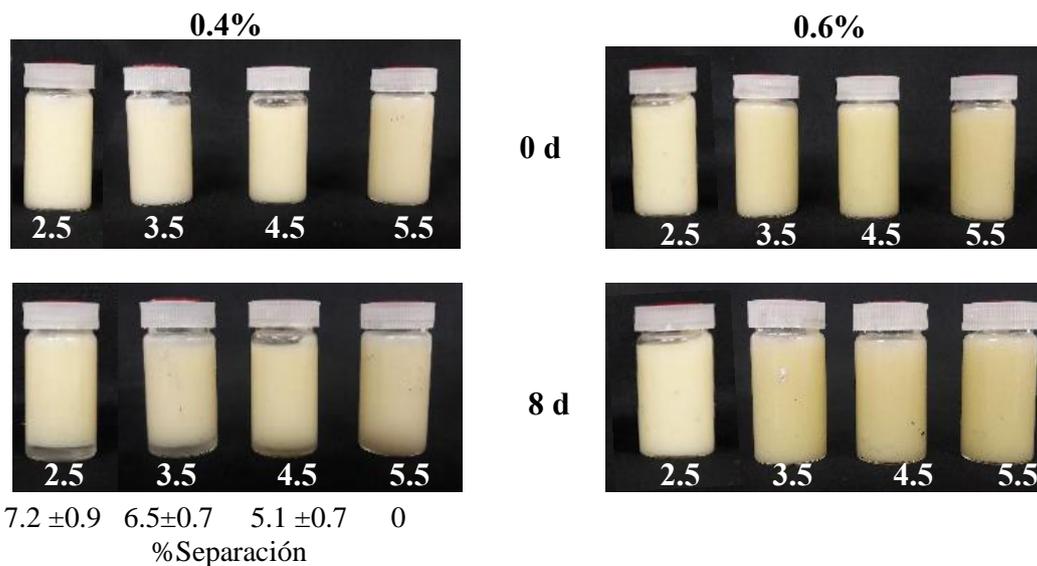


Figura 10. 28 Separación gravitacional de emulsiones empleando diferentes concentraciones de NF en diferentes pH.

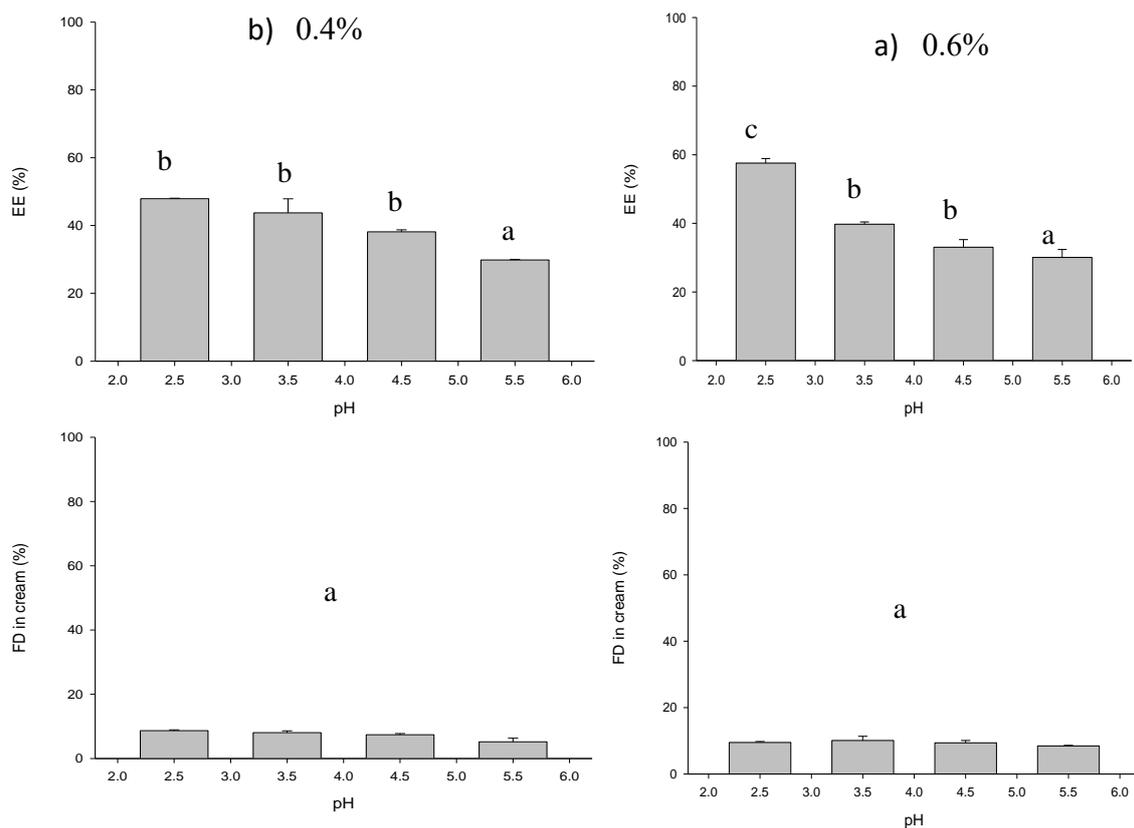


Figura 10. 29 Eficiencia de encapsulación y aceite en cremado de emulsiones con 0.4 (a) y 0.6 (b) % NF en diferentes pH. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

Se determino el potencial zeta de las emulsiones (Tabla 10.9) obteniendo valores negativos, en las que a mayor pH fue mayor carga negativa, lo que puede atribuirse a las cargas de los aceites (HNM=-17.77±0.0004 mV, CNM = -0.16±0.0006 mV y SO = -0.44±0.0006 mV) y a la orientación de las NF y de Cg; donde las cargas se anularon fue en los puntos isoeléctricos de pH 6 y 6.5 (Anexo A3) respectivamente, por lo tanto, posiblemente predominen las cargas de los grupos carboxílicos.

Tabla 10. 9 Potencial zeta de las emulsiones empleando 0.4 y 0.6 % de NF en diferentes pH

pH	Potencia Zeta (mV)	
	0.4%	0.6%
2.5	-9.12±0.0008 a	-10.52±0.00008 a
3.5	-11.22±0.0008 b	-13.97±0.0001 b
4.5	-26.74±0.0002 c	-27.98±0.0002 c
5.5	-35.62±0.0002 d	-32.16±0.0004 d

Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de Tukey-Kramer.

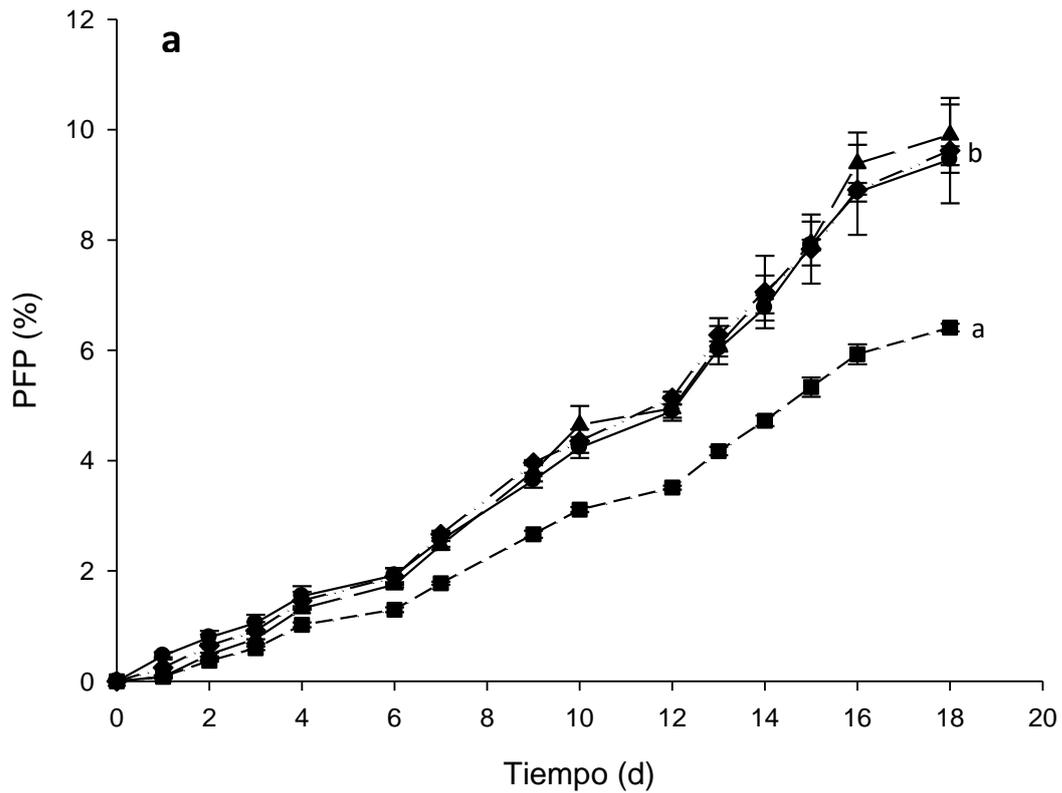
### 10.3.3 Evaluación de recubrimientos en conservación poscosecha de pitaya

#### 10.3.3.1 Bioensayo 1 y 2

##### I. Pérdida fisiológica de peso

Como ya se mencionó anteriormente la temperatura de 10 ° C aunado a altas humedades relativas pueden ayudar a incrementar la eficiencia de los recubrimientos, sin embargo, en este caso al aplicar las emulsiones pickering (Bioensayo 1, Figura 10.30a) se observó que no tiene efecto significativo sobre este parámetro; posiblemente, los frutos tratados solo con NF no lograron recubrirlos de manera uniforme. El CS injertado con HEMA (Cg) sí logra disminuir la pérdida de peso, por ello en el bioensayo 2 se evaluó este recubrimiento con CS, observando el mismo resultado. Con respecto a la emulsión NCH que preservó la fruta por 15 d y una pérdida de peso ~ 4%, Cg tuvo una pérdida de ~ 6%,

después de 18 d de almacenamiento. En el bioensayo 2 se evaluaron los recubrimientos a temperatura ambiente, sin encontrarse diferencia significativa ( $p > 0.5$ ) con respecto al control y preservaron la fruta por 9 d, que son 3 d más que García-Cruz *et al.* (2016) que reportaron al almacenar frutos de *Stenocereus pruinosus* a 24 °C.



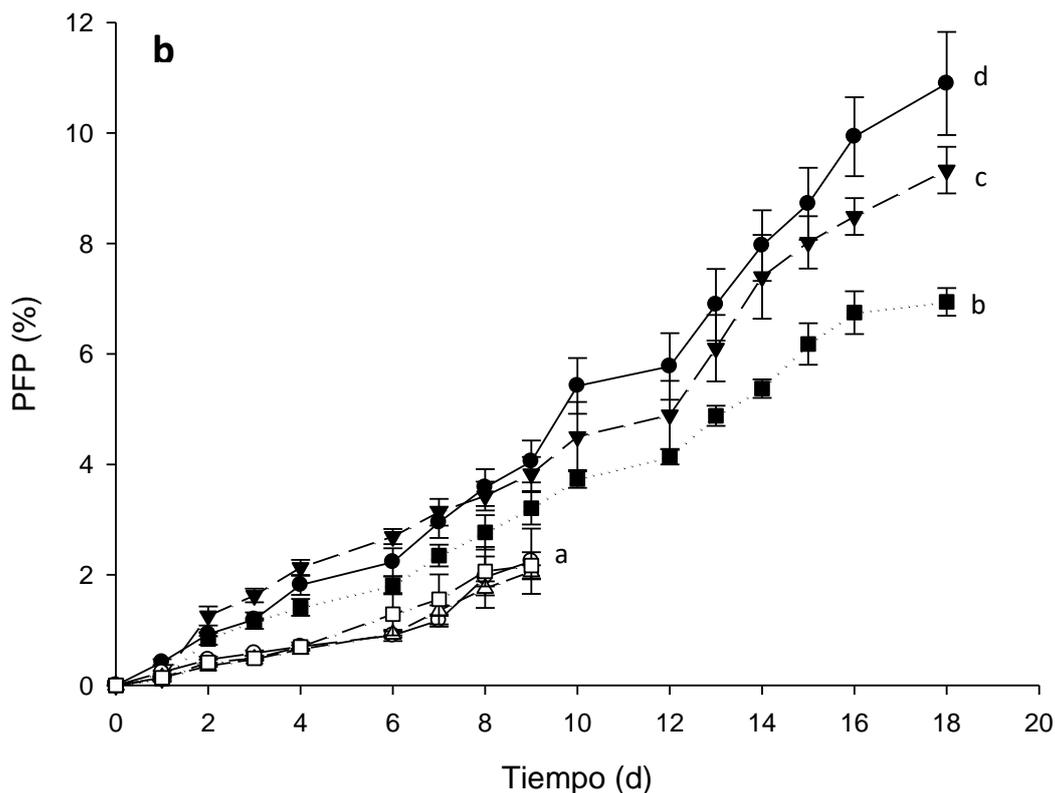
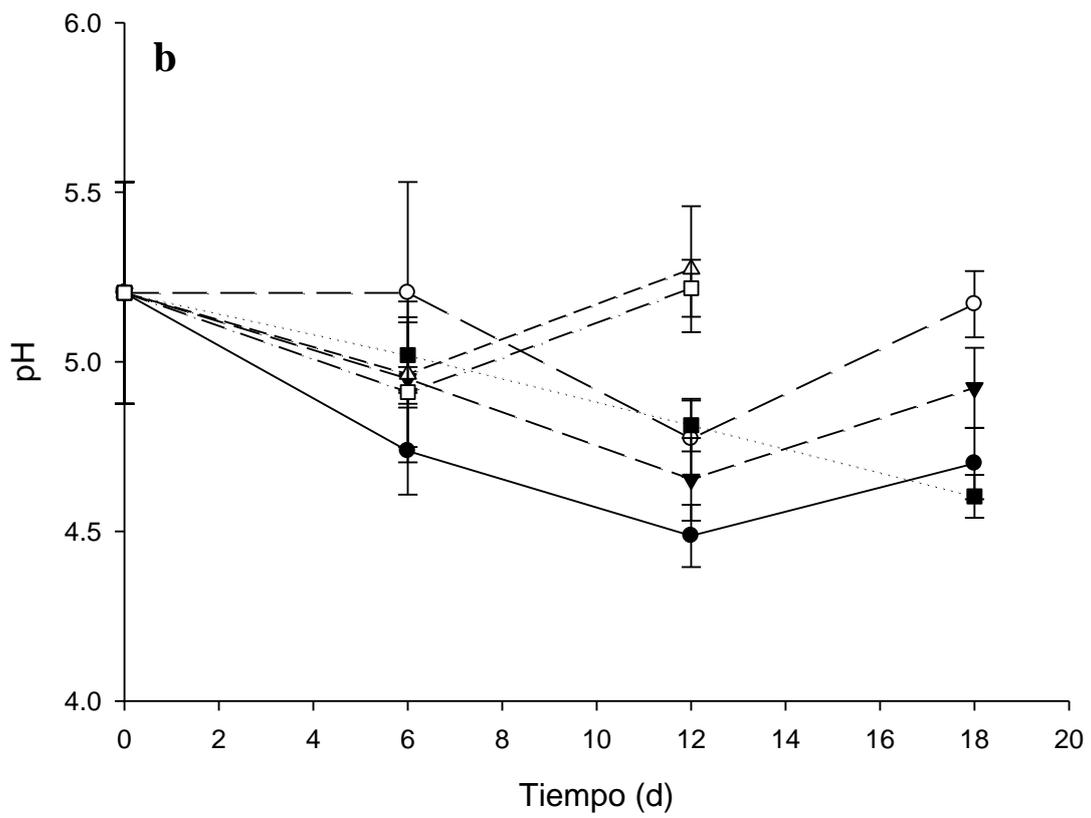
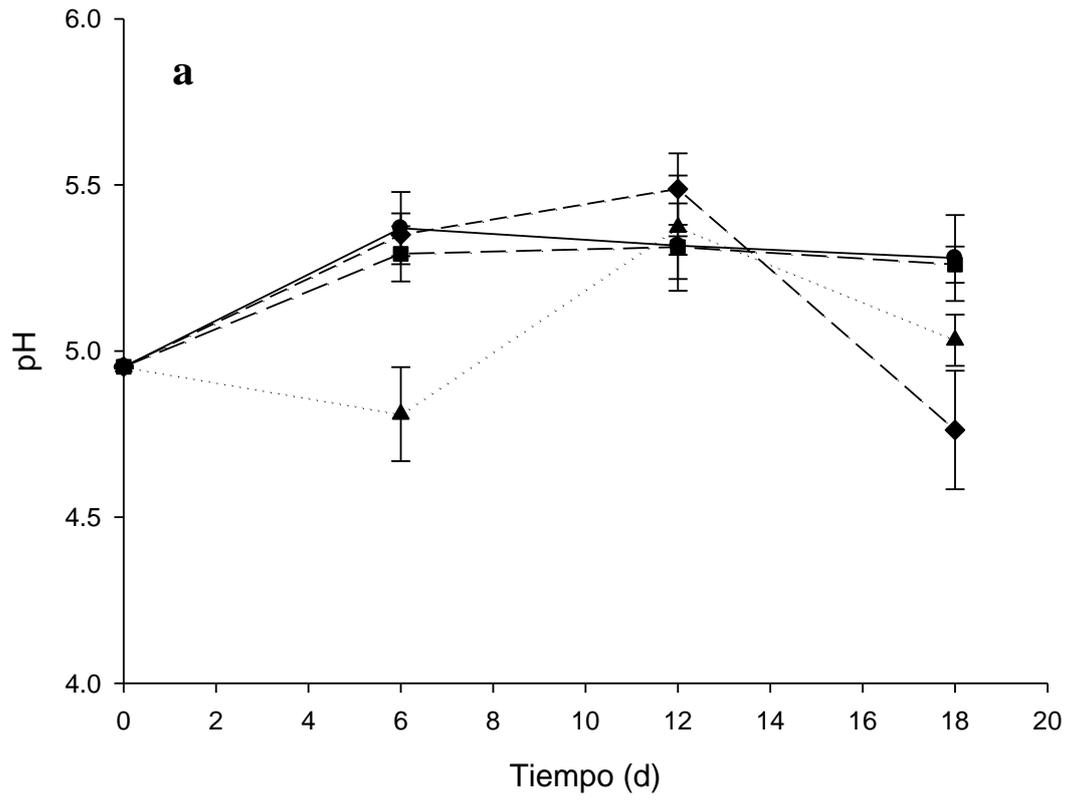
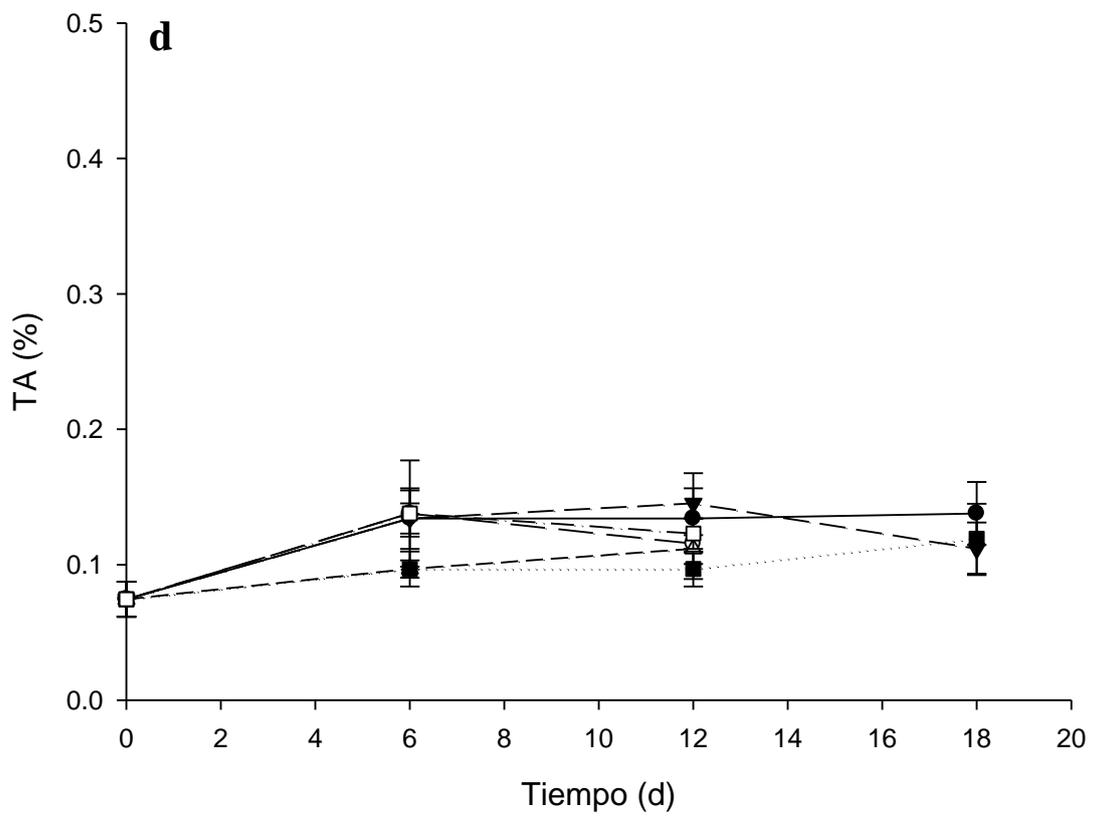
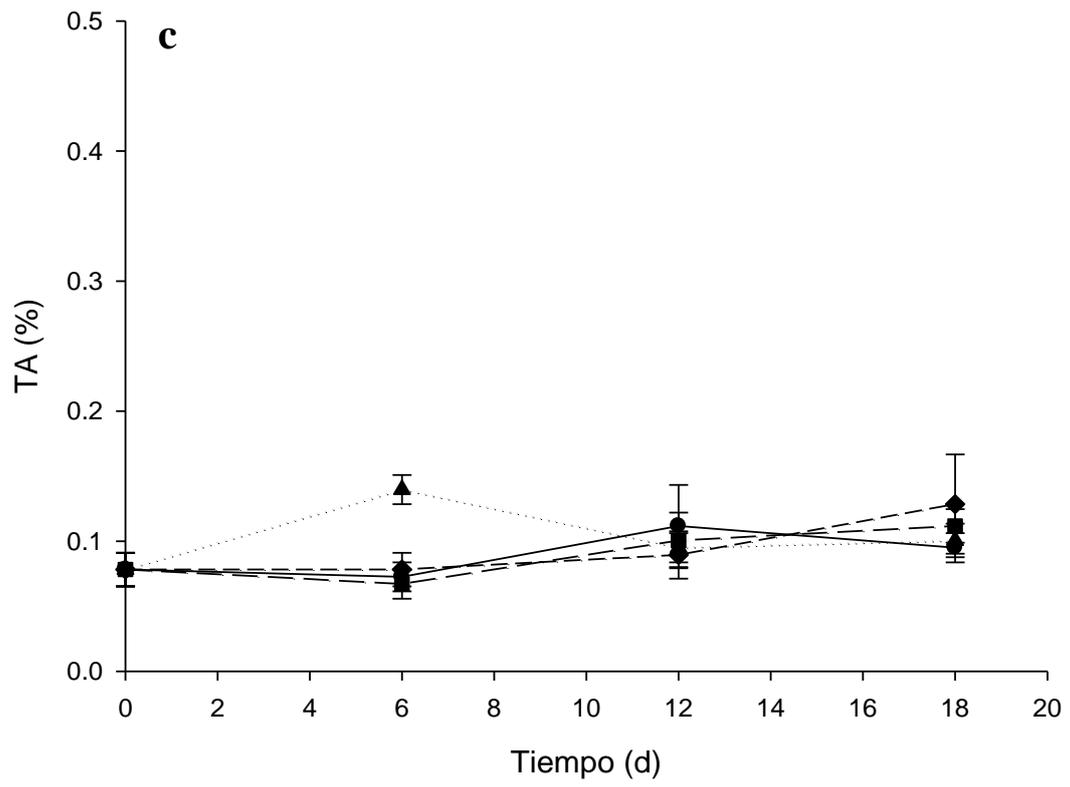


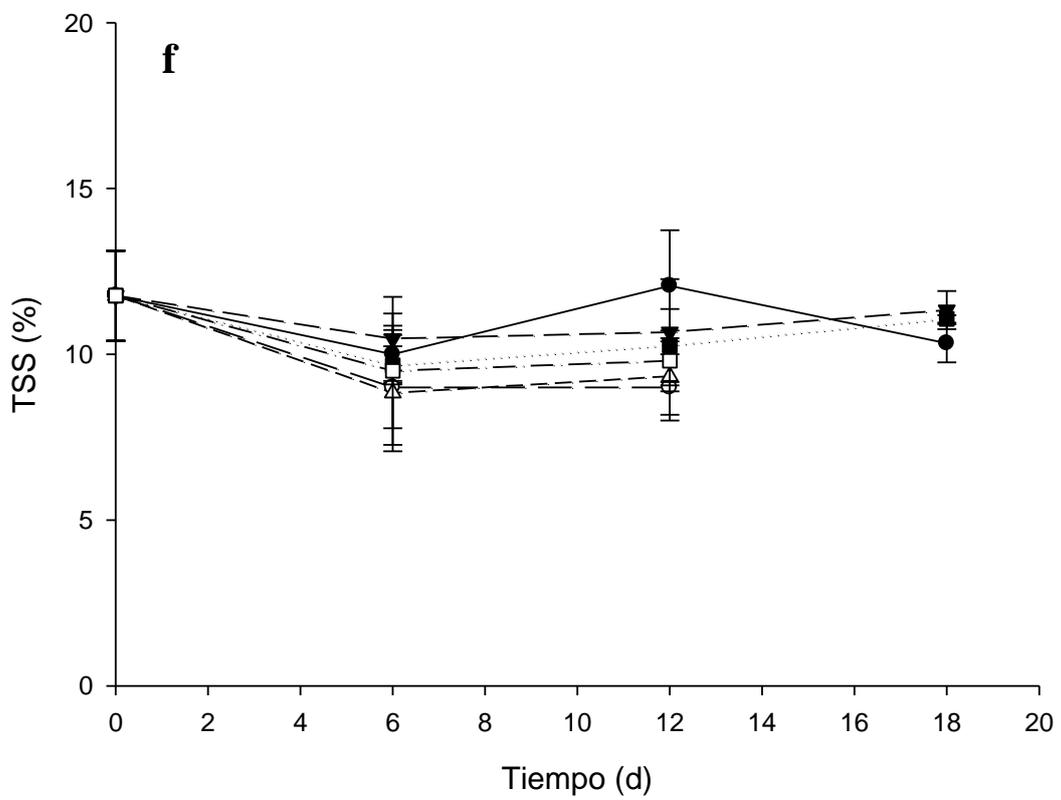
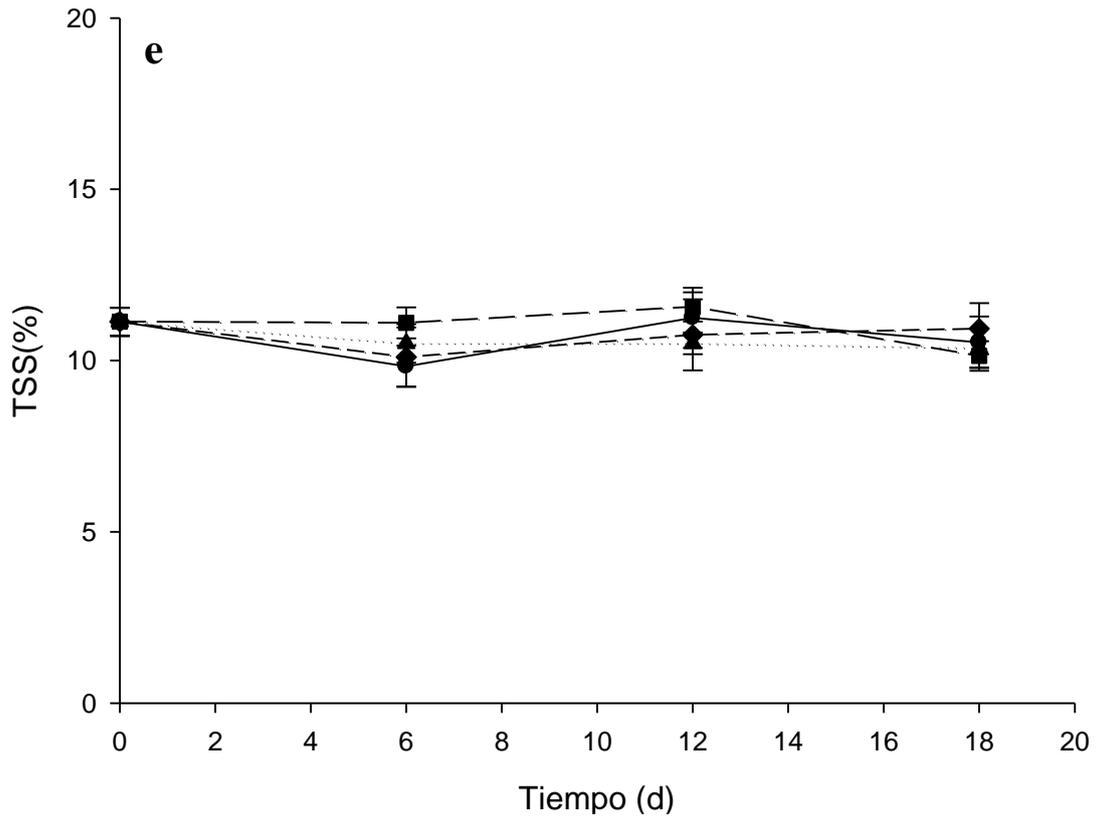
Figura 10. 30 Pérdida fisiológica de peso del Bioensayo 1 (a): Control (●), Cg (■), NF (◆), NNCg (▲) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\%$ HR y del bioensayo 2 (b): Control (● y ○), CS (▼ y ▽), Cg (■ y □) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  (viñetas negras) y  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  (viñetas blancas),  $80\pm 5\%$ HR. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

## II. pH, acidez total titulable y sólidos solubles totales

El pH, TA y TSS no mostraron diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en ninguno de los bioensayos ni temperaturas. El pH al igual que en los experimentos con las emulsiones clásicas se encontró entre 4.7-5.3 (Figura 10.31 a y b), los TSS entre 9.5- 12 °Brix (Figura 10.31 e y f); solo la TA se encontró entre 0.07-0.14 % (Figura 10.31 c y d) que resulta ser valores más bajos que los obtenidos, antes lo cual se puede atribuir al hecho de que ambos experimentos fueron cosechados en dos épocas distintas. El índice  $\text{TSS TA}^{-1}$  (Figura 10.31 g y h) que representa la relación entre el dulzor y la acidez de los frutos, tampoco mostró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ).







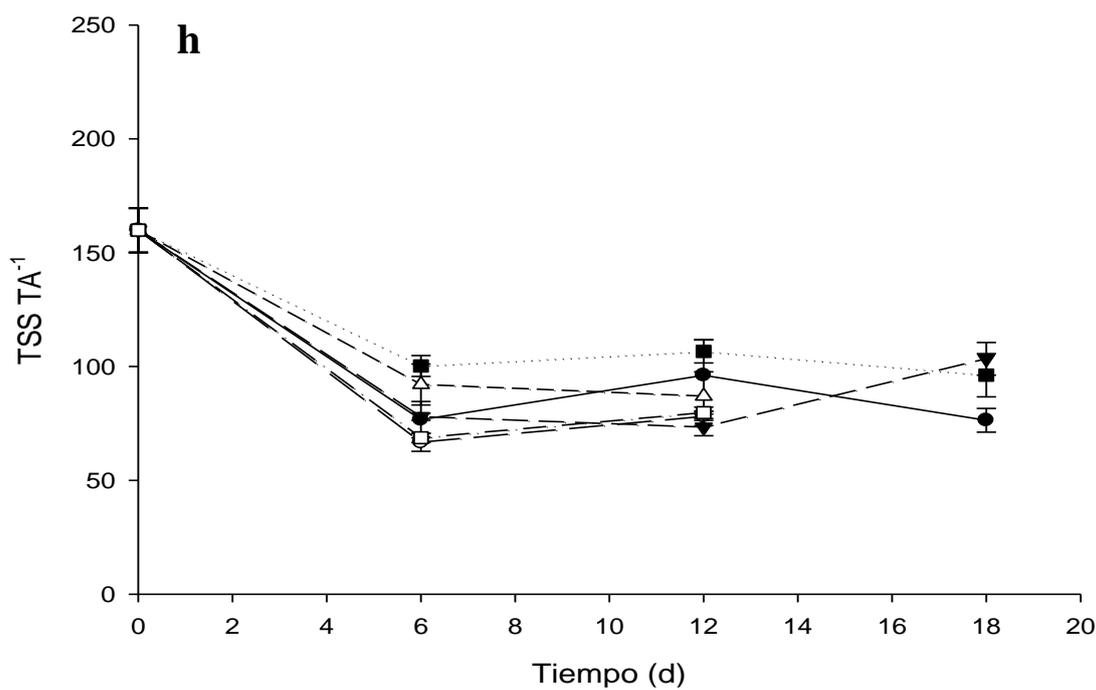
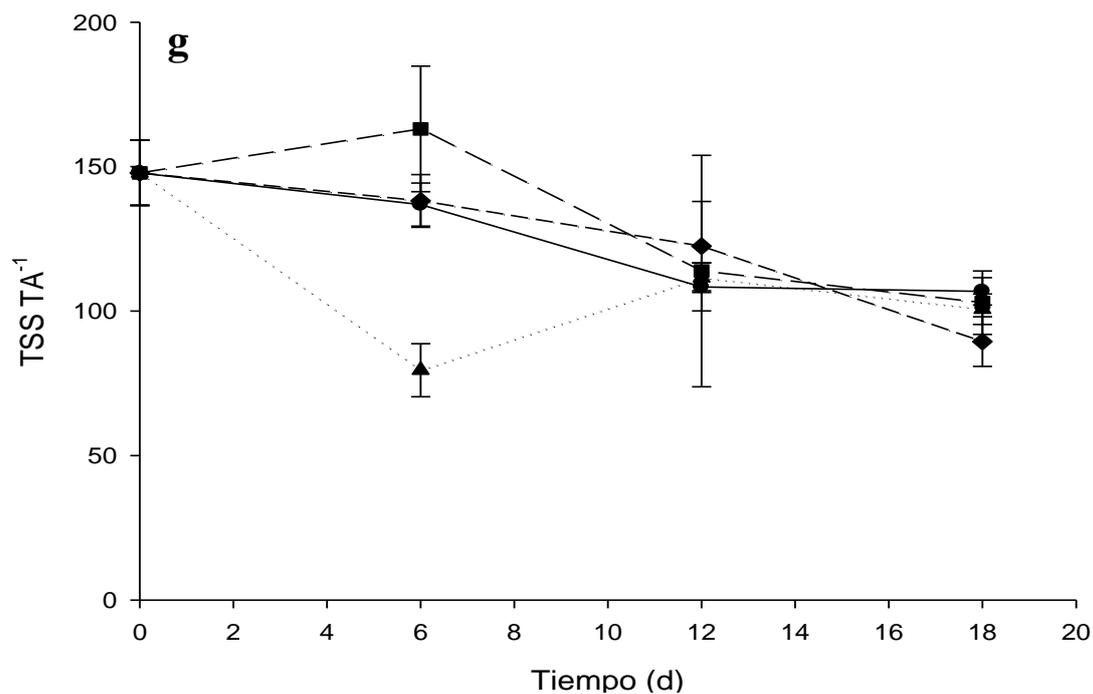


Figura 10. 31 pH (a), TA(c), TSS (e) y TSS TA<sup>-1</sup> (g) del bioensayo 1 (a): Control (●), Cg (■), NF (◆), NNCg (▲) a 10±2°C, 80±5%HR y pH (b), TA(d), TSS (f) y TSS TA<sup>-1</sup> (h) del bioensayo 2 (b): Control (● y ○), CS (▼ y ▽), Cg (■ y □) a 10±2°C (viñetas negras) y 25±3°C (viñetas blancas), 80±5%HR. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

### III. Determinación del ángulo de contacto

Al igual que en el experimento en el que se emplearon como recubrimiento las emulsiones clásicas, se observó que los recubrimientos mantuvieron el carácter hidrofílico. El control tuvo  $61.74 \pm 0.82^\circ$ ; pero al recubrir los frutos con CS y Cg, la hidrofiliidad de éstos se incrementó de manera significativa ( $57.49 \pm 0.79^\circ$  y  $53.71 \pm 0.94^\circ$  respectivamente) comparado con el grupo control; CSe mantuvo igual al bioensayo 3; en el caso de Cg este aumento se puede atribuir a la capacidad de absorber agua de HEMA que además proporcionó un mayor espesor del epicarpio y por ello no hubo migración de agua del interior del fruto hacia el medio ambiente, reduciendo así la pérdida de peso. NF y NNCg incrementaron ligeramente la hidrofobicidad ( $73.14 \pm 0.76^\circ$  y  $70.13 \pm 0.23^\circ$  respectivamente), debido quizá a la presencia de NF que por ser de CH son hidrofóbicos.

### IV. Firmeza

Como se mencionó anteriormente, se observa una disminución de esta característica de la pulpa proceso asociado con la senescencia de los frutos. En el bioensayo 1 se observó diferencia significativa entre los tratamientos ( $p < 0.05$ ), los frutos recubiertos lograron mantener su turgencia. En el bioensayo 2, en el que también se registró diferencia significativa en la temperatura de refrigeración los frutos recubiertos con Cg lograron mantener la turgencia a lo largo el almacenamiento. No hubo diferencia significativa ( $p > 0.5$ ) entre los tratamientos almacenados a temperatura ambiente.

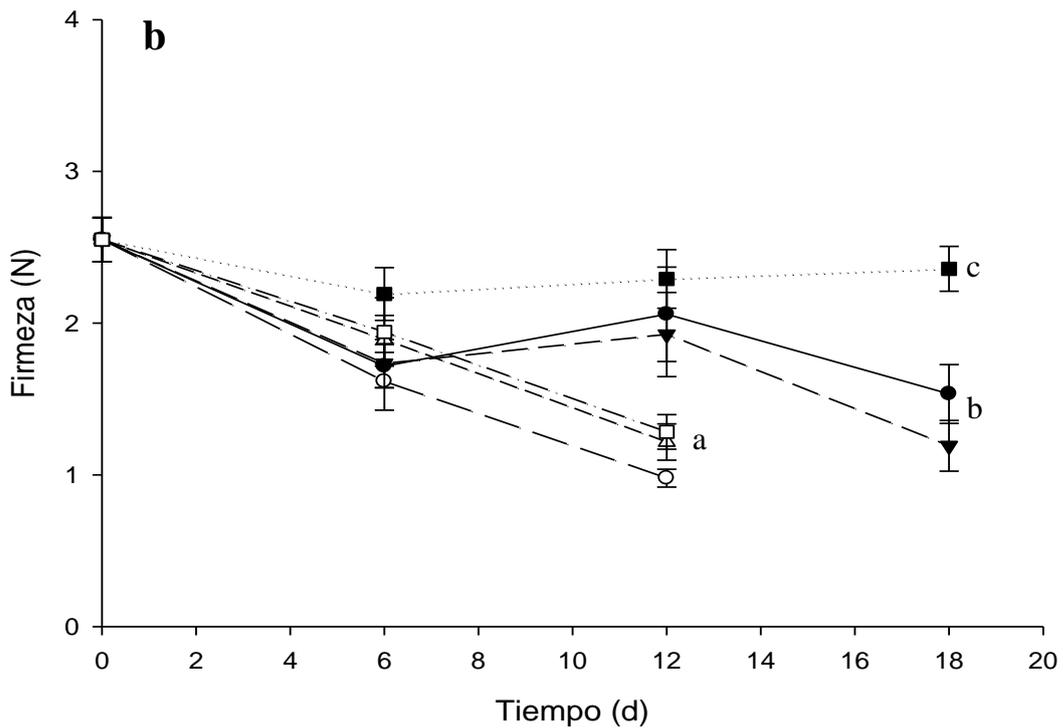
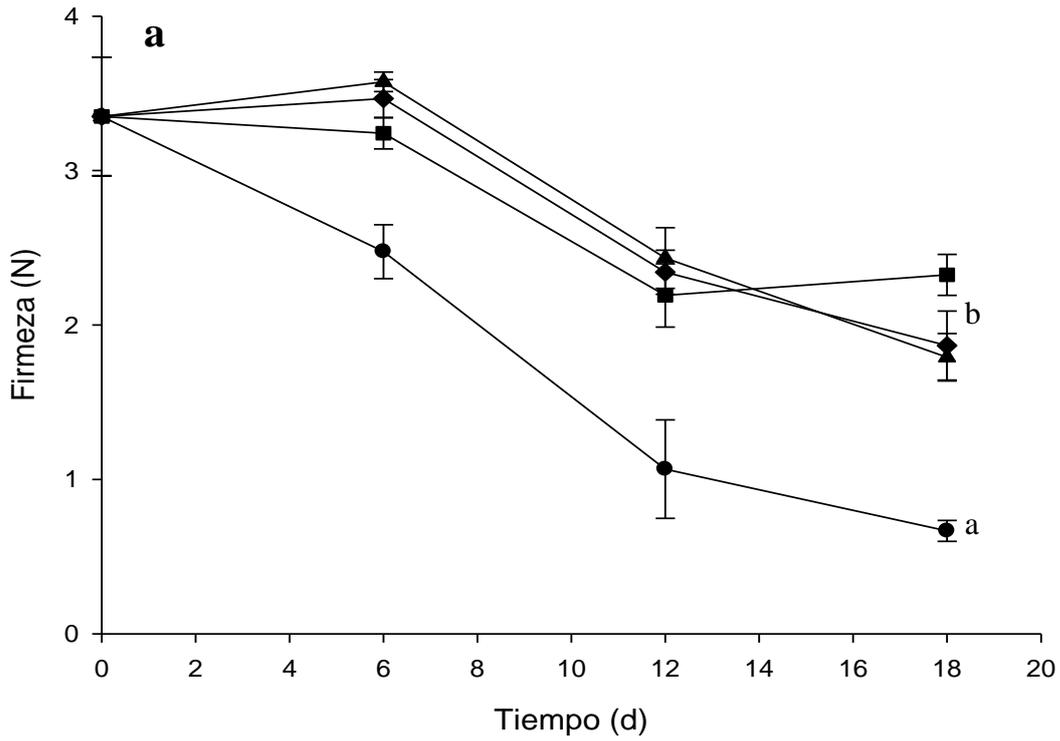
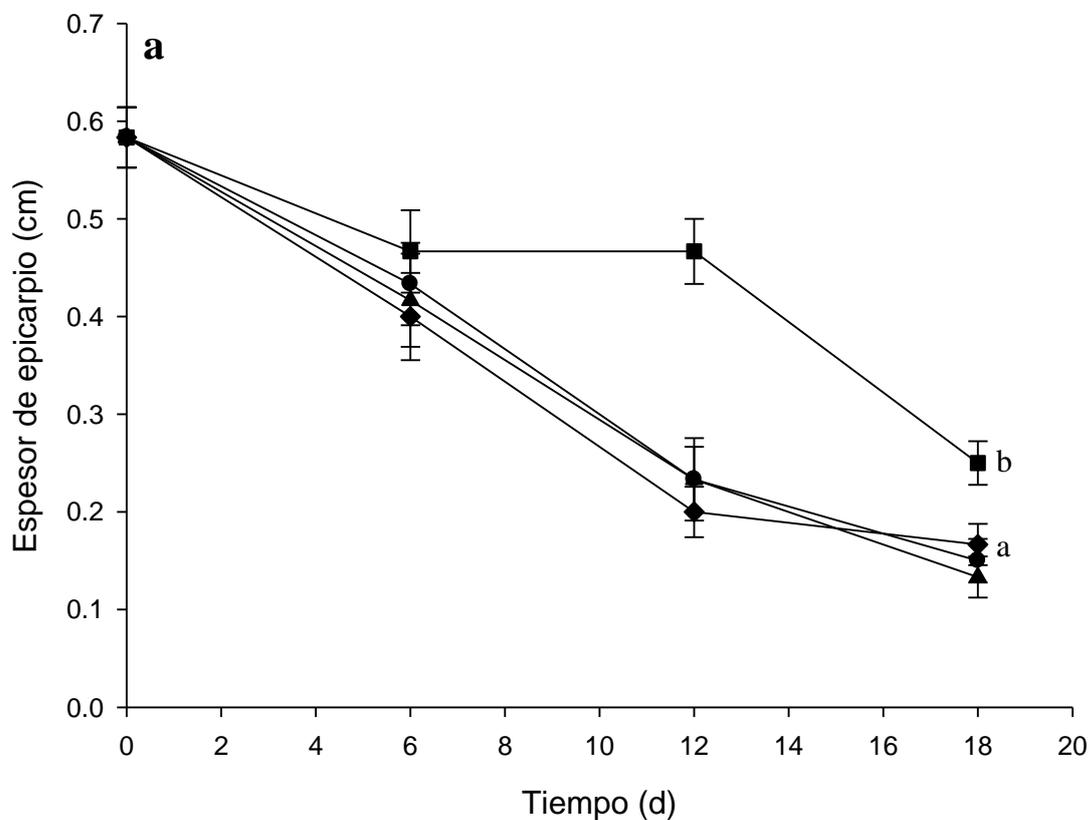


Figura 10. 32 Firmeza del bioensayo 1 (a): Control (●), Cg (■), NF (◆), NNCg (▲) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\% \text{HR}$  y del bioensayo 2 (b): Control (● y ○), CS (▼ y ▽), Cg (■ y □) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  (viñetas negras) y  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  (viñetas blancas),  $80\pm 5\% \text{HR}$ . Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

## V. Espesor del epicarpio

El espesor del epicarpio es importante dado que pues estos frutos, al ser no climatéricos, después de la cosecha comienza su periodo de senescencia por lo que el epicarpio comienza a deshidratarse y perder espesor; en la Figura 10.33 se observa que los frutos recubiertos con CS, NNCg, NF y los controles en temperatura de refrigeración disminuye este parámetro, pero son estadísticamente diferentes a Cg debido que este mantiene el grosor del epicarpio de los frutos debido a la baja permeabilidad de agua del fruto al medio ambiente como se mencionó en la Figura 10.33.



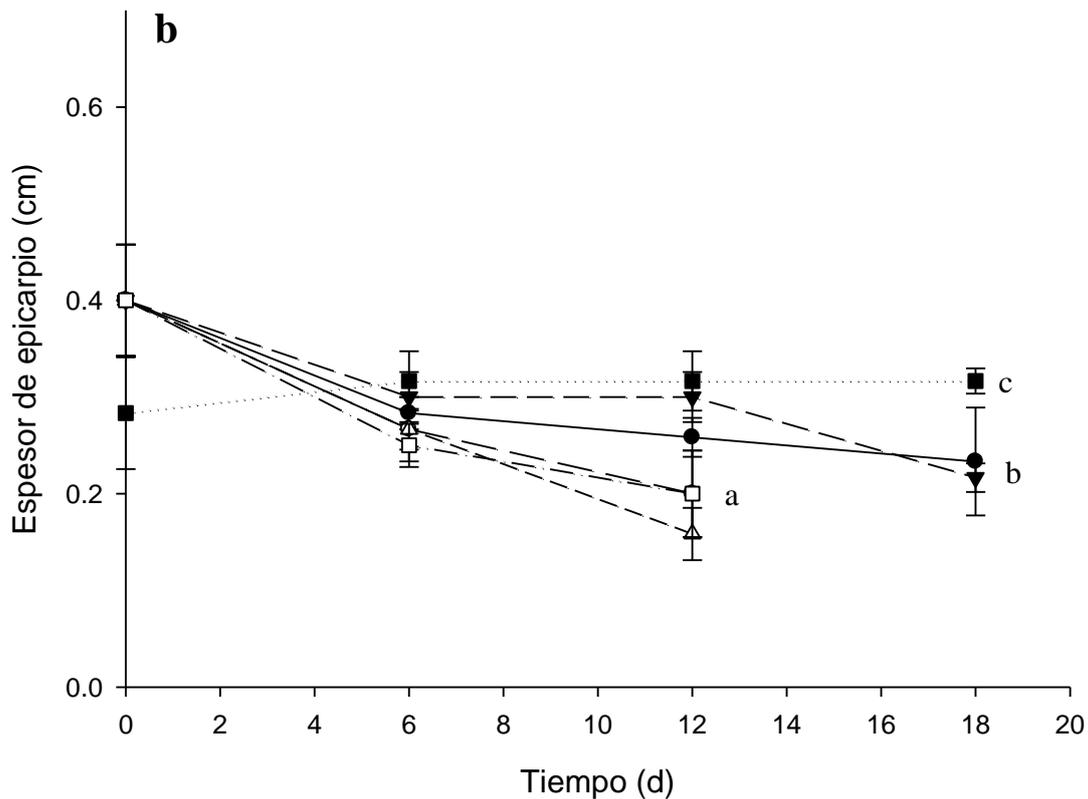


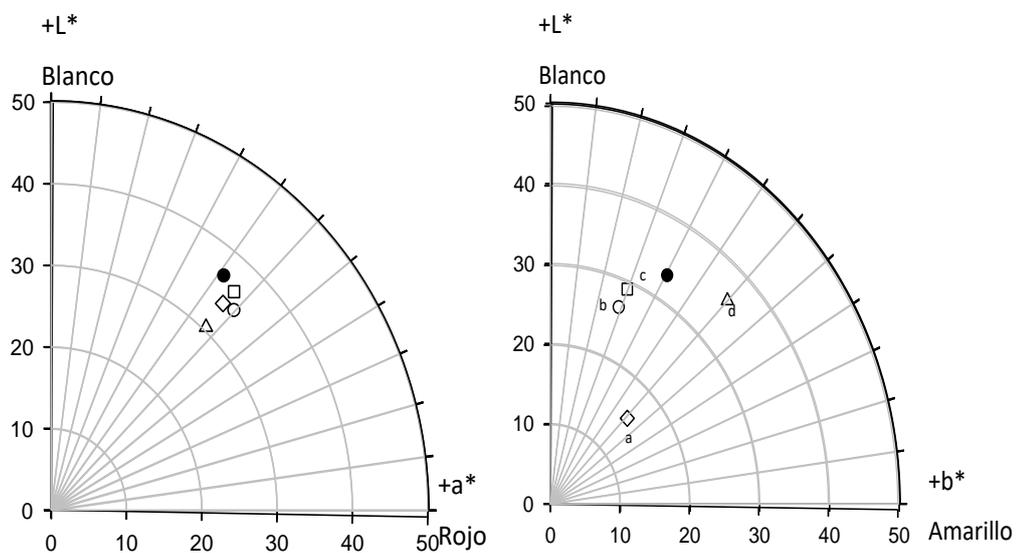
Figura 10. 33 Espesor del bioensayo 1 (a): Control (●), Cg (■), NF (◆), NNCg (▲) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\%$ HR y del bioensayo 2 (b): Control (● y ○), CS (▼ y ▽), Cg (■ y □) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  (viñetas negras) y  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  (viñetas blancas),  $80\pm 5\%$ HR. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*

## VI. Cambio de color

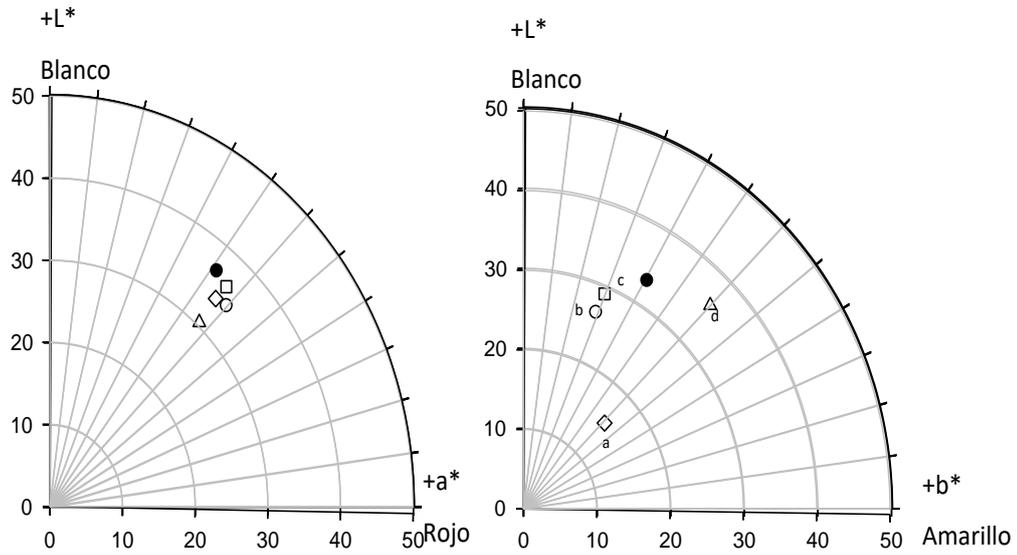
En el bioensayo 1 (Figura 10.34 a y b), tanto para el epicarpio y la pulpa no hubo diferencia significativa ( $p>0.5$ ) para las coloraciones rojas y lo mismo ocurrió el índice de enrojecimiento (RI) ( $p>0.5$ ). En cuanto a las tonalidades amarillas ( $p<0.5$ ) para ambas partes de la fruta el recubrimiento NNCg incremento este valor, mientras que CS logró mantener los valores iniciales; el epicarpio el mayor índice de amarillamiento (YI) fue con el recubrimiento Cg y el menor con NNCg. En la pulpa no hubo diferencias significativas ( $p>0.5$ ). El índice de luminosidad solo mostro diferencia significativa para el epicarpio, siendo el mayor valor con el de NNCg y el menor con Cg.

En el bioensayo 2 (Figura 10.34 c-f), se observó que el epicarpio en temperatura de refrigeración el epicarpio recubierto con Cg presentó las mayores tonalidades rojas y amarillas de todos los tratamientos, lo que concuerda con los índices YI y RI, que con este recubrimiento tuvieron mayor valor y conservaron los colores con respecto al control y a CS; al final del almacenamiento, este recubrimiento tuvo un mayor WI que los demás tratamientos. En temperatura ambiente los rojos se mantuvieron en el epicarpio en el control seguido de frutos recubiertos con CS; pero en los amarillos Cg y CS lograron los mayores valores, estos corroborados por RI y YI, WI en los que no se detectaron diferencias significativas ( $p>0.5$ ). La pulpa no presentó diferencias significativas ( $p>0.5$ ) en ninguno de los experimentos de color.

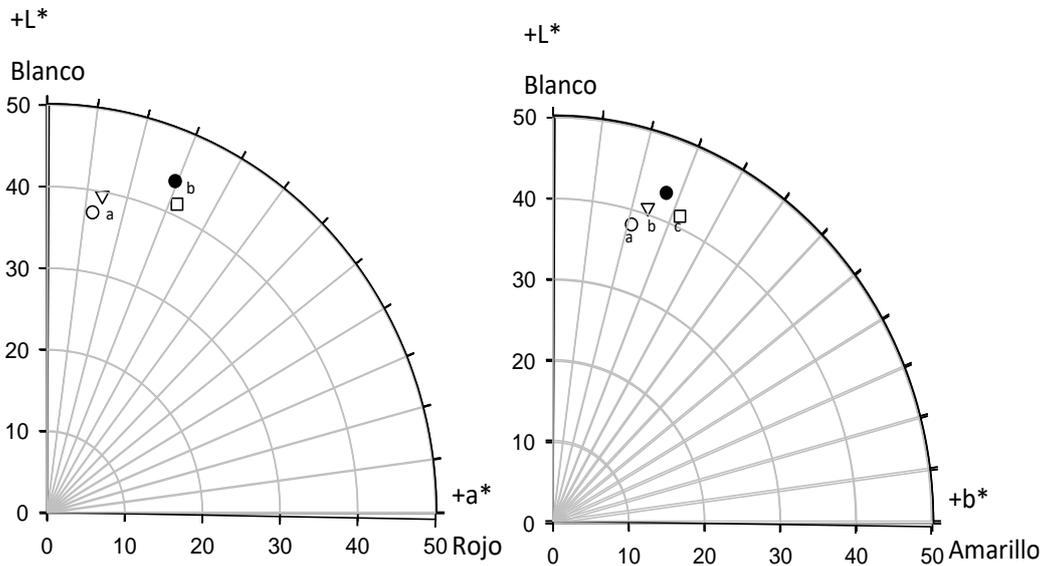
a) Color en epicarpio Bioensayo 1



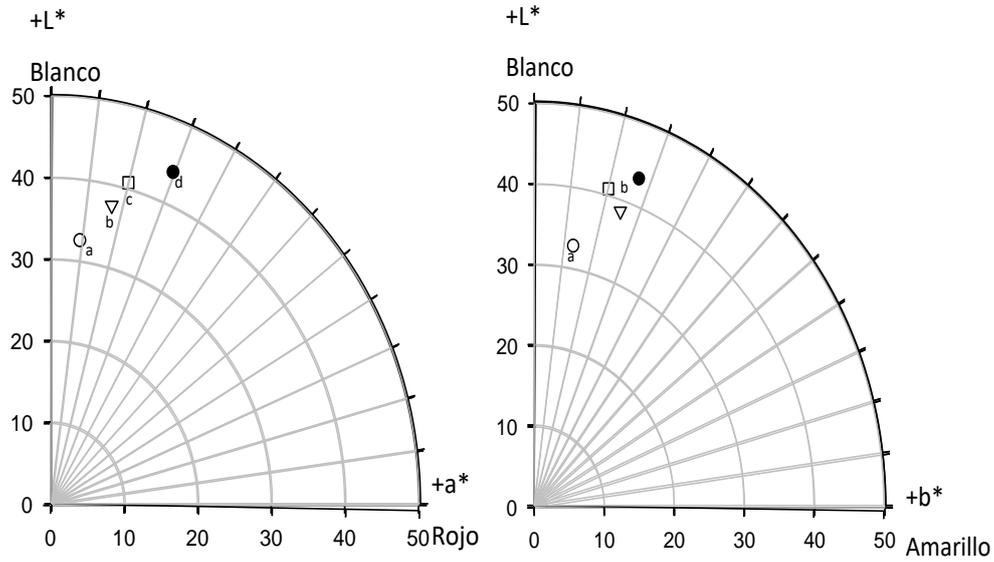
b) Color en pulpa Bioensayo 1



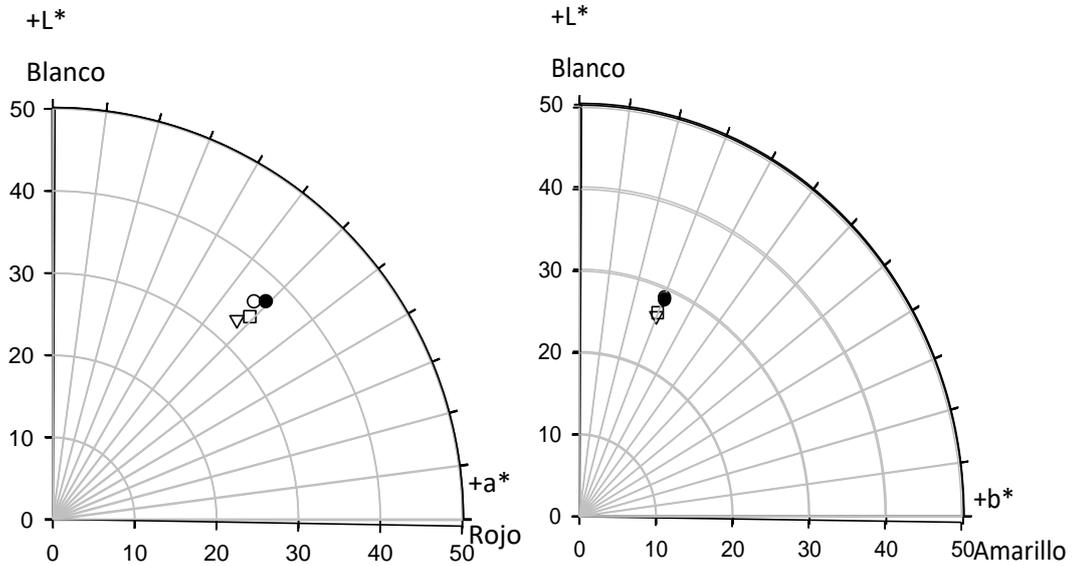
c) Color en epicarpio Bioensayo 2 en temperatura refrigeración



d) Color en epicarpio Bioensayo 2 en temperatura ambiente



e) Color en pulpa Bioensayo 2 en temperatura refrigeración



f) Color en pulpa Bioensayo 2 en temperatura ambiente

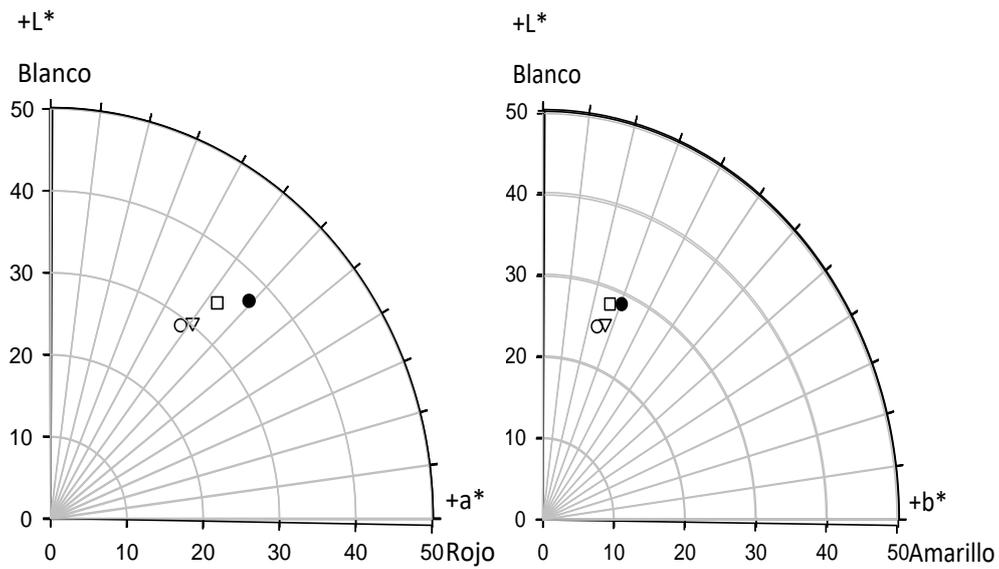


Figura 10. 34 Cambios de color el epicarpio y pulpa en temperatura de refrigeración y ambiente de bioensayo 1 y 2: Control (●) al inicio (0d); Control (○), CS (∇) Cg (□), NF (◇), NNCg (△) al final del bioensayo (18d para 10±2°C y 9d para 25±3°C). Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.

Tabla 10. 10 Índices de color de epicarpio y pulpa

Índices de Color en epicarpio										
Tratamientos	Tiempo	Bioensayo 1			Bioensayo 2			Bioensayo 2		
		10±2°C			10±2°C			25±3°C		
		WI	RI	YI	WI	RI	YI	WI	RI	YI
Control	Ti	65.4±0.6c	1.1±0.08	43.02±0.6c	63.9±0.1 a	1.2±0.5 b	51.9±2.8 a	63.9±0.6	1.2±0.5 b	51.9±2.7 b
	Tf	63.6±0.2b	0.5±1.6	33.5±1.1b	64.4±0.4 a	0.5±0.05 a	40.4±1.5 b	63.0±0.6	0.7±0.2 a	24.8±1.4 a
CS	Tf	-	-	-	62.9±0.3 a	0.5±0.05 a	45.9±1.3 b	65.1±0.7	0.7±0.3 a	48.1±1.9 b
Cg	Tf	61.8±0.07a	0.4±0.07	51.2±2.2d	66.2±0.2 b	1.1±0.03 b	57.6±1.6 a	63.3±2	0.7±0.09 a	51.2±2.6 b
NF	Tf	66.2±0.4c	0.6±0.05	39.7±1.2c						
NNCg	Tf	69.0±0.07d	1.1±0.07	18.9±1.6a						

Índices de Color en pulpa										
Tratamientos	Tiempo	Bioensayo 1			Bioensayo 2			Bioensayo 2		
		10±2°C			10±2°C			25±3°C		
		WI	RI	YI	WI	RI	YI	WI	RI	YI
Control	Ti	77.1±0.7	1.3±0.03	84.5±6.1	79.0±0.2	2.3±0.04	59.6±2.6	79.0±0.04 b	2.3±0.04	59.6±2.6
	Tf	80.1±0.3	2.5±0.07	56.9±3.0	78.5±0.3	2.3±0.06	59.3±3.0	78.9±0.3 b	2.2±0.05	46.4±2.5
CS	Tf	-	-	-	80.0±0.5	2.4±0.1	56.3±4.2	78.9±0.4 b	2.1±0.04	51.9±2.6
Cg	Tf	79.2±0.4	2.3±0.06	57.2±3.7	79.9±0.4	2.4±0.07	58.2±3.5	77.5±0.2 a	2.3±0.05	50.9±2.1
NF	Tf	78.9±0.3	2.3±0.06	59.9±2.6						
NNCg	Tf	80.9±1.1	2.4±0.06	64.8±11.4						

Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.  
Ti es 0d y Tf es 18d para 10±2°C y 9d para 25±3°C.

## VII. Determinación de betalaínas totales, compuestos fenólicos y ácido ascórbico

Como se mencionó anteriormente la presencia de las betaninas y betaxantinas son las responsables de dar las coloraciones rojas y amarillas a la fruta, además de conferirles propiedades antioxidantes. Por esta razón en ambos bioensayos realizados en temperatura de refrigeración los epicarpios de frutos recubiertos con Cg resultaron tener la mayor cantidad de estos compuestos y por ende de betalaínas totales; estos resultados eran los esperados dado que Cg tuvo mayores RI e YI, existen variaciones en las concentraciones de las betalaínas atribuibles al tiempo de cosecha. Con Cg se obtuvo mayor la concentración de compuestos fenólicos en el bioensayo 1 pero no mostró diferencias significativas ( $p>0.5$ ) en el bioensayo 2. Ninguno de los frutos recubiertos logro ser mejor que el control al final del almacenamiento en diferentes temperaturas, pero, con ambos recubrimientos se obtuvo la mayor cantidad de compuestos fenólicos.

Cabe mencionar que el color está determinado por la combinación de ambos tipos de pigmento por lo que no se observaron diferencias significativas, aunque sí las hubo en la concentración de pigmentos ( $p<0.5$ ), obteniendo que con Cg se obtuvo la mayor concentración de betaninas, betaxantinas, betalaínas totales y ácido ascórbico en temperatura de refrigeración; en temperatura ambiente solo Cg logró preservar las concentraciones de betaxantinas y ácido ascórbico. Cabe mencionar que al preservar la fruta con Cg después del almacenamiento, puede proveer entre el 25-50% de la ingesta diaria recomendada de ácido ascórbico; la variación de este porcentaje con respecto a los experimentos reportados anteriormente, se atribuye a que fueron cosechados en diferentes años, por lo tanto, las condiciones de crecimiento pudieron variar.

Tabla 10. 11 Resumen de betaninas, betaxantinas, betalaínas totales, compuestos fenólicos y ácido ascórbico en epicarpio y pulpa de pitaya.

Determinaciones en epicarpio													
Tratamientos	Tiempo	Bioensayo 1				Bioensayo 2				Bioensayo 2			
		10±2°C				10±2°C				25±3°C			
		Betaninas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betaxantinas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betalaínas totales (mg Kg <sup>-1</sup> )	Compuestos fenólicos (mg EAG Kg <sup>-1</sup> )	Betaninas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betaxantinas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betalaínas totales (mg Kg <sup>-1</sup> )	Compuestos fenólicos (mg EAG Kg <sup>-1</sup> )	Betaninas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betaxantinas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betalaínas totales (mg Kg <sup>-1</sup> )	Compuestos fenólicos (mg EAG Kg <sup>-1</sup> )
Control	Ti	53.4±7.1 c	45.7±0.2 a	118.1±6.3 a	895.5±48.1 c	53.4±7.7 c	45.7±0.2 c	99.2±6.9 d	895.5±48.1	53.4±7.7 b	45.7±0.5 d	99.2±6.9 b	895.5±48.1 a
	Tf	33.1±1.5 a	85.0±6.3 b	118.1±6.3 a	722.5±29.1 b	28.4±2.3 a	24.9±1.2 a	53.3±3.6 a	877.3±36.6	49.6±9.2 a	24.2±2.3 a	73.8±10.3 a	966.8±125.1 a
CS	Tf	-	-	-	-	32.7±3.7 b	34.9±3.4 b	67.7±6.6 b	901.0±61.9	36.3±6.0 a	42.6±1.2 c	79.0±5.0 a	1373.4±193.2 b
Cg	Tf	56.8±2.1 c	128.2±13.5 c	185.6±14.1 b	1307.6±92.7 d	45.6±4.6 c	38.7±0.9 b	84.3±5.0 c	907.0±42.6	33.6±1.9 a	35.5±3.7 b	69.3±5.4 a	1301.2±142.0 b
NF	Tf	36.5±5.2 b	75.2±4.6 b	111.8±9.0 a	810.1±46.3 c								
NNCg	Tf	36.2±4.8 b	89.4±10.5 b	125.74±2.1 a	516.1±58.8 a								

Continuación...

<b>Determinaciones en pulpa</b>						
<b>Tratamientos</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Bioensayo 1</b>				
		<b>10±2°C</b>				
		<b>Betaninas (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Betaxantinas (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Betalainas totales (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Compuestos fenólicos (mg EAG Kg<sup>-1</sup>)</b>	<b>Ácido ascórbico (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>
Control	Ti	230.2±3.0 a	437.7±2.4 d	667.9±3.9 c	502.1±45.7	0.32±0.001 c
	Tf	214.6±2.4 a	256.3±18.5 a	481.03±16.4 a	481.8±54.8	0.22±0.03 a
Cg	Tf	213.9±1.6 b	450.2±2.6 c	664.2±20.0 c	453.1±62.7	0.31±0.01 b
NF	Tf	230.6±11 b	386.8±8.6 b	617.4±2.7 b	409.8±40.7	0.13±0.009 c
NNCg	Tf	222.1±4.3 b	374.2±6.4 b	596.4±8.7 b	434.1±67.8	0.13±0.006 c

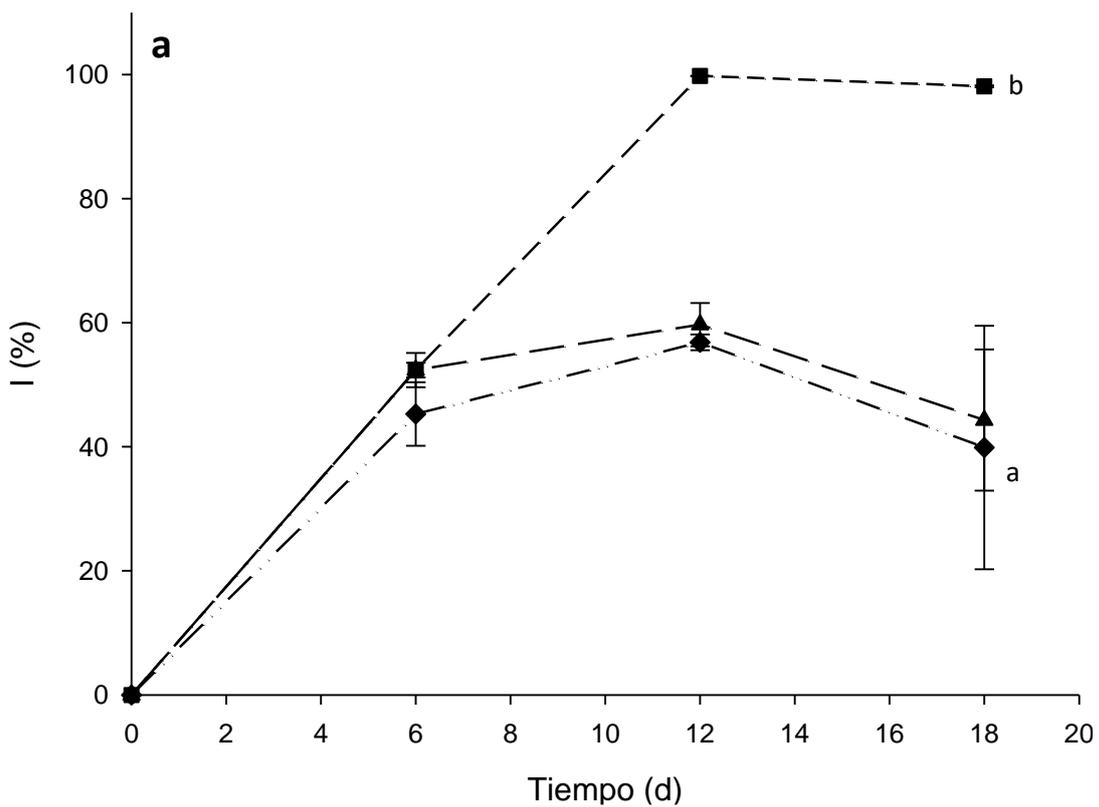
Continuación...

Determinaciones en pulpa											
Tratamientos	Tiempo	Bioensayo 2					Bioensayo 2				
		10±2°C					25±3°C				
		Betaninas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betaxantinas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betalainas totales (mg Kg <sup>-1</sup> )	Compuestos fenólicos (mg EAG Kg <sup>-1</sup> )	Ácido ascórbico (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betaninas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betaxantinas (mg Kg <sup>-1</sup> )	Betalainas totales (mg Kg <sup>-1</sup> )	Compuestos fenólicos (mg EAG Kg <sup>-1</sup> )	Ácido ascórbico (mg Kg <sup>-1</sup> )
Control	Ti	115.1±1.5 a	218.8±1.2	333.9±3.9	523.9±44.9 b	0.16±0.02 c	115.1±1.5	218.8±1.2 b	333.9±1.9	502.1±91.4	0.17±0.008 b
	Tf	117.4±3.2 a	224.9±13.5	379.5±19.0	354.7±15.6 a	0.07±0.02 a	117.4±32.2	119.8±11.9 a	379.5±19.0	453.2±80.0	0.10±0.01 a
CS	Tf	130±3.8 b	215.8±18.8	367.6±29.4	378.5±40.3 a	0.11±0.01 b	130.3±19.1	204.9±5.8 b	367.6±29.4	261.0±33.9	0.09±0.01 a
Cg	Tf	138.3±0.9 c	249.9±12.8	388.5±18.4	491.5±49.5 b	0.16±0.001 c	138.6±5.9	185.2±22.0 b	388.5±18.7	351.3±126.3	0.15±0.01 b

Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*.  
Ti es 0d y Tf es 18d para 10±2°C y 9d para 25±3°C.

### VIII. Porcentaje de inhibición por cuenta en placa de hongos

Se observó que en ambos bioensayos realizados en temperatura de refrigeración los frutos recubiertos con Cg tuvieron el mayor efecto antifúngico, con un porcentaje de inhibición de  $98.1 \pm 0.15$  y  $98.2 \pm 0.12$ . Mientras que C tuvo un  $80.3 \pm 4.3\%$ , lo cual concuerda con los resultados antes obtenidos quizá se deba a la presencia de grupos amino que le dan el carácter antimicrobiano. En cuanto al uso de la temperatura ambiente después de 9 d de almacenamiento los frutos recubiertos con Cg tuvieron menor efecto antifúngico que el CS. Los frutos recubiertos con N y NNCg tuvieron un efecto de solo el  $39.8 \pm 9.6$  y  $44.3 \pm 11.3$  respectivamente, posiblemente por la presencia de la CT que al estar acetilada no tuvo efecto antimicrobiano (Figura 10.35).



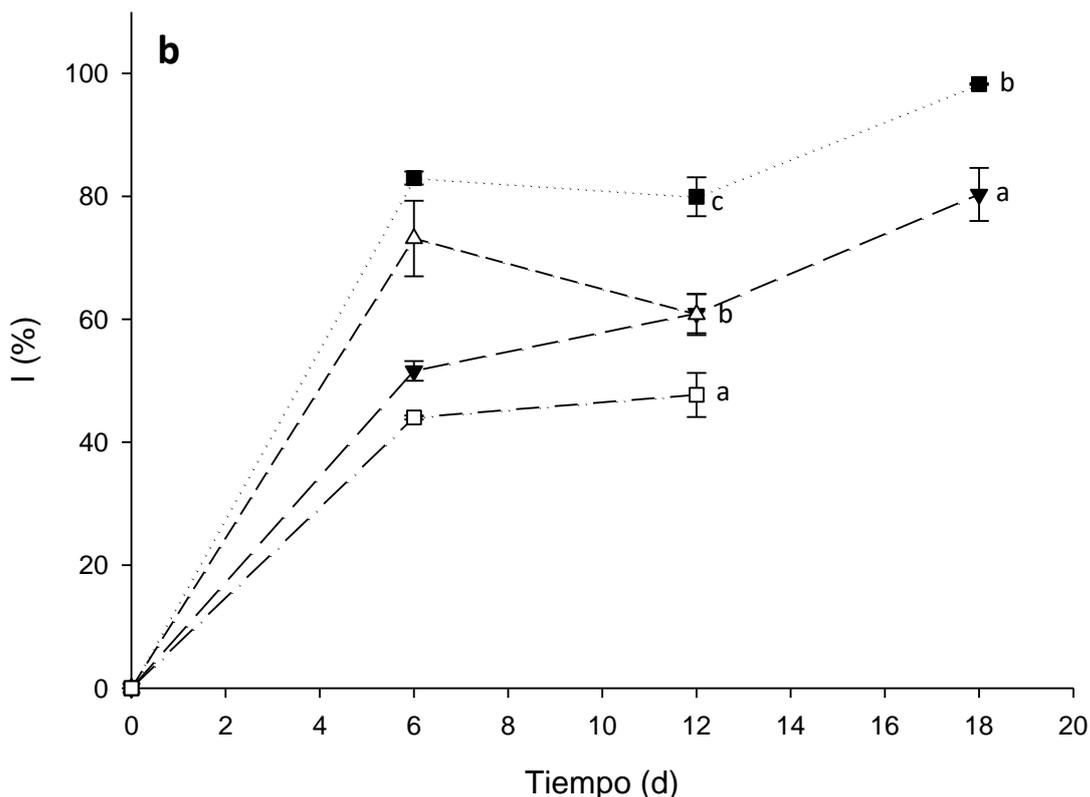


Figura 10.35 Porcentaje de inhibición. Bioensayo 1 (a): Cg (■), NF (◆), NNCg (▲) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\%$ HR y del bioensayo 2 (b): CS (▼ y ▽), Cg (■ y □) a  $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  (viñetas negras) y  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$  (viñetas blancas),  $80\pm 5\%$ HR. Las letras representan la comparación de medias de grupos formados por la prueba de *Fisher's LSD*

## IX. Microscopía electrónica de barrido

Este caso al igual que la SEM anterior se observó que la cera en la fruta que le da resistencia y brillo (Figura 10.36 a), tal como lo reportó Martínez-Castellanos (2009) los recubrimientos de CS se observan lisos y uniformes (Figura 10.36 c), mientras que Cg se observa como un recubrimiento homogéneo y de mayor grosor, lo que concuerda con lo observado en el experimento de espesor y que se atribuyó a la presencia del HEMA y su capacidad para formar geles que también ayudó a evitar la pérdida de agua. Ahora bien, comparado con el recubrimiento NCH, que resultó ser el mejor tratamiento de la etapa 2 (Figura 10.20e), el Cg resulta ser mas homogéneo a pesar de la hidrofobicidad propia de la cera natural. Al final del bioensayo, CS (Figura 10.36 d) y Cg (Figura 10.36 f)

mostraron aglomeraciones, al igual que el bioensayo de la etapa 2 lo hizo NCH (Figura 10.20j), debidas probablemente a la hidrofiliidad de CS sea entrecruzado con HPMC o injertado con HEMA. A pesar del almacenamiento los frutos no mostraron cambios significativos.

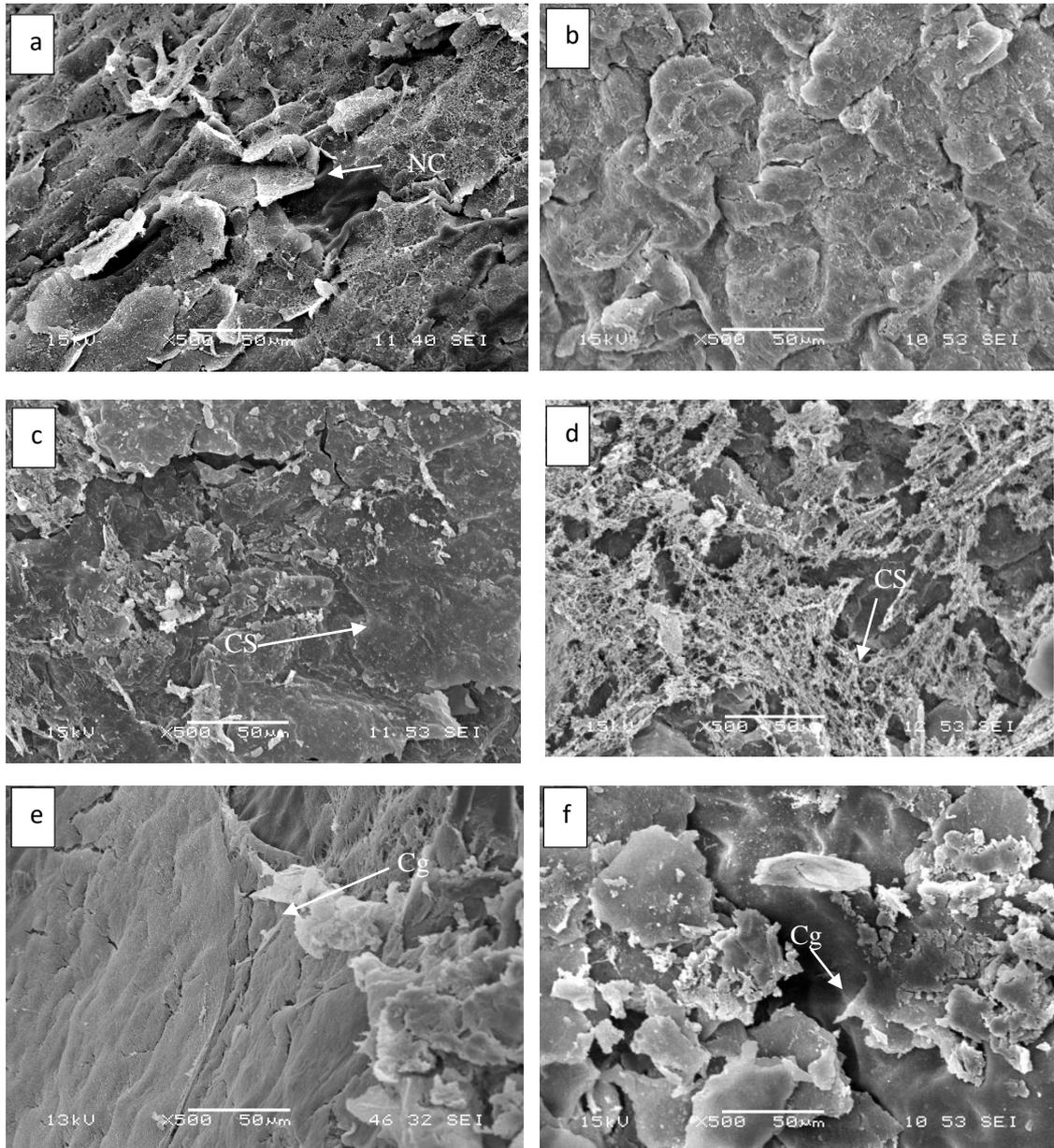


Figura 10. 36 Micrografías por SEM de recubrimientos al tiempo inicial y después de 18 d de almacenamiento, control (a y b), CS (c y d), Cg (e y f), respectivamente.

## 11 CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que el HNM tiene una potente actividad antibacteriana contra diversas cepas patógenas al ser humano, evitando que el proceso de división celular se complete. Las pruebas realizadas en cultivos de linfocitos de sangre periférica humana mostraron que sobreviven a la presencia del extracto, su actividad mitocondrial se conserva pero no así la lisosomal. Por estas razones, esta investigación ofrece nuevas evidencias para el uso de NM en la industria alimenticia.

De la etapa dos, se concluye que el recubrimiento NCH junto con la baja temperatura y alta HR retrasó el proceso de senescencia, conservando el color de las pitayas durante 15 d. Este recubrimiento liberó la azadiractina del NM, lo que influye positivamente en la disminución de la pérdida de peso y de la contaminación por hongos durante el almacenamiento postcosecha.

La aplicación de CT en forma de nanofibrilla provee de sólidos a escala nanométrica que pueden emplearse para sustituir tensoactivos en emulsiones tipo Pickering.

Se propone la mezcla de quitosano injertado con HEMA (Cg) como matriz de encapsulamiento para diferentes tipos de NF ya que pueden preservar sus compuestos activos que pueden ser aplicados en diferentes pH para obtener una emulsión estable. A pesar de estas propiedades, al ser aplicado como recubrimiento en fruta no logró retrasar la senescencia de los frutos. En cambio, la matriz con solo Cg preservó la calidad de consumo por 18d a  $10 \pm 2^\circ\text{C}$  y  $80 \pm 5\%$ .

## 12 PERSPECTIVAS

- 1) Evaluar el costo-beneficio de la aplicación de los recubrimientos a mayor escala.
- 2) Continuar mejorando la calidad del recubrimiento para conservar el fruto y quizás, prolongar más aún su tiempo de vida.
- 3) Conocer con profundidad la fisiología poscosecha de la pitaya para poder pensar en la mejor manera de preservarla y de explotar el recurso racionalmente.

## 13 PUBLICACIONES

Hernández-Valencia C.G.; Shirai K.; Mejía P.; Blanco S.; Román A.; Yáñez L.; Escalona H. Post-harvest Preservation of Cactus Fruits Produced in Semidesertic Areas of Oaxaca by Biopolymer Coatings. *The International Journal of Interdisciplinary Social Sciences: Annu. Rev.* **2016**, 11, 15–26, doi:10.18848/1833-1882/CGP/15-26.

Hernández-Valencia, C., Román-Guerrero, A., Aguilar-Santamaría, Á., Cira, L., & Shirai, K. Cross-Linking Chitosan into Hydroxypropylmethylcellulose for the Preparation of Neem Oil Coating for Postharvest Storage of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*). *Molecules*, **2019**, 24(2), doi:10.3390/molecules24020219.

Article

# Cross-Linking Chitosan into Hydroxypropylmethylcellulose for the Preparation of Neem Oil Coating for Postharvest Storage of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*)

Carmen G. Hernández-Valencia <sup>1</sup>, Angélica Román-Guerrero <sup>1</sup> , Ángeles Aguilar-Santamaría <sup>1</sup>, Luis Cira <sup>2</sup>  and Keiko Shirai <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Biopolymers and Pilot Plant of Bioprocessing of Agro-Industrial and Food By-Products, Biotechnology Department, Universidad Autonoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, Iztapalapa, 09340 Mexico City, Mexico; em.carmenhdz@gmail.com (C.G.H.-V.); arogue@xanum.uam.mx (A.R.-G.); maas@xanum.uam.mx (Á.A.-S.)

<sup>2</sup> Biotechnology and Food Science Department, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de febrero No. 818 sur, 85000 Obregon City, Sonora, Mexico; luis.cira@itson.edu.mx

\* Correspondence: smk@xanum.uam.mx; Tel.: +52-558-044921; Fax: +52-558-044712

Academic Editor: Massimiliano Fenice



Received: 28 November 2018; Accepted: 2 January 2019; Published: 9 January 2019

**Abstract:** The market trend for pitaya is increasing, although the preservation of the quality of this fruit after the harvest is challenging due to microbial decay, dehydration, and oxidation. In this work, the application of antimicrobial chitosan-based coatings achieved successful postharvest preservation of pitaya (*Stenocereus pruinosus*) during storage at  $10 \pm 2$  °C with a relative humidity of  $80 \pm 5\%$ . The solution of cross-linked chitosan with hydroxypropylmethylcellulose with entrapped Neem oil ( $16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) displayed the best postharvest fruit characteristics. The reduction of physiological weight loss and fungal contamination, with an increased redness index and release of azadirachtin from the microencapsulated oil, resulted in up to a 15 day shelf life for this fruit. This postharvest procedure has the potential to increase commercial exploitation of fresh pitaya, owing to its good taste and high content of antioxidants.

**Keywords:** *Stenocereus pruinosus*; coating; chitosan; neem; azadirachtin

## 1. Introduction

*Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxbaum is a columnar cactus endemic of the arid and semi-arid regions of Mexico, whose fruit is commonly named pitaya of May [1,2]. *S. pruinosus* widely distributes in thorn-scrub and tropical dry forests of Mexico, with harvesting from April to June. There are six identified variants of *S. pruinosus* fruit according to the colors of their pulp, which can be red, yellow, orange, purple, white, or pink. The pitaya fruit contains betalains, which are responsible for the flesh tonalities. Betalains are water-soluble and nitrogen-containing pigments as betaxanthin and betacyanins. Betaxanthins are in slightly higher concentrations than betacyanins in red flesh variants [3,4]. The betalains are chemopreventive, with several biological properties, such as anti-inflammatory, antioxidant, anti-diabetic, and anticancer properties [5,6]. Additionally, this fruit has a beneficial impact on human health due to a significant amount of phenolic compounds, vitamins B, C, and E, as well as minerals, such as iron, copper, and zinc [7,8].

It is worth mentioning that the market trend for pitaya is increasing due to the excellent acceptability of fresh consumption with nutritional similarities to other Cactaceae family fruit [9,10]. Nevertheless, the preservation of the quality of this fruit after the harvest is challenging, thereby it

only has local distribution with significant decay after 3 days. Generally, the harvest index for the non-climacteric pitaya relies on color changes, epicarp brightness, or the ease of spines' detachment rather than standardized quality-control procedures [1,8]. The common packing of the fruit in wooden crates causes damages and the release of juice, thus favoring microbial contaminations [1], and, moreover, there is a lack of information on the loss of the quality of pitaya due to microbial decay, dehydration, and oxidation. Armella et al. [1] report that pitaya (*Stenocereus griseus*, L.) loses attractive appearance and good taste after 5 and 8 days of storage at 17 and 7 °C, respectively. In another related work, García-Cruz et al. [4] report only 6 days of shelf life for this fruit at 24 °C. Additionally, the storage at low temperatures for pitaya (*Hylocereus undatus* and *Hylocereus polyrhizus*) as non-climacteric fruits harvested at close to full color retains market quality for at least 2 weeks at 14 °C or 1 week at 20 °C. However, these authors state the storage at 6 °C is counterproductive because of rapid losses of firmness and flavor when *Hylocereus* gets to room temperature [11].

Chitosan-based materials prove successful for increasing food shelf life, owing to its physicochemical characteristics and antimicrobial activity [12]. Chitosan (CH) forms adequate films with a semipermeable barrier for gas and moisture exchange control, modifying the endogenous level of CO<sub>2</sub> and reducing ethylene in fruit. These characteristics render a delay in weight loss, maintain firmness and color in prickly pear fruit (*Opuntia*) when treated with CH solutions, notwithstanding the low scores for color, aroma, flavor, and overall acceptability after 15 days of storage [13]. A relevant feature is the chemical versatility that allows chemical bonding to other compounds, thus expanding its functionality. In this regard, the coating produced by the grafting of quercetin to CH was employed in *Opuntia ficus indica* to inhibit the enzymatic oxidation [14]. The combination of CH with hydroxypropylmethylcellulose (H) is often a strategy to improve performance on oxygen and lipid barrier properties [15]. Furthermore, the production of composites of CH and H with antimicrobial components, such as lysozyme and nanosilver, has been studied for the protection of meat from oxidative changes, spoilage, and growth of microorganisms [16]. Another approach is the application of a nanocomposite of CH-H with incorporated extracts of Neem oil (N) (*Azadirachta indica* A. Juss) films for grapes and plums' packaging that extended postharvest shelf life up to 10 days by retarding enzymatic activity with adequate sensory and textural qualities [17]. Neem, originally from India, displayed antimicrobial properties ascribed to the active compound, azadirachtin, which is a limonoid tetraterpenoid, with applications in medicine or health products as well as in biopesticides [18]. The Neem has been used for the control of phytopathogenic fungi by Wang et al. [19], which describes the control of *Monilinia fructicola*, *Penicillium expansum*, *Trichothecium roseum*, and *Alternaria alternata* by Neem seed kernel extract in plums (*Prunus salicina*) and Yali pear (*Pyrus bertschneideri*). In another related study, Neem within 1.5% and 2% concentration coated precooling apples (*Malus domestica*) in a shrink-wrapped tray packing at 18–25 °C and with 65–75% relative humidity (RH) attained a 45 day storage life and remarkably reduced disease incidence with the minimum physiological weight loss [20].

Despite these studies on CH composites with H and Neem, there are constraints for many food applications as highly hydrophilic hydroxypropylmethylcellulose displays poor control of water permeability, thus favoring desiccation. To overcome this effect, the cross-linking of CH to hydroxypropylmethylcellulose by citric acid decreases the availability of H hydroxyl moieties, thus limiting polysaccharide-water interactions by hydrogen bonding and thereby reducing the water vapor transmission rate [15]. This study is the first to report, to the best of our knowledge, the preparation of CH cross-linked to cellulosic derivative for entrapping Neem and further assessment of its release in the postharvest storage of pitaya fruit. Moreover, the addition of the emulsifying Mesquite gum (MG) as a structural agent in this system enhances the preservation of this fruit. This study demonstrates that the use of these coatings on pitaya increases the shelf life, and thereby, the commercial exportation for this fruit.

## 2. Results and Discussion

### 2.1. Characterization of Coatings

The molecular weights and degree of acetylation (DA) for CH define the range of applicability, thereby adhesion and moisture retention capacities, as well as film-forming abilities, relates to high molecular weights. In the case of the acetyl group, the lower the DA, the higher the antimicrobial activity throughout the ionic interaction of positively charged amine groups with the negatively charged phospholipids of the cell membrane. Interestingly, although the antimicrobial activity increases with low molecular weight CH, high molecular weights are effective against spore germination [21]. The CH sample of the present work by thermochemical deacetylation of biological chitin has a medium viscosimetric average molecular weight ( $M_v = 285.55 \pm 0.19$  kDa) and low DA of  $9.91 \pm 0.21\%$  (Figure S1a shows the CH  $^1\text{H-NMR}$  spectrum).

On the other hand, the determination of the radical scavenging activity considers the variability among Neem commercial products. In this regard, the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method on our sample displays an  $\text{IC}_{50}$  of  $0.0178 \pm 0.0006$   $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , which is lower than that by Nahak and Sahu [22] with  $0.039$   $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . This variation is ascribed to the presence of other phenolic compounds and alkaloids in the oil. Besides, the concentration of azadirachtin for the preparation of emulsions in our Neem is  $3.38$   $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , and  $16$   $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $0.045$   $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of azadirachtin).

Entrapping matrices were hydroxypropylmethylcellulose grafted to CH (CHH) and CH mixed to MG (CHMG). CHH production was conducted throughout citric acid crosslinking using  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  catalyst (Supplementary Figure S1 shows the scheme of the reaction) following the previous work by Alonso et al. [23].  $^1\text{H-NMR}$  analyses displayed  $74.12 \pm 5.41\%$  of hydroxypropylmethylcellulose crosslinked in CH (Supplementary Figure S1 shows  $^1\text{H-NMR}$  spectra for CH, hydroxypropylmethylcellulose, and CHH). The emulsion employed polyethylene glycol and D-sorbitol as plasticizers and tween 20, tween 80, and polyvinyl alcohol and MG as emulsifiers [24]. Table 1 shows a drop diameter ( $D_{3,2}$ ) for the emulsion of Neem in CHH solution (NCHH) significantly higher than that for emulsion of Neem in CH with added Mesquite gum (NCHMG), which points out to the crosslinking of the polymers, thus limiting the surface activity and the ability to absorb in the oil-water interface. On the contrary, the  $D_{3,2}$  for NCHMG suffers the influence of the surface activity of the Mesquite gum (MG) as a stabilizing agent. The biopolymers behave mainly as stabilizing agents on the surface charge of the emulsion drops (Figure S2 shows the ionic behavior of the polymers). Regarding the  $\zeta$ , NCHH displays a positive surface charge, owing to the amino groups present in CH (Table 1), but negative for the NCHMG emulsion, owing to the MG carboxylic moieties (Table 1). Interestingly, NCHMG remains stable for one year and three months at room temperature. According to Acedo-Carrillo et al. [25], the stabilization of oil in water emulsions by MG might be explained for the electrosteric interaction of the protein-polysaccharide complexes thereof. Contrarily, NCHH emulsion readily creams after 45 min.

**Table 1.** Average Sauter diameter ( $D_{3,2}$ ), dispersion index (Span), and zeta potential ( $\zeta$ ) of biopolymers and emulsions.

Biopolymer/Emulsion	pH	$D_{3,2}$ ( $\mu\text{m}$ )	Span	$\zeta$ (mV)
CH	$3.03 \pm 0.02$	ND	ND	$38.90 \pm 0.02^e$
CH	$4.50 \pm 0.01$	ND	ND	$32.40 \pm 0.07^d$
Hydroxypropylmethylcellulose (H)	$3.05 \pm 0.03$	ND	ND	$-0.04 \pm 0.02^c$
Hydroxypropylmethylcellulose (H)	$4.52 \pm 0.01$	ND	ND	$0.01 \pm 0.001^c$
Mesquite gum (MG)	$3.04 \pm 0.04$	ND	ND	$-7.20 \pm 0.07^b$
Mesquite gum (MG)	$4.53 \pm 0.02$	ND	ND	$-11.50 \pm 0.03^a$
Emulsion of Neem in CH cross-linked to hydroxypropylmethylcellulose solution (NCHH)	$3.01 \pm 0.01$	$451.22 \pm 1.03^b$	$0.78 \pm 0.01^a$	$20.26 \pm 0.91^b$
Emulsion of Neem in CH with added Mesquite gum (NCHMG)	$4.51 \pm 0.01$	$1.87 \pm 0.87^a$	$2.53 \pm 0.41^b$	$-15.30 \pm 1.11^a$

Data are the mean and their standard deviation ( $n=9$ ). Different letters in the same column mean significant difference at  $p < 0.05$ . ND not determined.

## 2.2. Effect of Coatings on Pitaya (*S. pruinosa*) Postharvest Quality Endurance

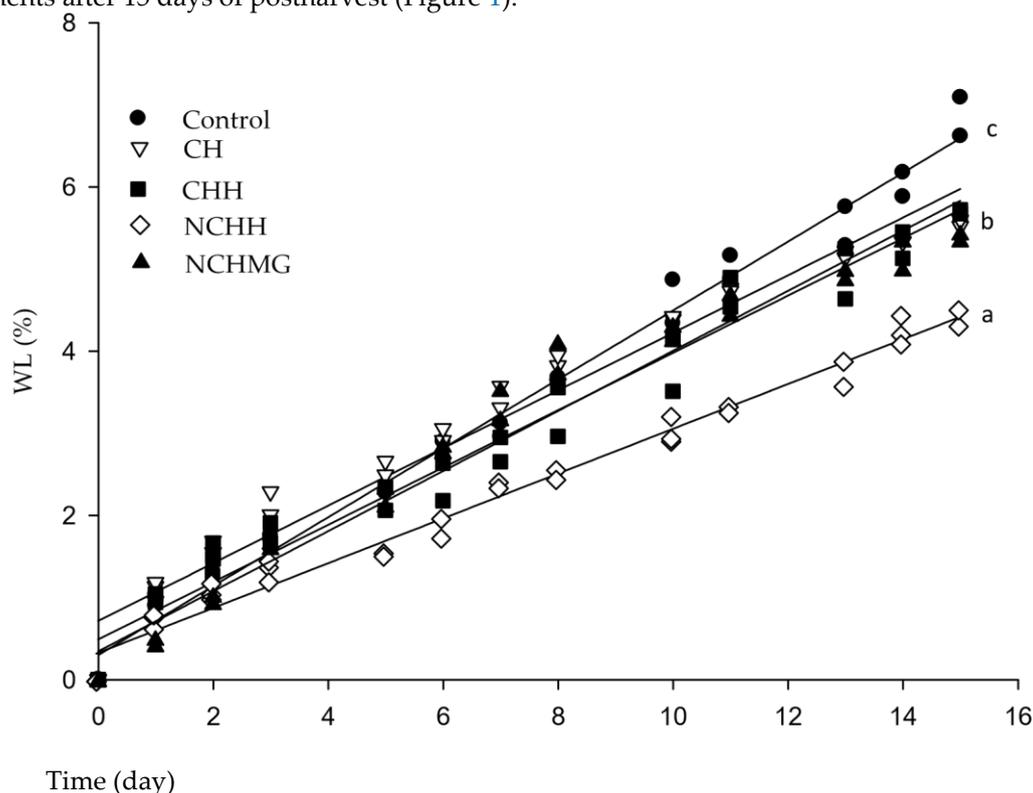
### 2.2.1. Weight Loss (WL)

WL rates fitted the experimental data of WL for each treatment and control in a second-order polynomial model with  $R^2 > 0.98$  (Figure 1, Table 2). Fruits having CH, CHH (control CH-g-hydroxypropylmethylcellulose), and NCHMG display WL rates of  $0.55 \pm 0.03 \text{ day}^{-1}$ ,  $0.38 \pm 0.06 \text{ day}^{-1}$ , and  $0.58 \pm 0.04 \text{ day}^{-1}$ , respectively. All treated fruit has significantly different WL rates compared to the control ( $0.42 \pm 0.03 \text{ day}^{-1}$ ) and NCHH stands for the best treatment of  $0.29 \pm 0.07 \text{ day}^{-1}$  rates.

In a related work, the WL of two variants of non-coated *S. pruinosa* rapidly decreased during storage at 24 °C and 90% RH. The authors attributed this behavior to the high rate of transpiration having significant differences in WL among variants, owing to the number of areolas [4]. Low temperatures and high RH are often the storage conditions to reduce the dehydration of cactus fruit, although the main constraint is the cold damage. Ali et al. [26] indicate that a WL of 27.8% after 28 days of storage of dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus* Weber) at 10 °C and 80% of RH, while WL of fruit with CH and submicron CH dispersions varies from 15% to 18%. Nevertheless, pitaya (*Stenocereus* spp.) is more delicate and intricate to preserve than dragon fruit, in agreement with Armella et al. [1].

These authors observed a rapid WL (8%) after only 8 days at 7 °C and 85% RH.

There are significant differences ( $p < 0.05$ ) among fruits with and without coating (control) at 10 °C and 80% RH. NCHH reduces to a lesser extent the weight of pitaya than the control and other treatments after 15 days of postharvest (Figure 1).



**Figure 1.** Weight Loss (WL) of pitaya (*S. pruinosa*) ( $n = 9$ ) during storage at 10 °C and relative humidity (RH) of 80% (See Table 2 for treatment identification). Different letters among traces mean significant differences ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** Weight loss (WL) rate, contact angle, whiteness index (WI), redness index (RI), and yellowness index (YI) of epicarp of control and coated pitayas during storage at 10 °C with relative humidity (RH) of 80%.

Treatment	Contact Angle (°)	WL Rate			Color Index			
		day <sup>-1</sup>	Significance Level	R <sup>2</sup>	Time (d)	WI	RI	YI
Control	61.25 ± 0.33 <sup>b</sup>	0.42 ± 0.03	0.0001	0.988	0	60.53 ± 0.63 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.11 <sup>c</sup>	33.83 ± 2.05 <sup>a</sup>
					15	60.34 ± 0.65 <sup>a</sup>	0.56 ± 0.05 <sup>a</sup>	41.09 ± 1.98 <sup>b</sup>
Chitosan (CH)	50.04 ± 0.48 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.03	0.0001	0.997	15	66.57 ± 0.63 <sup>c</sup>	1.57 ± 0.08 <sup>d</sup>	42.82 ± 1.87 <sup>b</sup>
Chitosan cross-linked to hydroxypropyl-methylcellulose solution (CHH)	61.79 ± 0.53 <sup>b</sup>	0.38 ± 0.06	0.0001	0.963	15	66.88 ± 0.52 <sup>c</sup>	1.55 ± 0.06 <sup>d</sup>	46.95 ± 1.45 <sup>c</sup>
Emulsion of Neem oil in chitosan cross-linked to hydroxypropyl-methylcellulose solution (NCHH)	76.47 ± 0.45 <sup>c</sup>	0.29 ± 0.07	0.0001	0.991	15	65.80 ± 0.37 <sup>c</sup>	1.54 ± 0.10 <sup>d</sup>	46.38 ± 1.84 <sup>c</sup>
Emulsion of Neem oil in chitosan with added Mesquite gum (NCHMG)	50.01 ± 0.32 <sup>a</sup>	0.58 ± 0.04	0.0001	0.969	15	64.19 ± 0.48 <sup>b</sup>	1.25 ± 0.12 <sup>b</sup>	48.95 ± 2.05 <sup>c</sup>

Data are the mean and their standard deviation ( $n = 3$  for WL and contact angle,  $n = 27$  for color index determination). Different letters in a column are significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 2.2.2. Determination of Contact Angle on the Epicarp of Pitayas

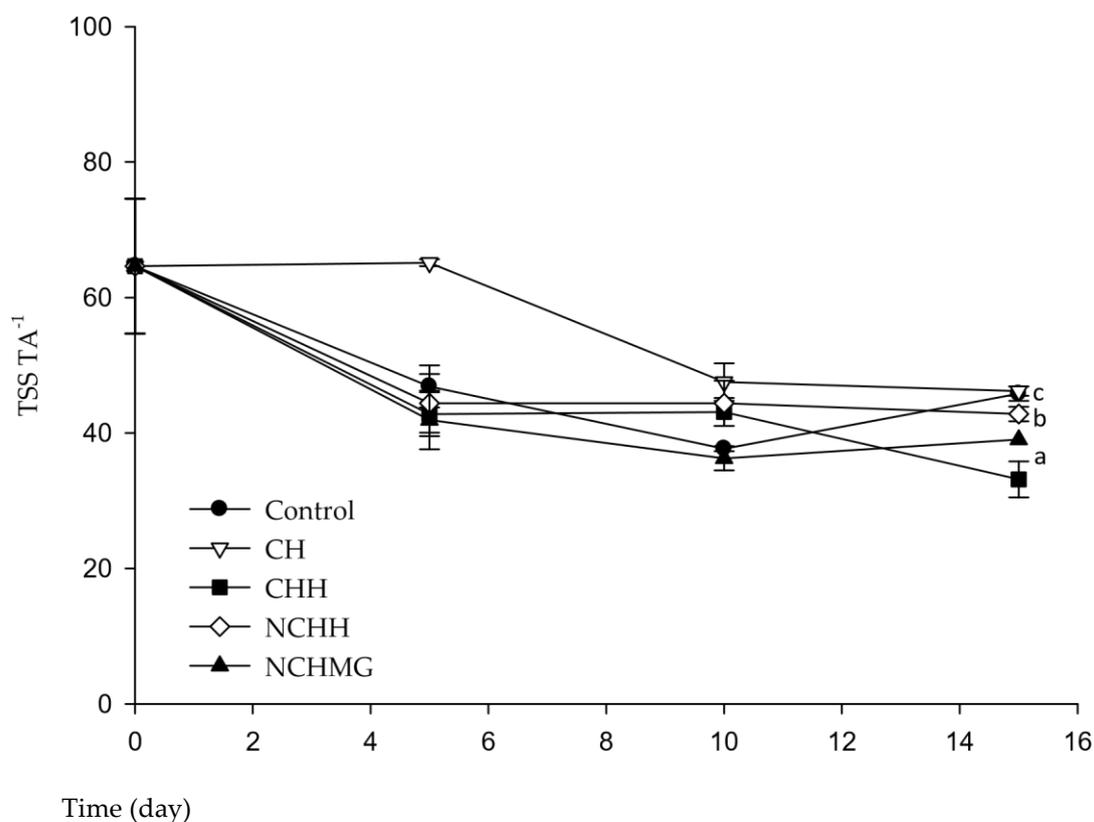
Generally, the contact angle of the surface of plants varies from 45° and up to 150° and beyond [27]. According to Vogler [28], a hydrophilic surface presents a contact angle lower than 65°, while the opposite for hydrophobic ones (>65°). The epicuticular wax layers in plants are hydrophobic with an influence on the wettability of plant surfaces, while intracuticular waxes control the permeability to water [27]. The contact angle of the epicarp of pitaya (control) indicates hydrophilicity (61.25 ± 0.33°) and despite the use of a hydrophilic polysaccharide coating with weak water vapor barrier characteristics, all coatings maintained the hydrophilic nature of the fruit, although NCHH is able to modify the contact angle to slightly hydrophobic. Thus, NCHH improves the moisture barrier, thereby restricting the weight reduction during storage (Table 2).

The contact angle decreased in CH and NCHMG, 50.04 ± 0.48° and 50.01 ± 0.32°, respectively, owing to the higher hydrophilicity than epicarp in the control fruit. By contrast, CHH, that reduces the WL with respect to the control (0.382 ± 0.057 day<sup>-1</sup>), is not significantly different for the contact angle (61.79 ± 0.53°). The crosslinking with citric acid might explain this experimental evidence as it decreases the hydroxyl moieties of CH, thereby reducing hydrophilicity in agreement with Moller et al. [15]. Despite nonsignificant differences with the control, the type of coating explains the lowest rate (0.289 ± 0.069 day<sup>-1</sup>) and highest contact angle (76.47 ± 0.45°) for NCHH, but most importantly, the emulsion breakdown that releases the oil, thereby reducing water migration and WL.

### 2.2.3. Determination of pH, Titratable Acidity (TA), and Total Soluble Solids (TSS)

The acidity in fruits due to the presence of organic acids, such as malic, ascorbic, citric, tartaric, and lactic and oxalic acids is not known for *S. pruinus* [4]. In the present work, the TA is a percentage of malic acid, as the main organic acid related to *Hylocereus* [29], and renders no significance ( $p > 0.05$ ) in samples during storage ranging from 0.16% to 0.30%. Additionally, the pH and TSS data remain without changes during storage from 5–5.9 and 10 and 12.5° Brix, which are in the range for *S. pruinus*, in agreement with other reports [4] (Figure S3 shows pH, TSS, and TA data). On the other hand, the TSS TA<sup>-1</sup> (Figure 2) rates concomitant to sweetness or acidity displays significance for

coated fruits ( $p < 0.05$ ), where the control and CH are the sweetest, while CHH and NCHMG have the most acid. Sample NCHH is among both groups of significance according to the Tukey test.



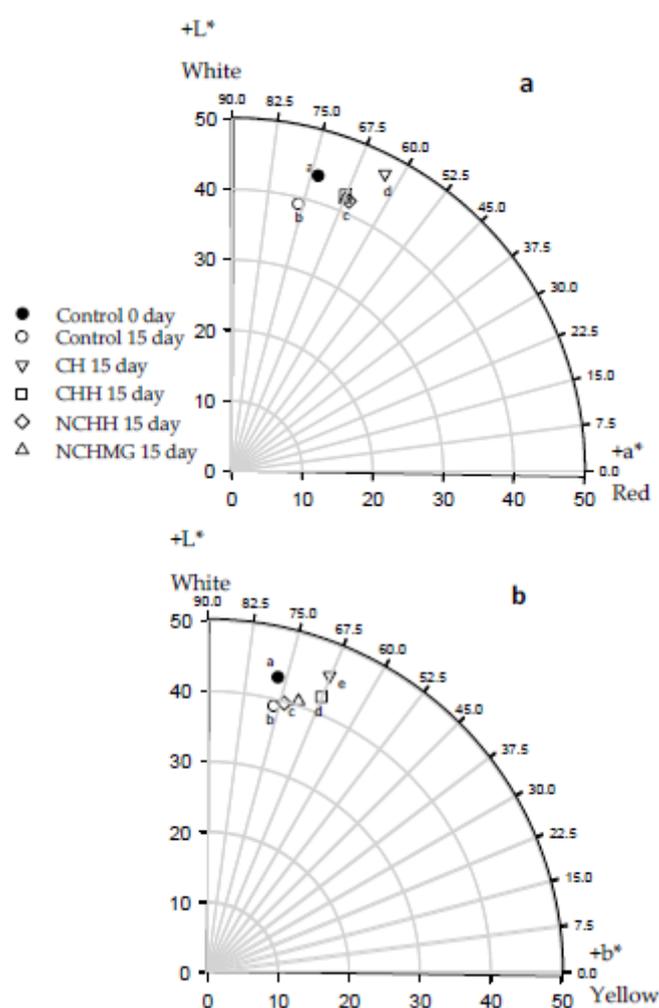
**Figure 2.** Ratio of Total Soluble Solids (TSS) and Titratable Acidity (TA) ( $TSS TA^{-1}$ ) of pitaya (*S. prinosus*) during storage at 10 °C and relative humidity (RH) of 80% (See Table 2 for treatment identification). Data are the mean and their standard deviation ( $n = 9$ ). Different letters among traces mean significant differences ( $p < 0.05$ ).

#### 2.2.4. Effect of Coatings on Color, Betalains, Phenolic Compounds, and Ascorbic Acid in Pitaya

The CIELAB parameters are significantly different among treatments ( $p < 0.05$ ) and, interestingly, all coated samples display increasing brightness ( $L^*$ ) compared to the control (Figure 3). Noteworthy,  $L^*$  is one of the most critical parameters to describe the consumers appealing for the fruit. The experiment raises an interesting outcome considering that previous work has reported a negative impact of chitosan containing 1% or 2.5% acetic acid coatings on red prickly pear [13]. These authors describe remarkable changes in the total color because of the darkening and reduction of  $a^*$ . In the present work, there are also significant differences among treatments for  $a^*$  and  $b^*$  ( $p < 0.05$ ); CH treatment has the highest red coloring whereas the lowest is the control. The yellow coloring of fruit coated with CH and CHH displays significant differences compared to other coatings and the control (Figure 3). According to García-Cruz et al. [8], the changes in color are due to epicarp betalains in *S. prinosus*, which corresponds to the sum of red/purple betacyanins and yellow betaxanthins, respectively [30].

Concomitantly, after 15 days of storage, the WI has no differences among treatments and only NCHMG increased WI, while the control significantly reduces. A similar pattern is observed for RI and YI, in which the coated fruits show significantly higher values than the control (Table 2). Clearly, the changes in the color of epicarp in the control relates to betalains' degradation. In this regard, the

radical scavenging activity of Neem and the acidic pH probably delays degradation of this pigment in fruit coated with the chitosan-based materials. On the other hand, Figure 4 shows betacyanin and betaxanthin concentrations in the pulp for control and coated samples, with significant differences ( $p < 0.5$ ) during storage. The application of NCHH and CH on the pulps results in the highest concentration of these pigments, thereby preserving epicarp and pulp colors, thus enhancing human health. This result agrees with García-Cruz et al. [4], where the *S. pruinus* storage for 6 days at 24 °C rendered non-significant changes in total betalain concentration. Additionally, there are other antioxidants, such as phenolic compounds and ascorbic acid, that might prevent pigments' degradation. These compounds' concentrations have no significant variations ( $p > 0.5$ ) during storage (Figure S4 shows phenolic compounds and ascorbic acid data) and they are within the range of that by García-Cruz et al. [4] in pitaya at 24 °C for 6 day. Noteworthy, the variation of 0.10–0.17 g·kg<sup>-1</sup> agrees with the results of Beltrán-Orozco et al. [6] in pitaya, *Stenocereus stellatus*.



**Figure 3.** Color measurements on the epicarp of pitayas: (a) 0 day and (b) 15 days of storage at 10 °C and relative humidity (RH) of 80% (See Table 2 for treatment identification). Data are the mean ( $n = 27$ ). Different letters among treatments mean significant differences ( $p < 0.05$ ).

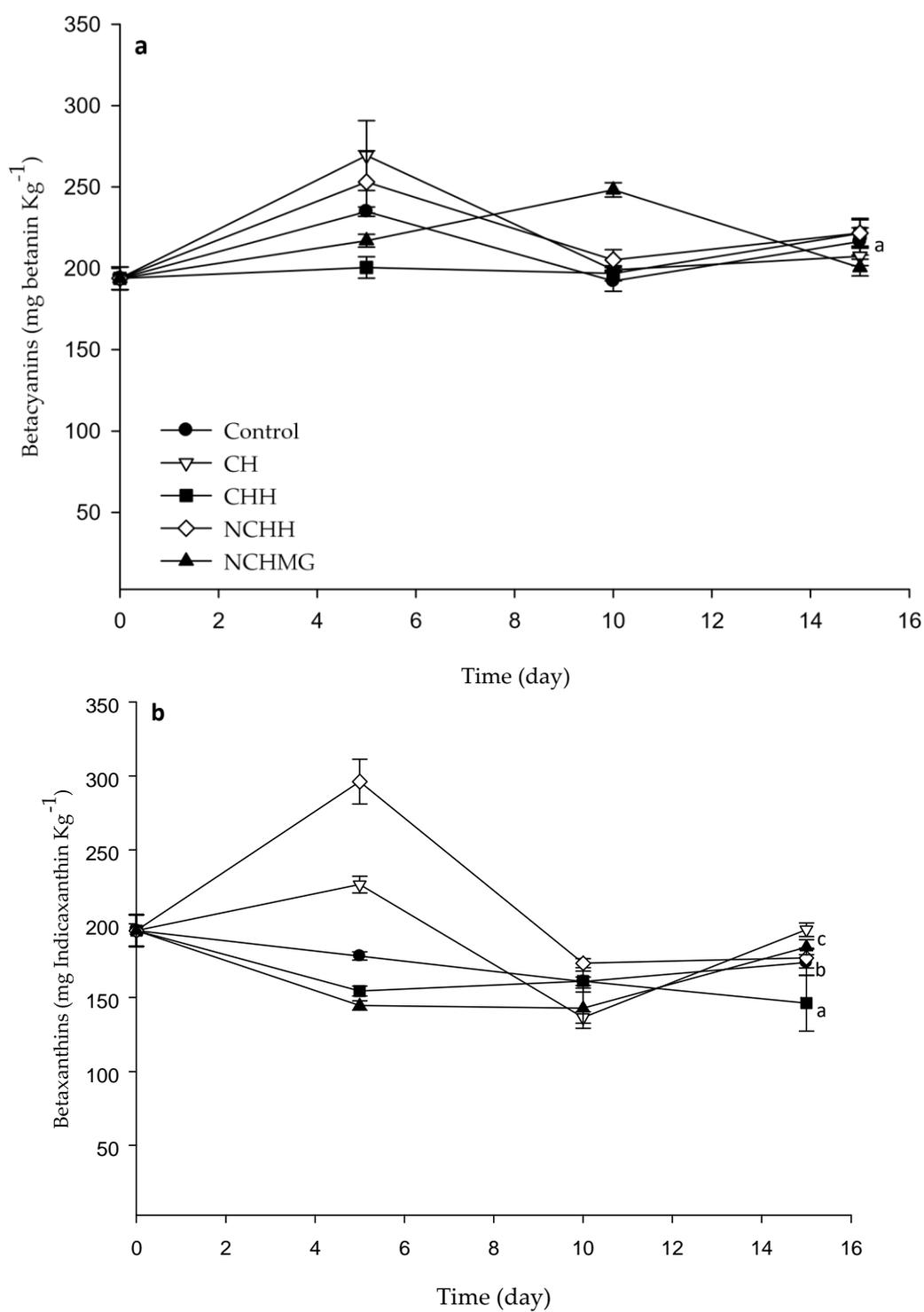
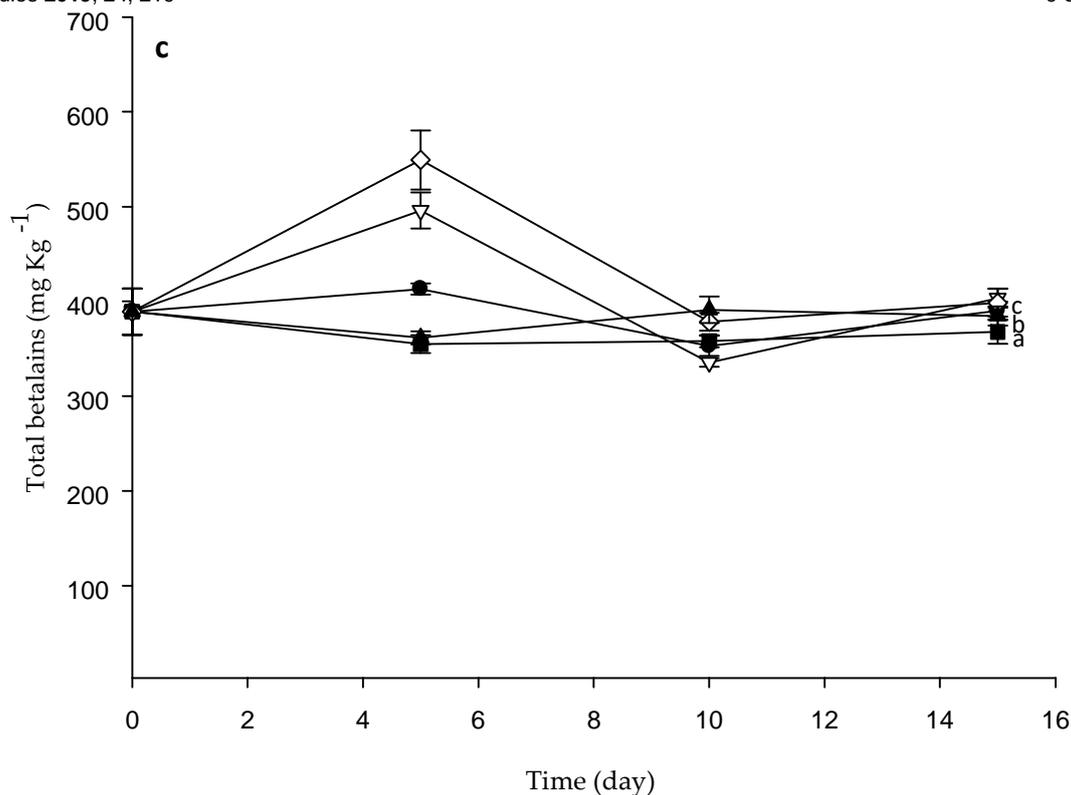


Figure 4. Cont.



**Figure 4.** Determination of betacyanins, (a), betaxanthins (b), and total betalains (c) in the pulp of pitaya during storage at 10 °C and relative humidity (RH) of 80%. Data are the mean and their standard deviation ( $n = 9$ ) (See Table 2 for treatment identification). Different letters among traces mean significant differences ( $p < 0.05$ ).

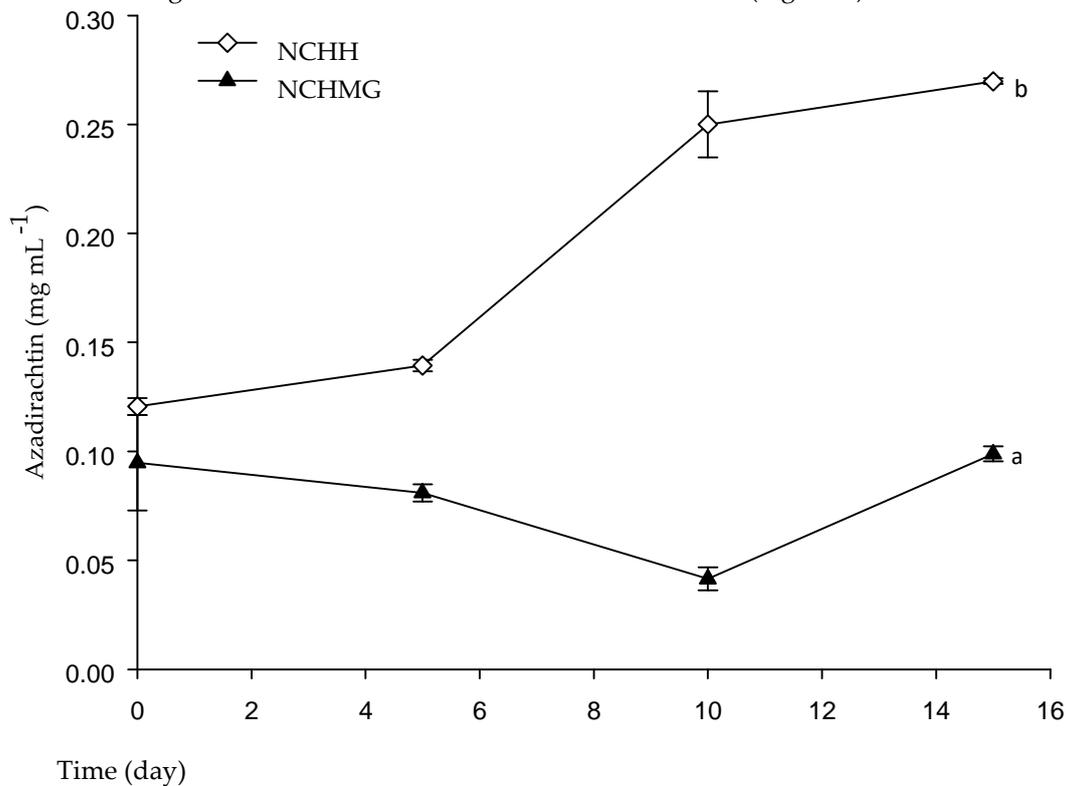
### 2.2.5. Pulp Firmness and Sensorial Analysis

The firmness of the pulp control and coated pitayas during storage showed no significant differences (Figure S5 shows the firmness of pulp of pitayas data). There is, however, a slight loss of firmness of the pulp, owing to senescence by degradation of the polysaccharides of the cell walls by enzymatic reactions, such as that associated to pectin methylesterase and polygalacturonase [31]. Sensory analysis for the fruit at the beginning and at the end of the essay concluded that NCHH has no effect on the appealing of the fruit. On the other hand, CH and NCHMG enhanced the general appearance, aroma, and consistency although there is a change in taste. CHH improves the appearance, but lowers the consistency of the pulp (Figures S6 and S7 show the sensory analysis results of control and coated fruits).

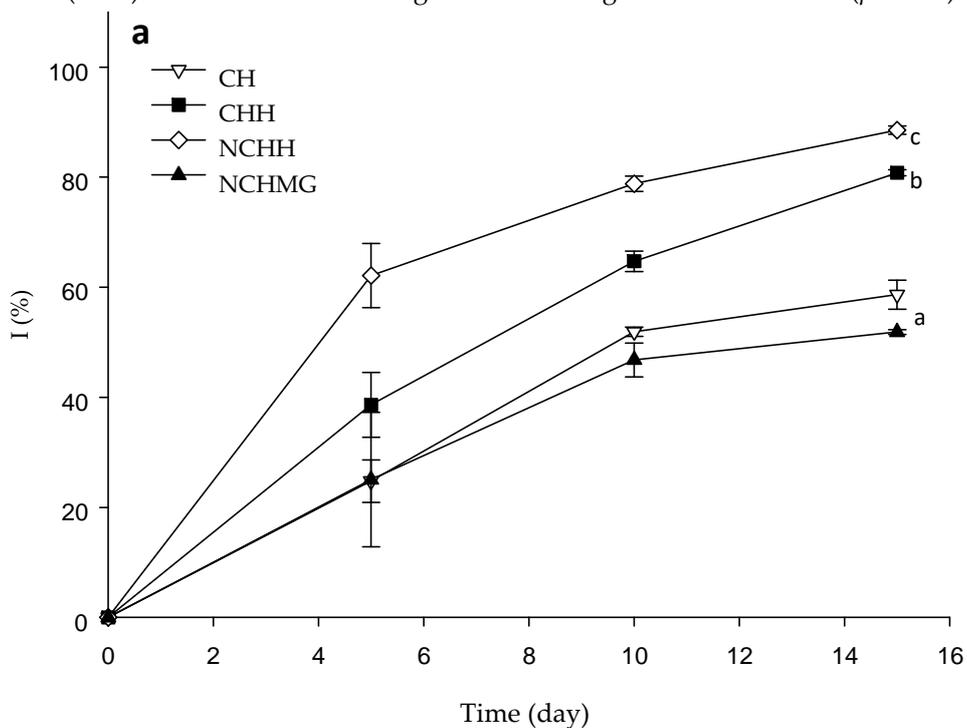
### 2.3. Fungal and Mesophilic Aerobic Bacterial Contamination of Samples Fruits' Control and Coated Samples during Storage

The coating application on the pitaya fruits restricts water loss, thus providing protection to the surface and maintaining the turgidity of the fruit. Besides, the appearance improves as the coating conveys brightness (Figure S8 shows photographs of fruits during storage). The NCHH coating has the highest fungal and mesophilic aerobic bacterial inhibition during storage with  $96.2 \pm 1.1\%$  and  $93.9 \pm 1.1\%$ , respectively, while CHH ( $78.0 \pm 2.2\%$  and  $80.5 \pm 1.4\%$ ) and CH ( $76.1 \pm 3.8\%$  and  $88.3 \pm 2.0\%$ ) present lesser antimicrobial activity. On the other hand, NCHMG coating displays moderate antimicrobial activity ( $51.8 \pm 7.8\%$  and  $46.1 \pm 3.6\%$ ) despite the presence of CH and Neem (Figure 5 and Figure S8). This poor result might be ascribed to MG, a poly (1–3)  $\beta$ -D-galactose with (1–6) branching of L-arabinose, L-rhamnose,  $\beta$ -D-glucuronate, and 4-O-methyl- $\beta$ -D-glucuronate, which

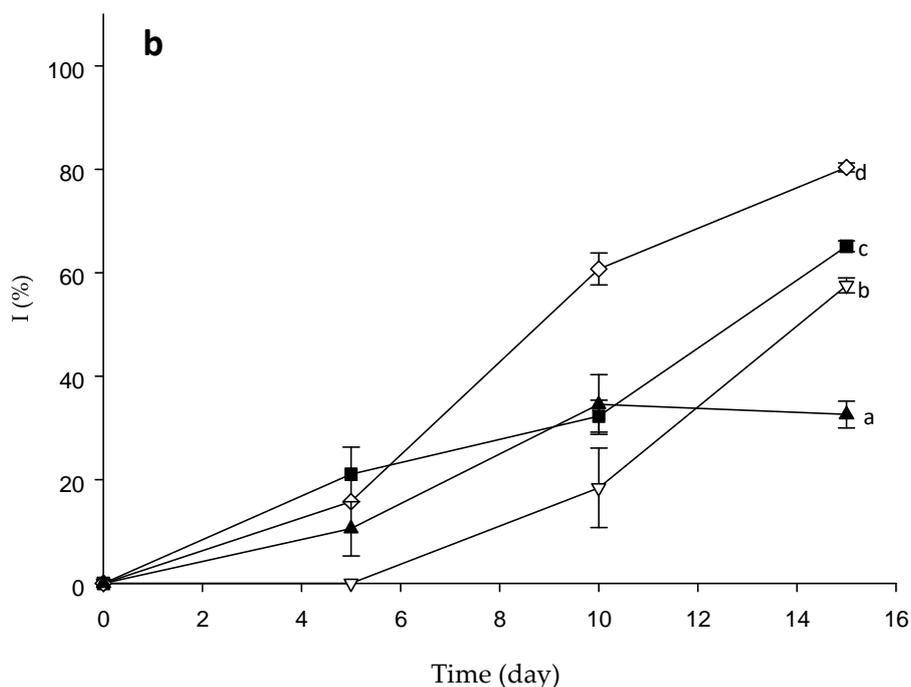
sustains fungal growth [24]. Noteworthy, the control media has the exact acetic acid concentrations to that of the coating formulations to assess the antimicrobial effects (Figure 6).



**Figure 5.** The release of azadirachtin of Neem during storage at 10 °C and relative humidity (RH) of 80%. (See Table 2 for treatment identification). Data are the mean and their standard deviation ( $n = 9$ ). Different letters among traces mean significant differences ( $p < 0.05$ ).



**Figure 6.** Cont.



**Figure 6.** Fungal (a) and mesophilic aerobic bacterial (b) inhibitions on the epicarp of pitayas during storage at 10 °C and relative humidity (RH) of 80% for control and coated fruits (See Table 2 for treatment identification). Data are the mean and their standard deviation ( $n = 3$ ). Different letters among traces mean significant differences ( $p < 0.05$ ).

The isolated fungal colonies from epicarps of the control and NCHMG-coated pitaya present a green color with 25 to 30 mm colony diameters. The hyphae septate and conidiophores are scarce and geniculate, and the septa distribute irregularly transverse. The conidia are obclavate, large, and with a muriform shape (Figure S9 shows photographs of light microscopy of fungal isolate at 100-magnification). According to these morphological characteristics, this fungus is *Alternaria*, owing to the conidia chains, whereas *Ulocladium* usually assembles as single or short chains [32].

#### 2.4. Release of Neem from Coatings

Neem extraction from the Neem seeds contains ca 40% of the triterpenoids-rich oil. Therein, salannin and azadirachtin are the most abundant polar limonoids. The Azadirachtin has antimicrobial and inhibitory activity on insect growth. Several reports indicate moulting defects and sterility due to the blockade on microtubule formation in dividing cells. The mode of action of azadirachtin in the protozoa, *Tetrahymena thermophilae*, relies on cell proliferation and interference to RNA synthesis [33]. In addition to these applications, Neem extracts from leaves and kernels are residue-free and safe for human consumption, which stands out against synthetic fungicides. Additionally, Raizada et al. [18] claimed that the azadirachtin is a non-mutagenic compound without mammalian toxicity and without signs of toxicity, mortality, changes in tissue weight, pathology, and serum and blood parameters after in vivo toxicological trials in rats for 90 days. The determination of azadirachtin by UPC2 evidences the release of the oil from the emulsions (Figure 5) as the concentration significantly increases during storage of NCHH-coated pitayas. Noteworthy, NCHMG coating shows no release of the oil according to the stability of the emulsion due to the pH on the pericarp ( $5.2 \pm 0.1$ ) and storage conditions in terms of the temperature and RH. A different azadirachtin concentration at the initial time is due to the low stability of the NCHH coating as it releases N after 45 min at room temperature (see Section 2.1).

### 2.5. Changes in Morphology of the Control and Coated Pitaya Epicarps by SEM

The areola of pitaya is a structure formed by a series of radial and central spines that capture water from the environment [34]. These areolas are easily withdrawn after harvest, causing a higher migration of water, which leads to a rapid WL. According to García-Cruz et al. [4], *S. prumosus* presents 24 to 28 areolas on average, and the number of areolas is proportional to WL. The areola observation by SEM in the experimental units of this work, shown in Figure S10, presents two types of spines, central and radial, as well as the wax (Figure 7a), which is a natural coating in the pitaya [34]. Holloway and Jeffree [27] suggests that a surface contact angle lower than 90°, similar to this work (Table 2), is a result of the incomplete covering of wax on the epicarp, resulting in roughness and interstices (Figure 7). Nonetheless, the epicarp possesses corrugations and trichomes that might enhance the wetting. Noteworthy, the harvested pitayas are in wooden boxes, where spines perforate the epicarp of proximal fruit, producing damages and accelerating water losses [10]. The SEM in Figure S10 illustrates the damage on the epicarp.

The CH coating forms a smooth and homogeneous surface, despite the irregular morphology of the epicarp (Figure 7b), whereas those for CHH and NCHH are heterogeneous (Figure 7c,d). Similarly, NCHMG produces a network structure onto the epicarp and agglomerations in other areas due to the hydrophilicity of MG (Figure 7e).

Figure 7 shows the SE micrographs at the end of the bioassay, where the control (Figure 7f) sample retains the characteristically natural wax, but evidences the growth of microorganisms in agreement with the microbial counts. *Alternaria* is inoculated on pitaya epicarps to distinguish the fungal structures (Figure 7b), in addition to septate hyphae as well as conidia chain observations (Figure 7h). By the end of the bioassay, CH (Figure 7i) remains on the epicarp of the cactus, but CHH (Figure 7j), NCHH (Figure 7k), and NCHMG (Figure 7l) have agglomerations. There is an incomplete covering of wax of the epicarps that explains this roughness and interstices (Figure 7). Nonetheless, the epicarp has other surface features, such as corrugations or trichomes, that might enhance the wetting and coating interaction. Moreover, the coating has no dramatic changes on the ripening of these non-climacteric fruits or change of flavor. Nevertheless, despite the nutraceutical potential of this fruit, there are no reports on the characterization of the ripening and identification of postharvest diseases.

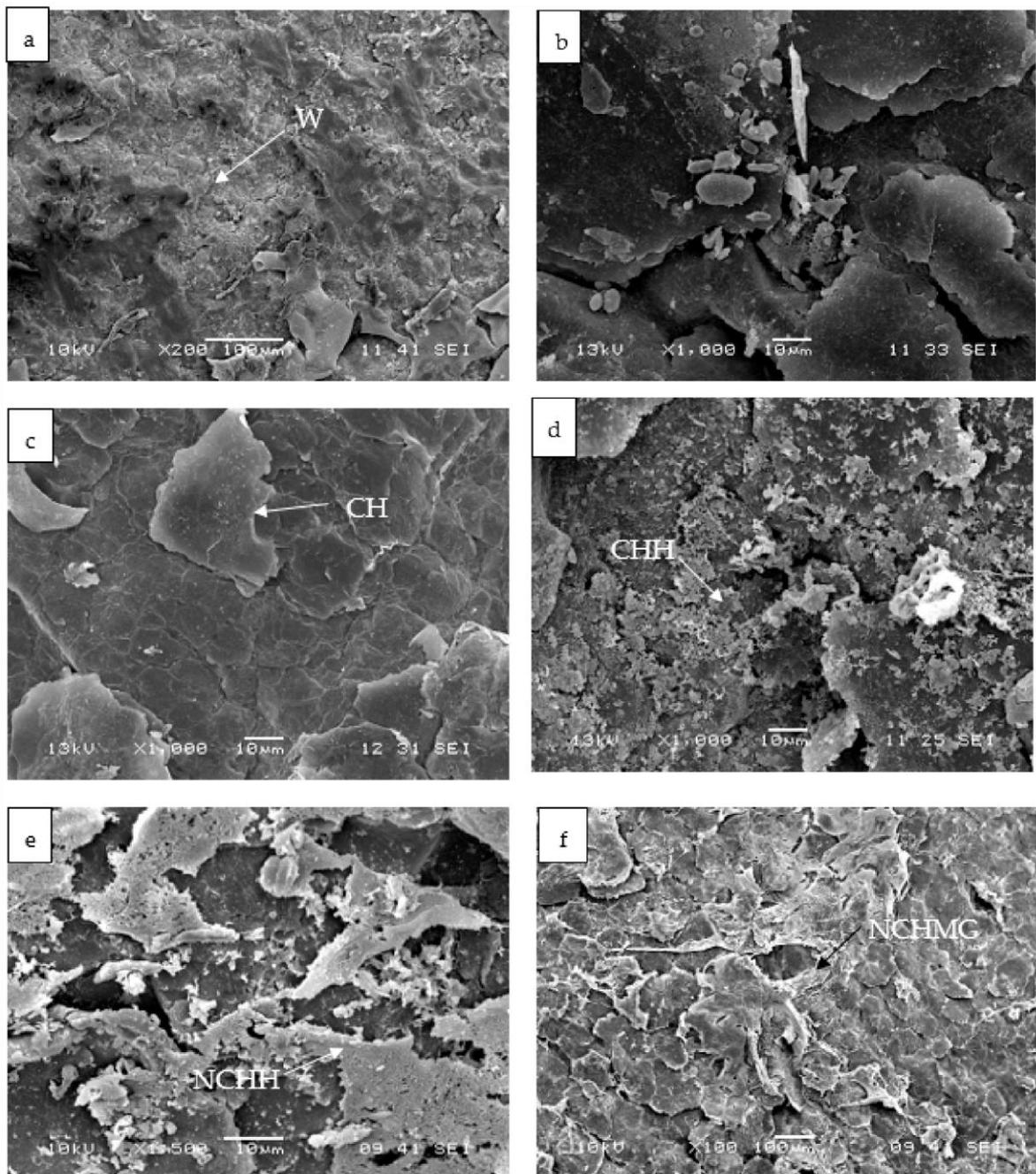
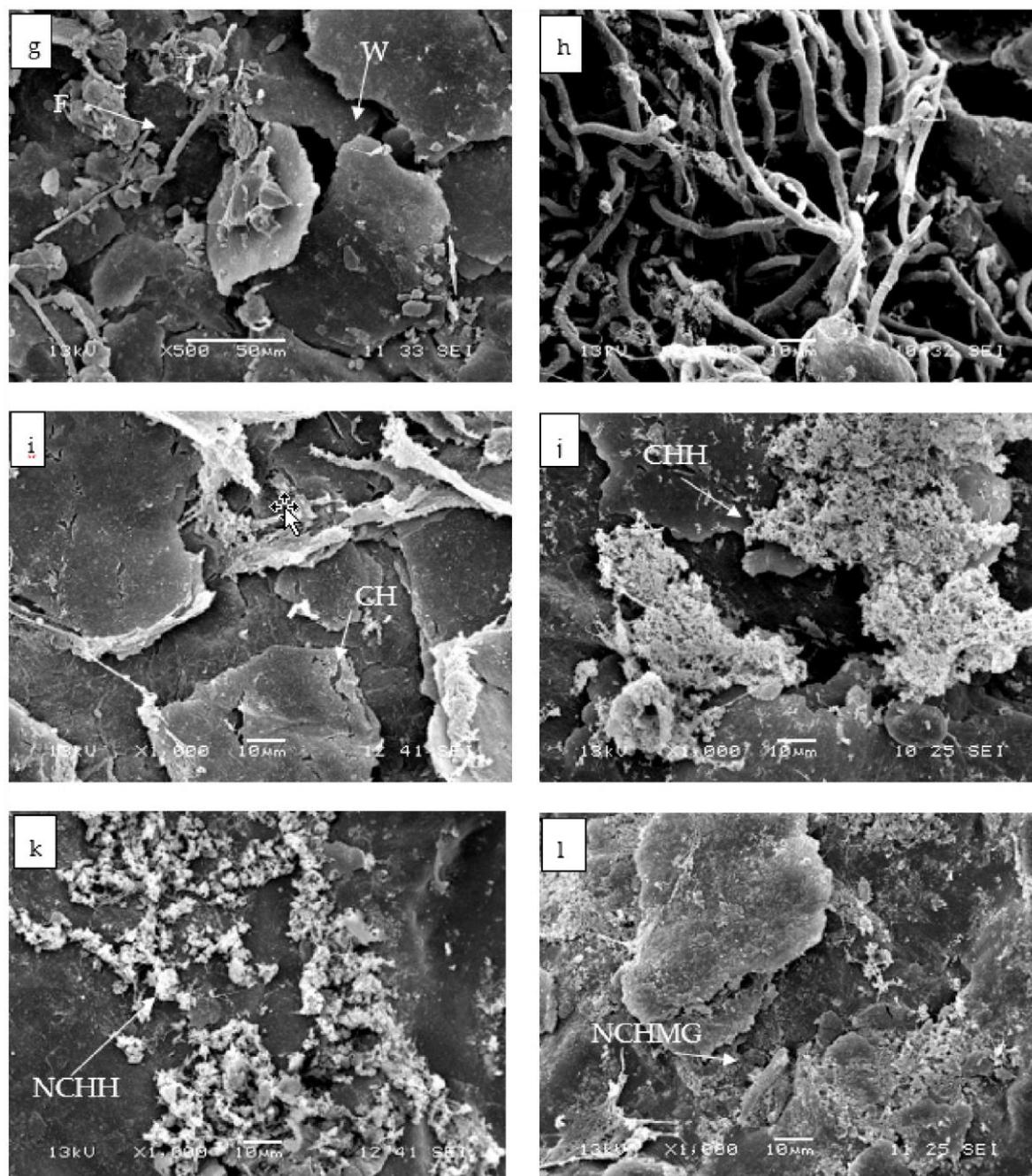


Figure 7. Cont.



**Figure 7.** SE micrographs of coatings on pitayas at the initial time: Control (a), *Alternaria* inoculated (b), CH (c), CHH (d), NCHH (e), and NCHMG (f). At 15 d of storage: Control (g), *Alternaria* inoculated (h), CH (i), CHH (j), NCHH (k), and NCHMG (l). (See Table 2 for treatment identification). W is a natural wax, and F is fungi (three preparations per treatment with 10 observations in SEM).

### 3. Materials and Methods

#### 3.1. Materials

J.T. Baker (Ecatepec State of Mexico, Mexico) supplied the citric acid monohydrate, sodium phosphate monobasic, D-sorbitol, sodium hydroxide, and petroleum ether. Hydroxypropylmethylcellulose (H) was a kind gift from Derivados Macroquímicos (Ecatepec Morelos, Mexico). Neem Mex (Quebrantadero Morelos, Mexico) supplied Neem oil. Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO, USA, supplied 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), poly(vinyl alcohol) (PVA), azadirachtin as external standard, trichloroacetic acid, and 1,10-phenanthroline, gallic acid.

Acetic acid, ethanol, methanol, phosphoric acid, ferric chloride, calcium carbonate were purchased from Reactivos Quimica Meyer (Mexico City, Mexico). Farmacias Paris (Mexico City, Mexico) provided ascorbic acid. Folin-Ciocalteu, Tween 20, Tween 80 were purchased from Hyclon (Mexico City, Mexico). All reagents were analytical reagent grade. Exudate extracts from Mesquite (*Prosopis*) trees in San Luis Potosi (Mexico) provided the Mesquite gum (MG) after purification according to methodology reported by Vernon-Carter, Beristain, and Pedroza [24].

### 3.2. Preparation and Characterization of CH and CHH

Thermochemical deacetylation of chitin from shrimp wastes using *Lactobacillus brevis* as the starter following an earlier report [35] produced CH. DA was the result of proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H-NMR) spectroscopy analyses in a Bruker (AC 200) at 200 MHz using D<sub>2</sub>O with 10% HCl with 3-(trimethylsilyl) propionic acid as an internal reference [35]. The Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada equation allowed the CH viscosimetric average molecular weight (M<sub>v</sub>) by capillary viscometer using acetate buffer solution.

In a typical procedure for CHH preparation, CH (5 g·L<sup>-1</sup>) is dissolved in 0.1 M of acetic acid. 15 g of H was dissolved in 644 mL of distilled water and stirred with mechanical agitation for 24 h, afterwards 322 mL of ethanol and 3.2 mL of polyethylene glycol were added. H and CH solutions were mixed in a ratio of 1:1 (vol:vol). Citric acid (50 g·L<sup>-1</sup>), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (37.5 g·L<sup>-1</sup>) and D-sorbitol (10 g·L<sup>-1</sup>) were incorporated as crosslinker, catalyst, and plasticizer, respectively. The mixture was stirred with continuous mechanical agitation until complete dissolution. Then, the mixture was placed under vacuum at 70 °C for 3 min [23]. The CHH solution was dried at 60 °C for 6 h. The resulting films were purified with methanol anhydrous in a ratio of 1:10 (wt:vol) for 24 h, dried, and dissolved in HCl/D<sub>2</sub>O for <sup>1</sup>H NMR characterization. The hydroxypropylmethylcellulose cross-linked to CH molar ratio for CHH was calculated from integration of the assigned signal of the massive considering the acetyl of CHH to the massive ratio of the acetyl of native CH signals in the <sup>1</sup>H NMR.

### 3.3. Characterization of Neem: Determination of Azadirachtin Concentration and Radical Scavenging Activity

Azadirachtin in Neem was determined by UltraPerformance Convergence Chromatography (UPC2) (Waters ACQUITY, Milford MA, USA) equipped with a photodiode array detection and a C-18 column (Waters 1.0 × 100 mm, 1.7 μm) using supercritical CO<sub>2</sub> and methanol as the mobile phase (Flow rate = 1.5 mL·min<sup>-1</sup>), convergence pressure of 1500 psi, and column temperature of 30 °C. The sample was dissolved in methanol: Petroleum ether of 5 °C [36]. Inhibition of radical scavenging activity (RSA) was determined spectrophotometrically with Neem concentrations from 5 to 25 μg·mL<sup>-1</sup> with freshly prepared DPPH (0.1 mM/methanol) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Test tubes were stirred in a vortex followed by incubation at 30 °C for 30 min in darkness.

Absorbance at 517 nm was measured in a Genesys UV-visible spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) by triplicate. RSA (%) was determined from Equation (1), considering the absorbance of ethanol as the control (A<sub>0</sub>) and the sample (A<sub>x</sub>):

$$RSA (\%) = ((A_0 - A_x)/A_0) \times 100 \quad (1)$$

Experimental data were fitted to Probit statistical analysis in the NCSS® program [37]. The IC<sub>50</sub> value was the concentration of N that inhibited 50% of DPPH [38].

### 3.4. Emulsions Formulation and Characterization of Chitosan-Based Coatings with Neem Oil

CH solution (5 g·L<sup>-1</sup>) in acetic acid (0.1 M) was the coating CH. CHH coating was prepared as described in Section 3.2 and applied on the fruit without purification. For the preparation of Neem incorporated coatings, emulsions of oil in water with a ratio of dispersed phase and continuous phase of 1:9. The mixture of N (16 g·L<sup>-1</sup>) and mineral oil (84 g·L<sup>-1</sup>) in a ratio of 1:5.25 (wt:wt) was the

dispersed phase that was added dropwise into the aqueous solution of MG (10 g·L<sup>-1</sup>), homogenized for 10 min at 40 Hz (Hielscher up 400S, Teltow, Germany), and subsequently added dropwise to CH solution (5 g·L<sup>-1</sup> in acetic acid (0.1 M)). CH and MG were the continuous phase in a ratio of 1:20 (wt:wt). pH was adjusted to 4.5 with NaOH (0.1 N) to obtain NCHMG. For the other emulsion coating, the dispersed phase consisted of tween 20 (0.9 g·L<sup>-1</sup>), tween 80 (0.6 g·L<sup>-1</sup>), PVA (10 g·L<sup>-1</sup>), Neem (16 g·L<sup>-1</sup>), and mineral oil (72.5 g·L<sup>-1</sup>) were added dropwise to the continuous phase of CHH. The mixture was stirred until an oil-in-water emulsion was homogenized with an Ultra Turrax Ika 25 (Janke and Kunkel GmbH and Co., Staufen, Germany) at 10,000 rpm for 10 min to obtain NCHH. The ratio of dispersed phase and continuous phase was 1:9.

### 3.5. Droplet Size and Zeta Potential Determinations

Droplet size distribution of the emulsions was carried out by the laser diffraction method in a Master sizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, UK). Average Sauter diameter ( $D_{3,2}$ ) (Equation (2)) and polydispersity through the dispersion index (Span) measurements have the assessment of the variations in the droplet sizes for a given emulsion (Equation (3)).

$$D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (2)$$

where  $n_i$  is the number of particles with diameter  $i$  ( $d_i$ ).

$$Span = (d(90) - d(10))/d(50) \quad (3)$$

where  $d(90)$ ,  $d(50)$ , and  $d(10)$  represent the diameters to the cumulative distribution at 90%, 50%, and 10%, respectively.

Zeta potentials ( $\zeta$ ) of the CH, hydroxypropylmethylcellulose, MG, and emulsions were determined in a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). pH was adjusted in a pHmeter (pH210 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) equipped with an electrode (HI 1332 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA). Emulsion stability was determined by measuring the upper oil-rich layer formation after leaving it to stand in 30 mL of each emulsion in conical graduated screw cap tubes and stored upright at  $25 \pm 1$  °C. Formation of upper cream-like layers was observed every 15 min for the first 9 h, and then every 24 h for two weeks and then once per week.

### 3.6. Application of Coatings on Pitaya Fruit

Pitayas (*S. prunosus*) were harvested in May 2015 from an orchard in Mixteca region in the state of Puebla, Mexico (17°48'00" N, 97°46'00" O) and were selected at the commercially mature stage, identified with easily detached spines and shiny skin. After the harvest, the spines were removed from the fruit, and subsequently, the fruit with red flesh was chosen because it contained the highest amount of betalains [4]. Fruit samples were sorted for defects (38 kg) and randomly distributed into five groups, which corresponded to 15 experimental units for each treatment. Units were placed in clamshell containers with three fruit each (ca. 0.5 kg), as control; CH; CHH; NCHMG and NCHH. Fruit was immersed for 1 min in the coating solution followed by drying at room temperature for 1 h and stored at  $10 \pm 2$  °C and  $80 \pm 3\%$  relative humidity (RH). The trial was repeated thrice with three different pitaya batches.

### 3.7. Fruit Quality Evaluation

All experimental units were weighed (Ohaus, Parsippany-Troy Hills, NJ, USA) every 24 h during storage. Percentage of weight loss (% WL) was calculated according to the initial weight. WL data was fitted to a linear model, the level of significance of each independent variable and squared multiple correlation coefficients ( $R^2$ ) were estimated using the regression software, STATISTICA (StatSoft, Inc. Tulsa, OK, USA). A portable refractometer (Atago Co., Tokyo Japan) determined the

total soluble solids (TSS) in the extracted juices in Brix. Volumetric titration with NaOH (0.01 N) (AOAC method) determines the titratable acidity (TA) in the juice of fruit as a percentage of malic acid as the dominant organic acid in the fruit. pH in juice fruit was conducted with a pHmeter (pH210 Hanna Instruments, Woonsocket, RI, USA) equipped with an electrode (HI 1332 Hanna Instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA). Chromameter CR200 colorimeter (Minolta, Osaka, Japan) measured the color change of the epicarp in three equidistant equatorial and longitudinal parts of each fruit, and was expressed as  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  according to the International Commission on Illumination (CIE). A white reference standard was used to calibrate the instrument. Whiteness (WI), yellowness (YI), and redness (RI) indexes were calculated with Equations (4)–(6), respectively [39].

$$WI = \left( (100 - L^{*2}) + a^{*2} + b^{*2} \right)^{1/2} \quad (4)$$

$$YI = 142.86b^*/L^* \quad (5)$$

$$RI = a^*/b^* \quad (6)$$

Firmness was measured in the flesh taking two random points of the equatorial region of each peeled fruit and expressed in N using a texturometer (Brookfield CT3, Middleboro, MA, USA) with a 4 mm diameter probe and 5 mm penetration distance with 1 mm·s<sup>-1</sup> speed [13]. The determinations were the mean of 4 repetitions.

### 3.8. Determination of Total Betalains, Phenolic Compounds, and Ascorbic Acid (ASA) in the Flesh of Pitaya

The flesh of pitaya (2 g) was soaked with 20 mL of methanol (80% v/v) and sonicated for 10 min in a bath (Branson, MO, USA). The methanolic extract was stirred for 20 min at 25 °C and centrifuged at 2200× g for 10 min (Thermo Scientific, Legend XTR, Waltham, MA, USA). The pellet was subjected to a second extraction and the supernatants were collected and filtered (Columbia Filter, Tlalnepantla, Mexico Mexico). The filtrate was concentrated at 40 °C in a rotary evaporator (Büchi Labortechnik AG, Postfach, Flawil Switzerland), and re-suspended in 10 mL of methanol (80%) [4]. The concentrations of betacyanins and betalains were determined in the methanolic extract by spectrophotometry (Equation (7)). The total content of betalains, as the sum of betacyanins and betaxanthins, was expressed as mg per kg of fresh pitaya weight.

$$B = \left( A \times D_f \times W \times V \right) / \epsilon \times P \times l \quad (7)$$

where  $B$  is the content of betacyanins or betaxanthins,  $A$  is the absorbance (538 nm and 483 nm for betacyanins and betaxanthins, respectively),  $D_f$  is the dilution factor,  $W$  is the molecular weight (550 g·mol<sup>-1</sup> and 308 g·mol<sup>-1</sup> for betanin and indicaxanthin, respectively),  $\epsilon$  is the molar extinction coefficient (60,000 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> and 48,000 L·mol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> for betanin and indicaxanthin, respectively),  $P$  is the mass of the sample (g), and  $l$  is the length of the cell (1 cm) [40].

The phenolic compounds were determined from the reaction of 0.1 mL of the methanolic extracts and 0.25 mL of Folin-Ciocalteu reagent diluted with distilled water in the ratio of 1:1 (vol:vol). After 6 min, 1.25 mL of a Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution (190 g·L<sup>-1</sup>) was added and the volume adjusted to 3 mL with distilled water. The mixture was left in darkness at room temperature for 90 min prior to measurement at 760 nm. The concentration of phenolic compounds was estimated from the calibration curve using gallic acid as the standard and expressed as (mg·kg<sup>-1</sup>) [8].

For the ascorbic acid (AsA) determination, 2 g of flesh was macerated with 5 mL of trichloroacetic acid (5% w/v), sonicated for 10 min, followed by agitation for 20 min and centrifugation (2200× g for 10 min). To 1 mL of the supernatant, 0.5 mL of trichloroacetic acid solution, 1 mL of ethanol, 0.5 mL of phosphoric acid (0.4% w/v), 1 mL of 1,10-phenanthroline (0.5% w/v), and 0.5 mL of FeCl<sub>3</sub> solution (0.03% w/v) were added. The mixture of reaction was incubated for 1 h to measure the absorbance at 534 nm (Genesys 6, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The content was determined by a calibration curve of AsA standard and expressed as g·kg<sup>-1</sup> [29].

### 3.9. Sensory Evaluation of Pitaya Treated with Chitosan-Based Coatings

The sensory evaluation was performed with a panel of 50 consumers (non-trained jury). The panelists rated the flesh on their appearance, aroma, flavor, and consistency with a 7-point hedonic scale from 1 extremely dislike to 7 extremely like. Ten g of each sample were served into cups coded with random numbers; drinking water and crackers were provided to the panelists.

### 3.10. Determination of Contact Angle on Coated Pitaya

The contact angle was determined by the sessile drop method, placing a droplet of deionized water (2  $\mu$ L) on different points of each epicarp surface in triplicate for coated and control pitayas. Images were taken with a side-illumination horizontal light microscope Intel Qx3 (Intel Corporation, Santa Clara, CA, USA) and processed by image analysis (ImageJ) version 1.41o software, NIH, Bethesda, MD, USA).

### 3.11. Enumeration of Fungi and Mesophilic Aerobic Bacteria of Epicarps of Coated Pitaya

The coated and control epicarps (10 g) were homogenized in 90 mL of isotonic saline solution 0.9% NaCl (*w/v*). Serial decimal dilutions were prepared and transferred to Petri dishes with potato dextrose agar acidified to pH 3.5 with tartaric acid (1.4% *w/v*) or standard methods agar for fungal and total mesophilic aerobic plate counts, respectively. Inhibition percentage (*I*%) considered the fungal and bacteria counts in the control and each chitosan-based coating (Equation (8)). Acetic acid at 0.1 M, 0.05 M, 0.044 M, and 0.044 M were added to the culture media considering the controls of CH, CHH, NCHH, and NCHMG, respectively, to distinguish their antimicrobial activity from that of the chitosan-based coatings.

$$I\% = \frac{CFU_{mL-control1} - CFU_{mL-coating1}}{CFU_{mL-control1}} \times 100, \quad (8)$$

Fungal colonies from the inoculation of serial dilutions in acidified potato dextrose agar were isolated by the streaking method. Microscopic morphology was observed by methylene blue staining in a light microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

### 3.12. Azadirachtin of N Release from the Emulsions in Stored Experimental Units

Measurement of azadirachtin concentration determined the release of the oil from emulsions. For this purpose, the coated fruit was washed with 20 mL methanol and the methanolic concentrate was obtained by evaporation at 30 °C and injected in an UPC<sup>2</sup> following the procedure described in Section 2.2.

### 3.13. Scanning Electron (SE) Microscopy Analysis of Pitaya Epicarp

Pitaya epicarp for each coating and control were cut into 4 mm  $\times$  10 mm samples and immersed in 5% (*v/v*) glutaraldehyde for 24 h. Then, samples were fixed with OsO<sub>4</sub> 1% (*w/v*) for 2 h, dehydrated in a graded alcohol series, and covered with carbon and gold before examination in a JEOL JSM-5900 (LV, Tokyo, Japan) microscope [41]. Fresh fruit was inoculated with spore suspension of 1  $\times$  10<sup>4</sup> spores·mL<sup>-1</sup> of *Alternaria* sp. (Culture Collection of Centro de Biotecnología Genómica of Instituto Politécnico Nacional, Reynosa Tamaulipas, Mexico) by a puncture and stored at 10 °C and 80% of RH for 9 days. Samples were taken and prepared for SEM analysis as described above.

### 3.14. Statistical Analysis

A completely randomized design was used for the experiments. All experimental data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and multiple means comparison of Fisher's LSD test ( $p < 0.05$ ). Except for the sensory evaluation data, the remaining were analyzed by the non-parametric approach of Friedman test ( $p < 0.05$ ). The statistical analyses were performed using the statistical software NCSS-PASS-GESS [37].

## 4. Conclusions

The application of the NCHH coating to pitaya stored at 10 °C in high RH was delayed the senescence the best, thus preserving the fruit color for up to 15 days. The experimental evidence indicates the release of azadirachtin from N significantly decreased the WL and fungal contamination. The chitosan-based coating with Neem extended the pitaya shelf life for up to 15 days, allowing the exportation of this fruit to international markets.

**Supplementary Materials:** Supplementary materials can be available online.

**Author Contributions:** K.S. conceived and designed the main ideas of this paper, analyzed the experimental results, and wrote the paper. C.G.H.-V. carried out the experiments and wrote the paper. A.A.-S. and L.C. participated in materials characterization. A.R.-G. participated and guided the droplet size and zeta potential determinations. The authors read and approved the final manuscript.

**Funding:** This research was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) for funding Project No. [237292] and scholarship grant (C.G.H.-V.) was funded by CONACyT.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank to Atilano Gutierrez and Marco Antonio Vera for their assistance in NMR studies carried out in the Laboratory of Nuclear Magnetic Resonance at Universidad Autónoma Metropolitana.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Armella, M.A.; Yáñez-López, L.; Soriano, S.J.; Ramírez, R.G. Phenology, postharvest, physiology and marketing of pitaya (*Stenocereus griseus*, L.) as a sustainable resource. *Acta Hortic.* **2003**, *598*, 251–254. [CrossRef]
2. Parra, F.; Blancas, J.J.; Casas, A. Landscape management and domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley: Human-guided selection and gene flow. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2012**, *8*, 32. [CrossRef] [PubMed]
3. Chuck-Hernández, C.; Parra-Saldívar, R.; Sandate-Flores, L. Pitaya (*Stenocereus* spp.). *Encycl. Food Health* **2016**. [CrossRef]
4. García-Cruz, L.; Valle-Guadarrama, S.; Salinas-Moreno, Y.; Luna-Morales, C. Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2016**, *111*, 69–76. [CrossRef]
5. Moreno, D.A.; García-Viguera, C.; Gil, J.I.; Gil-Izquierdo, A. Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochem. Rev.* **2008**, *7*, 261–280. [CrossRef]
6. Beltrán-Orozco, M.C.; Oliva-Coba, T.G.; Gallardo-Velázquez, T.; Osorio-Revilla, G. Ascorbic acid, phenolic content and antioxidant capacity of red, cherry, yellow and White type of Pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrociencia* **2009**, *43*, 153–162.
7. Bravo-Hollis, H.; Sánchez-Mejorada, H. *Las cactáceas de México*, 3rd ed.; Universidad Nacional Autónoma de México: Mexico City, Mexico, 1991.
8. García-Cruz, L.; Valle-Guadarrama, S.; Salinas-Moreno, Y.; Joaquín-Cruz, E. Physical, Chemical, and Antioxidant Activity Characterization of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) Fruits. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2013**, *68*, 403–410. [CrossRef]
9. Le Bellec, F.; Vaillant, F.; Imbert, E. Pitahaya (*Hylocereus* spp.): A New Fruit Crop, a Market with a Future. *Fruits* **2006**, *61*, 237–250. [CrossRef]

10. Hernandez-Valencia, C.G.; Shirai, K.; Mejía, P.; Blanco, S.; Román, A.; Yáñez, L.; Escalona, H. Post-harvest Preservation of Cactus Fruits Produced in Semidesertic Areas of Oaxaca by Biopolymer Coatings. *Int. J. Interdiscip. Soc. Sci. Annu. Rev.* **2016**, *11*, 15–26. [[CrossRef](#)]
11. Nerd, A.; Gutman, F.; Mizrahi, Y. Ripening and postharvest behaviour of fruits of two *Hylocereus* species (Cactaceae). *Postharvest Biol. Technol.* **1999**, *17*, 39–45. [[CrossRef](#)]
12. Sandoval, L.N.; López, M.; Montes-Díaz, E.; Espadín, A.; Tecante, A.; Gimeno, M.; Shirai, K. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fresh Cheese using Chitosan-grafted Lactic Acid Packaging. *Molecules* **2016**, *21*, 469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ochoa-Velasco, C.E.; Guerrero-Beltrán, J.A. Postharvest quality of peeled prickly pear fruit treated with acetic acid and chitosan. *Postharvest Biol. Technol.* **2014**, *92*, 139–145. [[CrossRef](#)]
14. Torres, E.; Marín, V.; Aburto, J.; Beltrán, H.; Shirai, K.; Villanueva, S.; Sandoval, G. Enzymatic modification of chitosan with quercetin and its application as antioxidant edible films. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2012**, *48*, 149–156. [[CrossRef](#)]
15. Moller, H.; Grelier, S.; Pardon, P.; Coma, V. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-HPMC-based films. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6585–6591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zimoch-Korzycka, A.; Jarmoluk, A. The use of chitosan, lysozyme, and the nano-silver as antimicrobial ingredients of edible protective hydrosols applied into the surface of meat. *J. Food Sci. Technol.* **2014**, *52*, 5996–6002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Shanmuga Priya, D.; Suriyaprabha, R.; Yuvakkumar, R.; Rajendran, V. Chitosan-incorporated different nanocomposite HPMC films for food preservation. *J. Nanopart. Res.* **2014**, *16*, 2248. [[CrossRef](#)]
18. Raizada, R.B.; Srivastava, M.K.; Kaushal, R.A.; Singh, R.P. Azadirachtin, A Neem Biopesticide: Subchronic Toxicity Assessment in Rats'. *Food Chem. Toxicol.* **2001**, *39*, 477–483. [[CrossRef](#)]
19. Wang, J.; Li, J.; Cao, J.; Jiang, W. Antifungal activities of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on postharvest diseases in fruits. *Afr. J. Microbiol. Res.* **2010**, *4*, 1100–1104.
20. Wijewardane, R.N.A.; Guleria, S.P.S. Effect of pre-cooling, fruit coating and packaging on postharvest quality of Apple. *J. Food Sci. Technol.* **2013**, *50*, 325–331. [[CrossRef](#)]
21. Verlee, A.; Mincke, S.; Stevens, C.V. Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr. Polym.* **2017**, *164*, 268–283. [[CrossRef](#)]
22. Nahak, G.; Sahu, K.R. In vitro antioxidative activity of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* Leaves by DPPH scavenging assay. *J. Nat. Sci.* **2010**, *8*, 4.
23. Alonso, D.; Gimeno, M.; Olayo, R.; Vázquez-Torres, H.; Sepúlveda-Sánchez, J.; Shirai, K. Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the reparation of antimicrobial-finished textiles. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77*, 536–543. [[CrossRef](#)]
24. Vernon-Carter, E.J.; Birstain, C.I.; Pedroza, I.R. Mesquite gum (*Prosopis gum*). *Dev. Food Sci.* **2000**, *41*, 217–238. [[CrossRef](#)]
25. Acedo-Carrillo, J.I.; Rosas-Durazo, A.; Herrera-Urbina, R.; Rinaudo, M.; Goycoolea, F.M.; Valdez, M.A. Zeta potential and drop growth of oil in water emulsions stabilized with Mesquite gum. *Carbohydr. Polym.* **2006**, *65*, 327–336. [[CrossRef](#)]
26. Ali, A.; Zahid, N.; Manickam, S.; Siddiqui, Y.; Alderson, P.; Maqbool, M. Effectiveness of submicron chitosan dispersions in controlling anthracnose and maintaining quality of dragon fruit. *Postharvest Biol. Technol.* **2013**, *86*, 147–153. [[CrossRef](#)]
27. Holloway, P.J.; Jeffree, C.E. *Epicuticular Waxes*, 2nd ed.; Encyclopedia of Applied Plant Sciences; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2017; Volume 2, pp. 374–386. [[CrossRef](#)]
28. Vogler, E.A. Structure and reactivity of water at biomaterial surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **1998**, *74*, 69–117. [[CrossRef](#)]
29. Li, X.; Li, M.; Wang, J.; Wang, L.; Han, C.; Jin, P.; Zheng, Y. Methyl jasmonate enhances wound-induced phenolic accumulation in pitaya fruit by regulating sugar content and energy status. *Postharvest Biol. Technol.* **2018**, *137*, 106–112. [[CrossRef](#)]
30. Azeredo, H.M.C. Betalains: Properties, sources, applications, and stability—A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 2365–2376. [[CrossRef](#)]
31. Paul, V.; Pandey, R.; Srivastava, G.C. The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene—An overview. *J. Food Sci. Technol.* **2012**, *49*, 1–21. [[CrossRef](#)]

32. Hoog, G.S.; Horré, R. Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses* **2002**, *45*, 259–276. [[CrossRef](#)]
33. Morgan, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 4096–4105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ayala-Cordero, G.; Terrazas, T.; López-Mata, L.; Trejo, C. Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckeii* seedlings under soil water deficit. *J. Exp. Bot.* **2006**, *57*, 3165–3174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Aranday-García, R.; Román-Guerrero, A.; Ifuku, S.; Shirai, K. Successive inoculation of *Lactobacillus brevis* and *Rhizopus oligosporus* on shrimp wastes for recovery of chitin and added-value products. *Process Biochem.* **2017**, *58*, 17–24. [[CrossRef](#)]
36. Guo, W.; Bian, Z.; Zhang, D.; Tang, G.; Liu, W.; Wang, J.; Li, Z.; Yang, F. Simultaneous Determination of Herbicide Residues in Tobacco Using Ultrapformance Convergence Chromatography Coupled with Solid-Phase Extraction. *J. Sep. Sci.* **2015**, *38*, 858–863. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hintze, J. *NCSS 2007*; NCSS, LLC: Kaysville, UT, USA, 2007.
38. Carballo-Sánchez, M.P.; Ramírez-Ramírez, J.C.; Gimeno, M.; Hall, G.M.; Ríos-Durán, M.G.; Shirai, K. Papaya (*Carica papaya*) and tuna (*Thunnus albacares*) by-products fermentation as biomanufacturing approach towards antioxidant protein hydrolysates. *Rev. Mex. Ing Quim.* **2016**, *15*, 91–100.
39. Pankaj, B.; Opara, U.; Al-Said, F. Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technol.* **2013**, *6*, 36–60. [[CrossRef](#)]
40. Castellanos-Santiago, E.; Yahia, E.M. Identification and quantification of betalains from the fruit of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5758–5764. [[CrossRef](#)]
41. Martínez-Castellanos, G.; Pelayo-Zaldívar, C.; Pérez-Flores, L.J.; López-Luna, A.; Gimeno, M.; Bárzana, E.; Shirai, K. Postharvest Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Quality Preservation by *Lactobacillus plantarum*. *Postharvest Biol. Technol.* **2011**, *59*, 172–178. [[CrossRef](#)]

**Sample Availability:** Samples of the compounds are available from the authors.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

## 14 TRABAJOS PRESENTADOS

- Poster: Entrampamiento de neem en matrices estructurales de quitosano. 5th International Symposium on Bioengineering. Morelia, Michoacán, México, 12-14 agosto 2015
- Poster: Evaluación de la citotoxicidad de neem para su posible aplicación en apósitos antimicrobianos. 7ma Reunión de la Sociedad de Ingeniería de Tejidos de México. Ciudad de México. México. 7-8 septiembre 2016
- Poster: Evaluation of the antimicrobial activity and lymphocytes cytotoxicity of neem leaf extract. TERMIS – America. Conference & Exhibition. San Diego, CA, USA. 11-14 diciembre 2016
- Poster: Actividad antimicrobiana y citotoxicidad de un extracto de neem (*Azadiracta indica*). XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Puerto Vallarta, México. 25-30 julio 2017
- Presentación oral: Structural characterization of biological chitin nanofibers obtained by acid and surface-deacetylated method. XXIV Conference "New Aspects of the Chemistry and Applications of Chitin and its Derivatives. Tyneç, Polonia. 19-22 septiembre 2018
- Poster: Conservación poscosecha de pitaya (*Stenocereus pruinosus*) empleando recubrimientos a base de quitosano. IX Simposio Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Tabasco, México. 24-28 septiembre 2018. Ganador del Segundo lugar en presentación tipo poster.
- Poster: Empleo de biopolímeros para la formulación de recubrimientos bioactivos para prolongar la vida poscosecha de pitaya (*Stenocereus pruinosus*). XXXI Congreso Nacional de la Sociedad Polimérica de México A.C. Puebla, México. 14-18 octubre 2018

## 15 BIBLIOGRAFÍA

- Adyanthaya, S., Pai V., Maji, J. (2014). Antimicrobial potential of the extracts of the twigs of *Azadirachta indica* (Neem): an in vitro study. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2(6): 53-57
- Agilent, 2016. Bacterial fatty acid methyl esters. <http://cn.agilent.com/cs/library/applications/A00573.pdf>. Consultada 27/09/2018
- Ajeigbe, K. O., Enitan, S., Omotoso, D. R., Oladokun, O. O. (2013). Acute effects of aqueous leaf extract of *aspilia africana* c.d. adams on some haematological parameters in rats. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10(5):236-243.
- Akpuaka, A., Ekwenchi, M.M., Dashak, D.A., Dildar, A. (2013). Biological Activities of Characterized Isolates of n-Hexane Extract of *Azadirachta Indica* A.Juss (Neem) Leaves. *Nature and Science*, 11(5).
- Ali, A., Zahid, N., Manickam, S., Siddiqui, Y., Alderson, P., Maqbool, M. (2013). Effectiveness of submicron chitosan dispersions in controlling anthracnose and maintaining quality of dragon fruit. *Posth Biol. Technol*, 86, 147–153.
- Alonso, D., Gimeno, M., Olayo, R., Vázquez-Torres, H., Sepúlveda-Sánchez, J., Shirai, K. (2009), Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the reparation of antimicrobial-finished textiles. *Carbohydr Polym.*, 77, 536-543.
- 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. *Carbohydr. Res.* 45(6):854-859.
- Al-Rahmah, A. N., Mostafa, A. A., Abdel-Megeed, A., Yakout, S. M., Hussein, S. A. (2013). Fungicidal activities of certain methanolic plant extracts against tomato phytopathogenic fungi. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 7(6), 517-524
- Anderson, D. E., Kim, M. B., Moore, J. T., O'Brien, T. E., Sorto, N. A., Grove, C. I., Lackner, L. L., Ames, J. B., Shaw, J. T. (2012) Comparison of Small Molecule Inhibitors of the Bacterial Cell Division Protein FtsZ and Identification of a Reliable Cross-Species Inhibitor. *ACS Chem. Biol.* 7, 1918–1928.
- Ansel, H.C., Allen, L.V., Popovich, N.G. (2004) *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 8<sup>a</sup> Edition. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Aranday-García, R., Román-Guerrero, A., Ifuku, S. Shirai, K. 2017. Successive inoculation of *Lactobacillus brevis* and *Rhizopus oligosporus* on shrimp wastes for recovery of chitin and added-value products. *Process Biochemistry*. 58, 17-24.
- Armella, M.A., Yáñez-López, L., Soriano, S.J., Ramírez, R.G. (2003). Phenology, postharvest, physiology and marketing of pitaya (*Stenocereus griseus*, L.) as a sustainable resource. *Acta Hort.* 598, 251–254.
- Ayala-Cordero, G., Terrazas, T., López-Mata, L., Trejo, C. (2066). Morpho-anatomical changes and photosynthetic metabolism of *Stenocereus beneckeii* seedlings under soil water deficit. *J. Exp. Bot.* 57, 3165–3174.
- Azeredo, H.M.C., (2009). Betalains: Properties, sources, applications, and stability—A review. *Int. J. Food Sci. Technol.* 44, 2365–2376.
- Barkhordari, M. R., Fathi, M. (2018). Production and characterization of chitin nanocrystals from prawn shell and their application for stabilization of Pickering emulsions. *Food Hydrocoll.*, 82, 338–345.
- 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.
- Beltrán-Orozco, M. C., Oliva-Coba, T. G., Gallardo-Velázquez, T., Osorio-Revilla, G. (2009). Ascorbic acid, phenolic content and antioxidant capacity of red, cherry,

- yellow and White type of Pitaya cactus fruit (*Stenocereus stellatus* Riccobono). *Agrociencia*, 43, 153-162.
- 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.
- Betancourt, C., Cejudo-Bastante, M., Heredia, F., Hurtado, N. (2017). Pigment composition and antioxidant capacity of betacyanins and betaxanthins fractions of *Opuntia dillenii* (Ker Gawl) Haw cactus fruit. *Food Res Int.* 101, 173–179.
- 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. *Revista Científica UDO Agrícola*, ISSN-e 1317-9152, 9(1), 41-50
- Bósquez, M. E. Vernon, C. E.J. (2005). Effect of plasticizers and calcium on water vapor permeability of mesquite gum-candelilla wax based films. *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 4, 157-162
- Brahmachari, G. (2004). Neem - a omnipotent plant: a retrospection. *Chem Biochem* 5: 408-421.
- Bravo-Hollis, H., Sánchez-Mejorada, H. (1991). *Las cactáceas de México*, 3rd. Eds. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Carballo-Sánchez, M.P., Ramírez-Ramírez, J.C., Gimeno, M., Hall, G.M., Ríos-Durán, M.G., Shirai, K. (2016). Papaya (*Carica papaya*) and tuna (*Thunnus albacares*) by-products fermentation as biomanufacturing approach towards antioxidant protein hydrolysates. *Rev. Mex. Ing. Quim.*, 15, 91–100.
- Casimiro M.H., Botelho M.L., Leal J.P., Gil M.H. (2005). Study on chemical, UV and gamma radiation-induced grafting of 2-hydroxyethyl methacrylate onto chitosan. *Radiat. Phys. Chem.* 72, 731–735.
- Castellanos-Santiago, E., Yahia, E.M. (2008). Identification and quantification of betalains from the fruit of 10 Mexican prickly pear cultivars by high-performance liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 5758–5764.
- Chassaing, B., Koren, O., Goodrich, J. K., Poole, A. C., Srinivasan, S., Ley, R. E., Gewirtz, A. T. (2015). Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota. *Nature*, 519 (7541), 92-96.
- Chevalier, Y., Bolzinger, M. A. (2013). Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspect.*, 439, 23-24.
- Chuck-Hernández, C., Parra-Saldívar, R., Sandate-Flores, L. (2016). Pitaya (*Stenocereus* spp.). *Enycl. Food Health.*, doi:10.1016/B978-0-12-384947-2.00775-3.
- Chung, Y-S., Lee, K-K., Kim, J-W. (1998). Durable press and antimicrobial finishing of cotton fabrics with a citric acid and chitosan treatment. *Text. Res. J.*, 68(10), 772-775.
- 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.
- Cohen, E., Quistad, G. B., Casida, J. O. (1996). Cytotoxicity of nimbolide, epoxyazadiradione and other limonoids from neem insecticide. *Life Sciences*, 58, 13, 1075-1081.
- Demina, T. S., Sotnikova, Y. S., Istomin, A. V., Grandfils, C., Akopova, T. A., Zelenetskii, A. N. (2018). Preparation of Poly(L,L-Lactide) Microparticles via Pickering Emulsions Using Chitin Nanocrystals. *Advances in Materials Science and Engineering*, 1–8.

- Devlieghere, F., Vermeulen, A., Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiol*, (21), 703–714.
- Dickinson, E. (2017). Biopolymer-based particles as stabilizing agents for emulsions and foams. *Food Hydrocolloids*, (68), 219-231.
- Dos Santos, K., Coelho, J.F.J., Ferreira, P., Pinto, I., Lorenzetti, S.G., Ferreira, E.I., Higa, O.Z., Gil, M.H. (2006). Synthesis and characterization of membranes obtained by graft copolymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate and acrylic acid onto chitosan. *Int. J. Pharm.*, 310, 37–45.
- Dow Chemical Company (Midlan. M. I.), (1988). Mwthocel cellulose ethers, Technical. Technical Bulletin, 10.
- Flores-Belmont, I. A., Jimenez-Munguía, M. T. (2013). Microencapsulación de compuestos activos con quitosanos, 7-1. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7-1, 48-56.
- Focher B., Beltrame P.L., Naggi A., Torri, G. (1990). Alkaline N-Deacetylation of Chitin Enhanced by Flash Treatments. Reaction Kinetics and Structure Modifications. *Carbohydr. Polym.*, 12, 405-418 32.
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., Joaquín-Cruz, E. (2013). Physical, Chemical, and Antioxidant Activity Characterization of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) Fruits. *Plant Foods Hum Nutr*, 68:403–410.
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y., Luna-Morales, C. (2016). Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 111, 69-76.
- Garti, N., Reichman, D. (1993). Hydrocolloids as foods emulsifiers and stabilizer. *Food Structure* 12, 411-426.
- Georgé, S., Brat, P., Alter, P., Amiot, M.J., (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1370–1373.
- Gülseren, İ., Corredig, M. (2013). Interactions of chitin nanocrystals with  $\beta$ -lactoglobulin at the oil–water interface, studied by drop shape tensiometry. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 672–679.
- Helmy, W.A., Abd-Alla, H.I., Amer, H. and El-Safty, M.M. (2007). Chemical Composition and 'In-vitro' Antiviral Activity of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) Leaves and Fruits against Newcastle Disease Virus and Infectious Bursal Disease Virus. *Australian J. Basic Appl. Sci.*, 1(4), 801-812.
- Hirai A., Odani H., Nakajima A. (1991). Determination of degree of deacetylation of chitosan by  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Polym. Bull.*, 26, 87-94.
- Hernandez-Valencia, C.G., Shirai, K., Mejía, P., Blanco, S., Román, A., Yáñez, L., Escalona, H. (2016). Post-harvest Preservation of Cactus Fruits Produced in Semidesertic Areas of Oaxaca by Biopolymer Coatings. *The International Journal of Interdisciplinary Social Sciences: Annu. Rev.*, 11, 15–26.
- 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.
- Hoog, G.S., Horr , R. (2002). Molecular taxonomy of the *Alternaria* and *Ulocladium* species from humans and their identification in the routine laboratory. *Mycoses*, 45, 259-276.
- Hui, P. C., Wang, W.-Y., Kan, C.-W., Zhou, C.-E., Ng, F. S.-F., Wat, E., . . . Leung, P.-C. (2013). Preparation and characterisation of chitosan microcapsules loaded. *Int J Biol Macromol.*, 55, 32-38.

- Hurley, K. A., Santos, T. M. A., Nepomuceno, G. M., Huynh, V., Shaw, J. T., Weibel, D. B. (2016). Targeting the Bacterial Division Protein FtsZ. *J Med Chem.*, 59(15), 6975–6998
- Ifuku, S. (2014). Chitin and Chitosan Nanofibers: Preparation and Chemical modifications. *Molecules*, 19, 18367-18380.
- Ifuku, S., Nogi, M., Abe, K., Yoshioka, M., Morimoto, M., Saimoto, H., Yano, H., (2011), Simple preparation method of chitin nanofibers with a uniform width of 10 to 20 nm from prawn shell under the neutral conditions. *Carbohydr. Polym.* 84, 762.
- Ifuku, S., Hori, T., Izawa, H., Morimoto, M., Saimoto, H. (2015). Preparation of zwitterionically charged nanocrystals by surface TEMPO-mediated oxidation and partial deacetylation of  $\alpha$ -chitin. *Carbohydr Polym*, 122, 1-4.
- Ifuku, S., Nogi, M., Abe, K., Yoshioka, M., Morimoto, M., Saimoto, H., Yano, H. (2009). Preparation of chitin nanofibers with a uniform width as  $\alpha$ -chitin from crab shells. *Biomacromolecules*, 10, 1584.
- Ilio, V. D., Pasquariello, N., S. Van Der Esch, A., Cristofaro, M., Scarsella, G., Risuleo, G. (2005). Cytotoxic and antiproliferative effects induced by a non terpenoid polar extract of *A. indica* seeds on 3T6 murine fibroblasts in culture. *Mol. Cell. Biochem.*, 287, 69–77.
- Jia, X., Xu, R., Shen, W., Xie, M., Abid, M., Jabbar, S., Wang, P., Zeng, X., Wu, T. (2015). Stabilizing oil-in-water emulsion with amorphous cellulose. *Food Hydrocoll*, 43, 275–282.
- Kalashnikova, I., Bizot, H., Bertoncini, P., Cathala, B., Capron, I. (2013). Cellulosic nanorods of various aspect ratios for oil in water Pickering emulsions. *Soft Matter*, 9(3), 952–959.
- Kaneda, T. (1991). Iso- and Anteiso-Fatty Acids in Bacteria: Biosynthesis, Function, and Taxonomic Significance. *Microbiological reviews*, 288-302
- Khalequzzaman, M., Mahdi, H.A.S., Goni, O.S.H.M. (2007) Efficacy of edible oils in the control of pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. in stored pigeonpea. *Univ J Zool Rajshahi Univ* 26: 89-92.
- Kinney, A. J., (2003). Engineering Soybeans for Food and Health. *AgBio Forum*, 6(1-2), 18-22.
- Kolayli S., Ocak M., ALiyazicioglu R., Karaoglu S. (2009). Chemical Analysis and Biological Activities of Essential Oils from Trunk-Barks of Eight Trees. *Asian J Chem*, 21, 4, 2684-2694
- Kumar D., Yamada K., H., Morimoto M., Saimoto H., Ifuku S. (2013). Preparation of Chitin Nanofibers from Dry Chitin Powder by Star Burst System: Dependence on Number of Passes. *Journal of Chitin and Chitosan Science*. 1. 59-64.
- Kumar, V., Banker, G. S. (1993). Chemically-Modified Cellulosic Polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 19(1), 1-31.
- Larbi, F., García, A., del Valle, L. J., Hamou, A., Puiggali, J., Belgacem, N., Brass, J. (2018). Comparison of nanocrystals and nanofibers produced from shrimp shell  $\alpha$ -chitin: From energy production to material cytotoxicity and Pickering emulsion properties. *Carbohydr Polym*, 196, 385–397.
- 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.
- Lee J.I., Cho-Long J., Ki Chang J., Geun-Hyoung C., Hee-Dong L., Jin Hyo K. (2013). Investigation on the insecticidal limonoid content of commercial biopesticides and neem extract using solid phase extraction. *J Agr Food Chem*, 1.2,.4, 81-85.

- Lee, D., Lee, N., Kwon, I. (2018). Efficient loading of ophthalmic drugs with poor loadability into contact lenses using functional comonomers. *Biomaterials Science*.
- Li, X. F., Feng, X. Q., Yang, S., Wang, T. P., Su, Z. X. (2008). Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against *Aspergillus niger*. *Iran. Polym. J.*, 17, 843-852.
- Li, X.; Li, M., Wang, J., Wang, L.; Han, C.; Jin, P.; Zheng, Y. (2018). Methyl jasmonate enhances wound-induced phenolic accumulation in pitaya fruit by regulating sugar content and energy status. *Postharvest Biol. Technol.*, 137, 106–112,
- Loeza, C. J. (2007). Modificación enzimática de la goma de mezquite para la obtención de L-arabinosa. México: Tesis para obtener el grado de Doctor en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Maguna, F. P., Romero, A. M., Garro, O. A., Okulik, N. B. (2006). Actividad Antimicrobiana de un grupo de Terpenoides. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.
- Manoj, P., Nayak, P. (2012). Graft copolymerization of methyl acrylate on chitosan: Initiated by ceric ammonium nitrate as the initiator-characterization and antimicrobial activity. *Adv Appl Sci Res*, 3 (3):1646-1654.
- 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. *Revista Tecnocientífica Universidad Rafael Urdancia*, 53-58.
- Martínez-Castellanos, G., Shirai, K., Pelayo-Zaldivar, C., Perez-Flores, L., Sepulveda-Sanchez, J. (2009). Effect of *Lb. plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Food Microbiology* 26, 444–449.
- McClements, D. J. (2004). *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*. Second Edition. Edit., CRC Press, USA.
- Messina, M., Gardner, C., Barnes, S. (2002). Gaining insight into the health effects of soy but a long way still to go. *Journal of Nutrition*, 132, 547S-551S.
- Mikulcová, V., Bordes, R., Kašpárková, V. (2016). On the preparation and antibacterial activity of emulsions stabilized with nanocellulose particles. *Food Hydrocoll*, 61, 780–792.
- Mohammed, H. A., Omer, A. A. (2015). Antibacterial Activity of *Azadirachta indica* (Neem) Leaf Extract against Bacterial Pathogens in Sudan. *Am J Res Commun*, 3(5).
- Moller, H., Grelier, S., Pardon, P., Coma, V. (2004). Antimicrobial and physicochemical properties of chitosan-H- based films. *J Agric Food Chem*, 52:6585-6591.
- Moreno-Castillo, E. J., Gonzalez-Garcia, R., Grajales-Lagunes, A., Ruiz-Cabrera, M. A., Abud-Archila, M., (2005). Water Diffusivity and Color of Cactus Pear Fruits (*Opuntia Ficus Indica*) Subjected to Osmotic Dehydration. *Int J Food Prop*, 8(2), 323–336.
- Moreno, D. A., García-Viguera, C., Gil, J. I., Gil-Izquierdo, A. (2008). Betalains in the era of global agri-food science, technology and nutritional health. *Phytochem Rev*, 7, 261–280.
- Morgan, E.D. Azadirachtin, a scientific gold mine (2009), *Bioorg. Med. Chem*, 17, 4096-4105.
- Moslem, M.A., El-Kholie, E. M. (2009). Effect of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds and leaves extract on some plant pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 12 (14), 1045-1048
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.

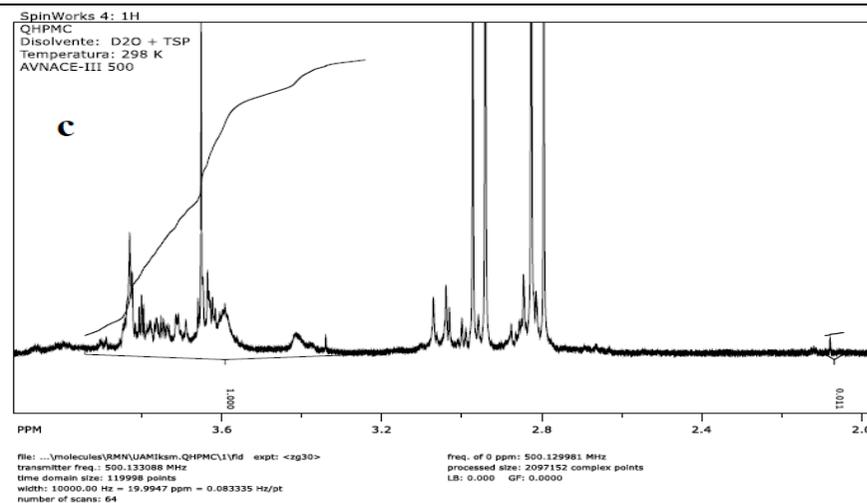
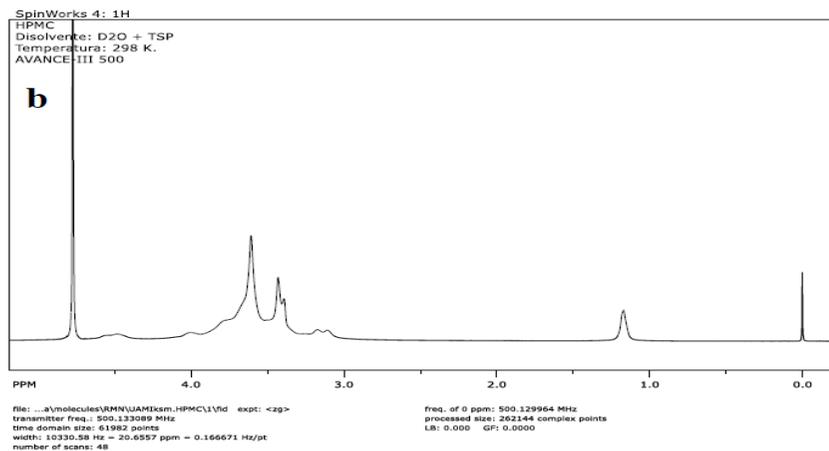
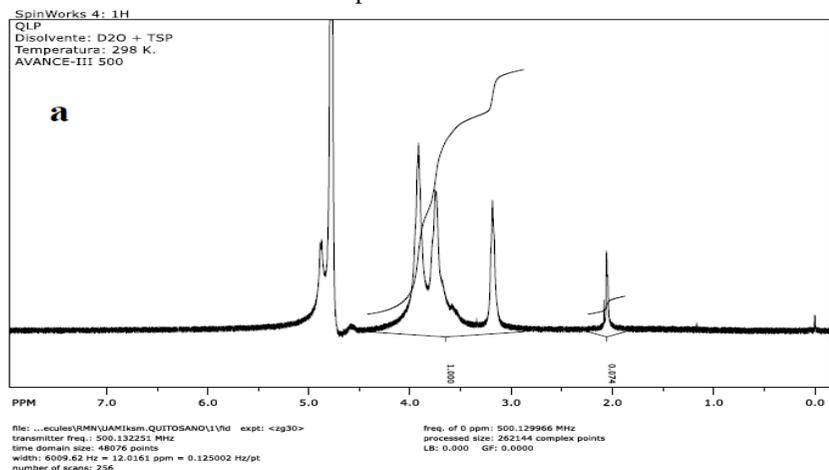
- Mostafa, A.A., Al-Rahmah, A.N., Adel-Megeed, A. (2011). Evaluation of some plant extracts for their antifungal and antiaflatoxigenic activities. *J. Med. Plant. Res.* 517, 4231–4238.
- Muñoz, D. C., Ledesma, S. J., Chávez, V. A., Pérez-Gil, R. F., Mendoza, M. E., Castañeda, L. J., Calvo, C., Castro, G. I., Sánchez, C. C., Ávila, C. A. (2002). *Los Alimentos y sus Nutrientes. Tablas de Valor Nutritivo de Alimentos.* Mc Graw Hill Interamericana, México. 203
- Nahak, G., Sahu, K.R. (2010). In vitro antioxidative activity of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* Leaves by DPPH scavenging assay. *J. Nat. Sci.*, 8, 4.
- Nerd, A., Mizrahi, Y. (1999). The effect of ripening stage on fruit quality after storage of yellow pitaya. *Postharvest Biol Technol*, 15(2), 99–105.
- Nerd, A., Gutman, F., Mizrahi, Y. (1999). Ripening and postharvest behaviour of fruits of two *Hylocereus* species (Cactaceae). *Postharvest Biol. Technol.*, 17, 39–45.
- Nicio, C. A. A. (2011). *Síntesis y caracterización de películas de quitosano-cítrico-H.* (Tesis para obtener el título de química de alimentos). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ochoa-Velasco, C.E., Guerrero-Beltrán, J.A. (2014). Postharvest quality of peeled prickly pear fruit treated with acetic acid and chitosan. *Postharvest Biol. Technol.*, 92, 139–145.
- Oh, D. H., Balakrishnan, P., Oh, Y. K., Kim, D. D., Yong, C. S., Choi, H. G. (2011). Effect of process parameters on nanoemulsion droplet size and distribution in SPG membrane emulsification. *Int J Pharm*, 191-197.
- Okemo, P.O., Mwatha, W.E., Chhabra, S.C., Fabry, W. (2001). The kill kinetics of *Azadirachta indica* a joss (Meliaceae) extracts on *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Afr. J. Sci. Technol.*; 2: 113-118.
- Oloyede, G. K. (2016). Toxicity, antimicrobial and antioxidant activities of methyl salicylate dominated essential oils of *Laportea aestuans* (Gaud). *Arab J Chem*, 9, S840–S845.
- 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*. 12, 3285-3290.
- Pang, K., Ding, B., Liu, X., Wu, H., Duan, Y., & Zhang, J. (2017). High-yield preparation of a zwitterionically charged chitin nanofiber and its application in a doubly pH-responsive Pickering emulsion. *Green Chemistry*, 19(15), 3665-3670.
- Pankaj, B., Opara, U., Al-Said, F. (2012). Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review. *Food Bioprocess Technol.* 6, 36–60,
- Parra, F., Blancas, J.J., Casas, A. (2012). Landscape management and domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley: human-guided selection and gene flow. *J Ethnobiol Ethnomed*, 8, 32.
- Paul, V., Pandey, R., Srivastava, G.C. (2012). The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene—An overview. *J. Food Sci. Technol.* 49, 1–21.
- Perrin, E., Bizot, H., Cathala, B., Capron, I. (2014). Chitin Nanocrystals for Pickering High Internal Phase Emulsions. *Biomacromolecules*, 15(10), 3766–3771.
- Pinedo-Espinoza, J., Franco-Bañuelos, A., Hernández-Fuentes, A. D. (2010). Comportamiento poscosecha de cultivares de tuna por efecto del manejo del huerto y temperatura de frigoconservación. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 11,1, 43-58

- Quintero, C., Falguera, V., Muñoz, H., (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Ciencias-Química. MBAGA.*, 93-118.
- Rabea, E. T., Badawy, M. E., Stevens, C. V., Smagghe, G., Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4, 1457-1465.
- Radhakumary, C., Divya, G., Nair, P. D., Mathew, S., Reghunadhan, Nair C. P. (2003). Graft Copolymerization of 2-Hydroxy Ethyl Methacrylate onto Chitosan with Cerium (IV) Ion. I. Synthesis and Characterization, *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, 40(7), 715-730.
- Raizada, R.B. Srivastava M.K., Kaushal R.A., Singh R.P. 2001. Azadirachtin, A Neem Biopesticide: Subchronic Toxicity Assessment in Rats', *Food Chem. Toxicol.*, 477-483 [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(00\)00153-8](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(00)00153-8)
- Raja R.R., Kumari K. C., Lokanatha O., Mamatha S., Reddy D. C. (2013). Antimicrobial activity of Azadirachta Indica (neem) leaf, bark and seed extracts *Int. J. Res. Phytochem. Pharmacol.*, 3(1), 1-4.
- Repetto, G., Peso, A., Zurita, J. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nature Publishing Group.*, 3(7), 1125-1131
- 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 Ingenieria Quimica*, 7(3), 299-307.
- Román-Guerrero, A., Orozco, V. J., Pérez, O. J.P., Cruz, S. F., Jiménez, A-R. y Vernon-Carter, 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.
- Ruíz, R. (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. México: Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.
- Sánchez, R. R., Damas, R., Domínguez, P., Cerezo, P., Salcedo, I., Aguzzi, C. (2010). Uso de la HidroxiPropilMetilCelulosa (HPMC) en liberación modificada de fármacos. *Farmaespaña Ind*, 48-51.
- Sandoval, L.N., López, M., Montes-Díaz, E., Espadín, A., Tecante, A., Gimeno, M., Shirai, K. (2016). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fresh Cheese using Chitosan-grafted Lactic Acid Packaging. *Molecules*, 21, 469.
- Šarac, Z. Matejić, J. S., Stojanović-Radić, Z. Z., Veselinović, J. B., Džamić, A. M., Bojović, S., Marin, P. D. (2014). Biological Activity of *Pinus nigra* terpenes-Evaluation of FtsZ Inhibition by Selected Compounds as Contribution to Their Antimicrobial Activity. *Comput. Biol. Med.*, 54, 72-78.
- 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. *J. Chromatogr. A.*, 886 (1-2), 89-97.
- Sharma, C., Vas, A. J., Goala, P., Gheewala, T. M., Rizvi, T. A., Hussain, A. (2014). Ethanolic Neem (*Azadirachta indica*) Leaf Extract Prevents Growth of MCF-7 and HeLa Cells and Potentiates the Therapeutic Index of Cisplatin. *Journal of Oncology*, 1-10.

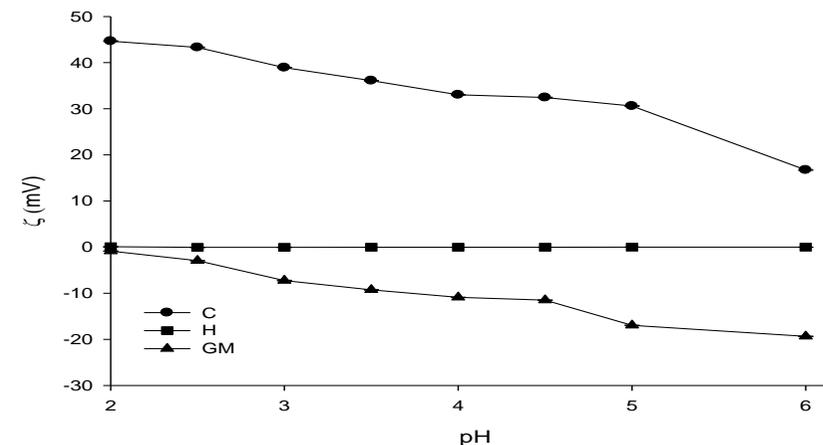
- Shirai K., Guerrero I., Huerta S., Saucedo G., Castillo A., González O., Hall G. (2001). Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme and Microbial Technol* 28, 446–452
- SIAP, (2018). Atlas Agroalimentario 2012-2018. 1ra edición. [https://nube.siap.gob.mx/gobmx\\_publicaciones\\_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018](https://nube.siap.gob.mx/gobmx_publicaciones_siap/pag/2018/Atlas-Agroalimentario-2018)
- Sithisarn P., Supabphol R., Gritsanapan W. (2005). Antioxidant activity of Siamese neem tree (VP1209). *J Ethnopharmacol*, 9, 109–112.
- Toivonen, P.M.A., DeEll, J.R., (2002). Physiology of fresh-cut fruits and vegetables. In: Lamikanra, O. (Ed.), *Fresh-Cut Fruits and Vegetables: Science, Technology, and Market*. CRC Press LLC, Washington, USA.
- Tzoumaki, M. V., Karefyllakis, D., Moschakis, T., Biliaderis, C. G., Scholten, E. (2015). Aqueous foams stabilized by chitin nanocrystals. *Soft Matter*, 11(31), 6245–6253.
- Tzoumaki, M. V., Moschakis, T., Kiosseoglou, V., Biliaderis, C. G. (2011). Oil-in-water emulsions stabilized by chitin nanocrystal particles. *Food Hydrocoll*, 25(6), 1521–1529.
- Uribe, S., Rangel, P., Espinola, G., Aguirre, G. (1990). Effects of Cyclohexane, an Industrial Solvent, on the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* and on Isolated Yeast Mitochondria. *J Appl Environ Microbiol.*, 2114-2119.
- Vandenhoff, G., Gunstone, F. D., Barve, J., Lands, W. E. (1975). Inhibition of growth of microbial mutants by trans-octadecenoates. *J. Biol. Chem.* 250:8720-8727.
- Varshney, H., Ahmad, A., Rauf, A., Husain, F., Ahmad, I. (2014). Synthesis and antimicrobial evaluation of fatty chain substituted 2,5-dimethyl pyrrole and 1,3-benzoxazin-4-one derivatives. *J Saudi Chem Soc*, 21, S394-S402
- 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.
- Verlee, A., Mincke, S., Stevens, C.V., (2017). Recent developments in antibacterial and antifungal chitosan and its derivatives. *Carbohydr. Polym.*, 164, 268-283.
- Vernon-Carter, E.J.; Beristain, C.I.; Pedroza, I.R. (2000). Mesquite gum (*Prosopis* gum). *Dev. Food Sci.*, 41, 217–238.
- Vila Jato, J. L. (1997). *Tecnología Farmacéutica* (Vol. 1). Madrid., España: Síntesis. S.A.
- Wang, J, Li J, Cao, J, and Jiang, W. (2010). Antifungal activities of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on postharvest diseases in fruits. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 4, 1100-1104
- Wijewardane, R. M. N. A., Guleria, S.P. S. (2013). Effect of pre-cooling, fruit coating and packaging on postharvest quality of Apple. *J Food Sci Technol.*, 50, 325–331.
- Yang, C. Q. (1993). Effect of pH on Nanoformaldehyde Durable Press Finishing of Cotton Fabric: FT-IR Spectroscopy Study. *Text. Res. J.*, 63(12), 706-711
- Yehia, H. M. (2016). Methanolic Extract of Neem Leaf (*Azadirachta indica*) and its Antibacterial Activity Against Foodborne and Contaminated Bacteria on Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 16 (3): 598-604.
- Yin, D., Jia, Y., Chen, J., Zhang, B. (2018). Design of microencapsulated phase change material by one-step swelling polymerization in Pickering emulsion. *J. Mater. Sci.*, 53(10), 7249–7257.
- Zhang, Y., Chen, Z., Bian, W., Feng, L., Wu, Z., Wang, P., Wu, T. (2015). Stabilizing oil-in-water emulsions with regenerated chitin nanofibers. *Food Chem.*, 183, 115–121.

## 16 ANEXOS

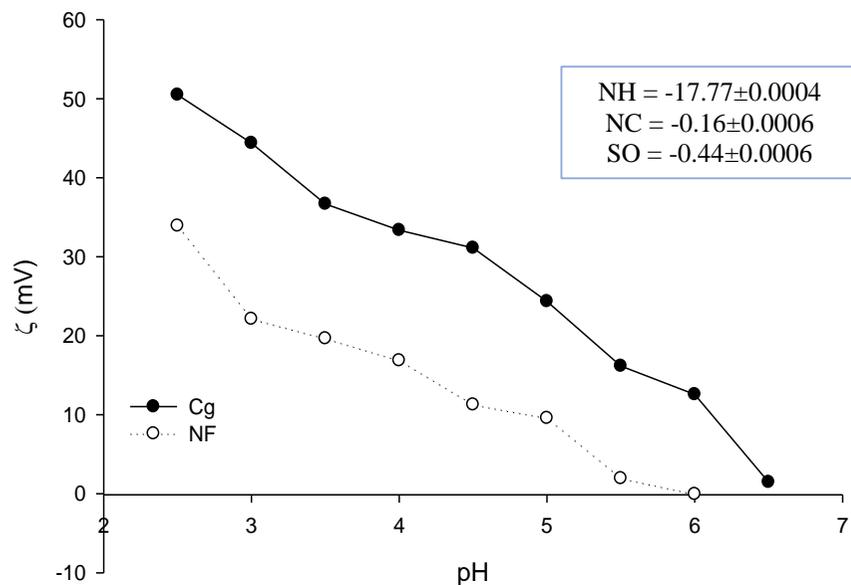
A1) Espectros de (a) CT, (b) hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) y CH (c) obtenidos por  $^1\text{H-NMR}$



A2) Determinación de potencial zeta ( $\zeta$ ) de polímeros presentes en las emulsiones clásicas



A3) Determinación de potencial zeta ( $\zeta$ ) de polímeros presentes en las emulsiones pickering y de los diferentes tipos de fase dispersa NH (hoja de neem), NC (neem comercial), SO (aceite de soja)



A4) Análisis estadísticos

ETAPA 1. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NEEM, QUITINA Y QUITOSANO

I. Citotoxicidad

Diseño experimental

1) Control

2) Etanol

3) HNM

a) Recuento celular

Response Eritrocitos

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Trat	2	15006.38	7503.191	6.41	0.002788*	0.890578
S	69	80721.45	1169.876			
Total (Adjusted)	71	95727.84				
Total	72					

\* Term significant at alpha = 0.05

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: Eritrocitos

Term A: Trat

Alpha=0.050 Error Term=S DF=69 MSE=1169.876 Critical Value=3.3875

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	24	67.31667	3, 1
3	24	95.35229	2
1	24	100	2

Response Leucocitos

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Trat	2	2234.532	1117.266	0.31	0.733676	0.097613
S	69	247816.8	3591.548			
Total (Adjusted)	71	250051.3				
Total	72					

\* Term significant at alpha = 0.05

<p>Response            Plaquetas</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>2</td> <td>10056.71</td> <td>5028.357</td> <td>3.91</td> <td>0.024690*</td> <td>0.686450</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>69</td> <td>88799.03</td> <td>1286.943</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>71</td> <td>98855.74</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>72</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Plaquetas Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=69 MSE=1286.943 Critical Value=3.3875</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>24</td> <td>76.82291</td> <td>3,1</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>24</td> <td>100</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>24</td> <td>103.4335</td> <td>2,3</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	2	10056.71	5028.357	3.91	0.024690*	0.686450	S	69	88799.03	1286.943				Total (Adjusted)	71	98855.74					Total	72						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	24	76.82291	3,1	1	24	100	2	3	24	103.4335	2,3	<p>Response            RN</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>2</td> <td>38109.36</td> <td>19054.68</td> <td>16.29</td> <td>0.000005*</td> <td>0.999307</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>44</td> <td>51453.62</td> <td>1169.401</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>46</td> <td>89562.98</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>47</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: RN Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=44 MSE=1169.401 Critical Value=3.4302</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>15</td> <td>83.69733</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>18</td> <td>100</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>14</td> <td>153.0521</td> <td>2, 1</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	2	38109.36	19054.68	16.29	0.000005*	0.999307	S	44	51453.62	1169.401				Total (Adjusted)	46	89562.98					Total	47						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	15	83.69733	3	1	18	100	3	3	14	153.0521	2, 1
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: Trat	2	10056.71	5028.357	3.91	0.024690*	0.686450																																																																																																													
S	69	88799.03	1286.943																																																																																																																
Total (Adjusted)	71	98855.74																																																																																																																	
Total	72																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																
2	24	76.82291	3,1																																																																																																																
1	24	100	2																																																																																																																
3	24	103.4335	2,3																																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: Trat	2	38109.36	19054.68	16.29	0.000005*	0.999307																																																																																																													
S	44	51453.62	1169.401																																																																																																																
Total (Adjusted)	46	89562.98																																																																																																																	
Total	47																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																
2	15	83.69733	3																																																																																																																
1	18	100	3																																																																																																																
3	14	153.0521	2, 1																																																																																																																
<p>Response            MTT</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>2</td> <td>22529.47</td> <td>11264.74</td> <td>10.80</td> <td>0.000153*</td> <td>0.985781</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>44</td> <td>45901.63</td> <td>1043.219</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>46</td> <td>68431.1</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>47</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: MTT Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=44 MSE=1043.219 Critical Value=3.4302</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>18</td> <td>100</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>15</td> <td>124.1347</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>14</td> <td>153.4807</td> <td>1, 3</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	2	22529.47	11264.74	10.80	0.000153*	0.985781	S	44	45901.63	1043.219				Total (Adjusted)	46	68431.1					Total	47						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	18	100	2	3	15	124.1347	2	2	14	153.4807	1, 3	<p>ETAPA II. FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE EMULSIONES O/W</p> <p>Diseño experimental</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) NCH</li> <li>2) NCGM</li> </ol> <p>a) Caracterización de emulsiones</p>																																																									
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: Trat	2	22529.47	11264.74	10.80	0.000153*	0.985781																																																																																																													
S	44	45901.63	1043.219																																																																																																																
Total (Adjusted)	46	68431.1																																																																																																																	
Total	47																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																
1	18	100	2																																																																																																																
3	15	124.1347	2																																																																																																																
2	14	153.4807	1, 3																																																																																																																

<p>Response Tamaño</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Tratamiento</td> <td>1</td> <td>357837.5</td> <td>357837.5</td> <td>164366.65</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>4</td> <td>8.708275</td> <td>2.177069</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>5</td> <td>357846.2</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: D_3_2_</p> <p>Term A: Tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=4 MSE=2.177069 Critical Value=3.9263</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>1.8701</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>3</td> <td>451.22</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>							Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Tratamiento	1	357837.5	357837.5	164366.65	0.000000*	1.000000	S	4	8.708275	2.177069				Total (Adjusted)	5	357846.2					Total	6						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	3	1.8701	1	1	3	451.22	2	<p>Response pot_zeta</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Tratamiento</td> <td>1</td> <td>1896.77</td> <td>1896.77</td> <td>1835.91</td> <td>0.000002*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>4</td> <td>4.1326</td> <td>1.03315</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>5</td> <td>1900.903</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: pot_zeta</p> <p>Term A: Tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=4 MSE=1.03315 Critical Value=3.9263</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>-15.3</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>3</td> <td>20.26</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table> <p>b) Evaluación de recubrimientos en conservación de pitaya</p> <p>i) Bioensayo 1</p> <p>Diseño experimental:</p> <p>1.1 Control</p> <p>2.1 CS</p> <p>4.1 NCH</p>							Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Tratamiento	1	1896.77	1896.77	1835.91	0.000002*	1.000000	S	4	4.1326	1.03315				Total (Adjusted)	5	1900.903					Total	6						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	3	-15.3	1	1	3	20.26	2
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																					
A: Tratamiento	1	357837.5	357837.5	164366.65	0.000000*	1.000000																																																																																																					
S	4	8.708275	2.177069																																																																																																								
Total (Adjusted)	5	357846.2																																																																																																									
Total	6																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																								
2	3	1.8701	1																																																																																																								
1	3	451.22	2																																																																																																								
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																					
A: Tratamiento	1	1896.77	1896.77	1835.91	0.000002*	1.000000																																																																																																					
S	4	4.1326	1.03315																																																																																																								
Total (Adjusted)	5	1900.903																																																																																																									
Total	6																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																								
2	3	-15.3	1																																																																																																								
1	3	20.26	2																																																																																																								
<p>Response span</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Tratamiento</td> <td>1</td> <td>4.628817</td> <td>4.628817</td> <td>54.08</td> <td>0.001821*</td> <td>0.999428</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>4</td> <td>0.3423547</td> <td>8.558866E-02</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>5</td> <td>4.971171</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: span</p> <p>Term A: Tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=4 MSE=8.558866E-02 Critical Value=3.9263</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>3</td> <td>0.7753333</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>2.532</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>							Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Tratamiento	1	4.628817	4.628817	54.08	0.001821*	0.999428	S	4	0.3423547	8.558866E-02				Total (Adjusted)	5	4.971171					Total	6						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	3	0.7753333	2	2	3	2.532	1																																																						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																					
A: Tratamiento	1	4.628817	4.628817	54.08	0.001821*	0.999428																																																																																																					
S	4	0.3423547	8.558866E-02																																																																																																								
Total (Adjusted)	5	4.971171																																																																																																									
Total	6																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																								
1	3	0.7753333	2																																																																																																								
2	3	2.532	1																																																																																																								

Response PFP							Response a						
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>	<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
<b>Term</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>						<b>Term</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>					
A: trat	2	14.10944	7.054721	57.11	0.000000*	1.000000	A: trat	2	1465.326	732.663	41.02	0.000000*	1.000000
B: tiemp	12	297.144	24.762	200.45	0.000000*	1.000000	S(A)	267	4768.477	17.85946			
AB	24	9.23345	0.3847271	3.11	0.000082*	0.999668	Total (Adjusted)	269	6233.802				
S	78	9.63555	0.1235327				Total	270					
Total (Adjusted)	116	330.1224											
Total	117												
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>							<b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b>						
Response: pfp							Response: a						
Term A: trat							Term A: trat						
Alpha=0.050 Error Term=S DF=78 MSE=0.1235327 Critical Value=1.9908							Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=267 MSE=17.85946 Critical Value=3.3331						
<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>				<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>			
4.1	39	2.366658	2.1, 1.1				1.1	108	5.658241	2.1, 4.1			
2.1	39	2.593334	4.1, 1.1				2.1	81	8.937778	1.1, 4.1			
1.1	39	3.19002	4.1, 2.1				4.1	81	11.19457	1.1, 2.1			
Response Luminosidad							Response b						
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>	<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
<b>Term</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>						<b>Term</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>					
A: trat	2	534.8411	267.4205	20.37	0.000000*	0.999971	A: trat	2	431.9683	215.9842	16.29	0.000000*	0.999610
S(A)	267	3504.711	13.12626				S(A)	267	3540.04	13.25858			
Total (Adjusted)	269	4039.552					Total (Adjusted)	269	3972.008				
Total	270						Total	270					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
<b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b>							<b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b>						
Response: L							Response: b						
Term A: trat							Term A: trat						
Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=267 MSE=13.12626 Critical Value=3.3331							Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=267 MSE=13.25858 Critical Value=3.3331						
<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>				<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>			
2.1	81	37.05852	1.1				1.1	108	8.777408	2.1, 4.1			
4.1	81	38.02592	1.1				2.1	81	10.35074	1.1, 4.1			
1.1	108	40.31148	2.1, 4.1				4.1	81	11.81765	1.1, 2.1			

Response Inhibición fúngica							Response PFP						
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term	(Alpha=0.05)						Term	(Alpha=0.05)					
A: trat	1	842.7463	842.7463	18.50	0.000430*	0.982226	A: Trat	3	6.525877	2.175292	23.89	0.000000*	1.000000
B: tiemp	2	215.1536	107.5768	2.36	0.122821	0.415038	B: tiemp	12	277.529	23.12741	253.97	0.000000*	1.000000
AB	2	98.07462	49.03731	1.08	0.361758	0.208959	AB	36	4.513077	0.1253633	1.38	0.107990	0.960973
S	18	819.9896	45.55498				S	104	9.470757	9.106497E-02			
Total (Adjusted)	23	1975.964					Total (Adjusted)	155	298.0387				
Total	24						Total	156					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>							<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>						
Response: Inh							Response: PFP_acumx						
Term A: trat							Term A: Trat						
Alpha=0.050 Error Term=S DF=18 MSE=45.55498 Critical Value=2.1009							Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=104 MSE=9.106497E-02 Critical Value=1.9830						
Group	Count	Mean	Different From Groups				Group	Count	Mean	Different From Groups			
2.1	12	77.50063	4.1				3.1	39	2.289656	4.1, 2.1, 1.1			
4.1	12	89.35211	2.1				4.1	39	2.467222	3.1, 1.1			
							2.1	39	2.664107	3.1, 1.1			
							1.1	39	2.833591	3.1, 4.1, 2.1			
ii) Bioensayo 2							Response L						
<b>Diseño experimental:</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
1.2 Control							Source						
2.1 CS							Term						
3.1 NCH							DF						
4.1 NCGM							Sum of Squares						
							(Alpha=0.05)						
							Mean Square						
							F-Ratio						
							Prob Level						
							Power						
							A: Trat						
							S(A)						
							Total (Adjusted)						
							Total						
							* Term significant at alpha = 0.05						
							<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>						
							Response: L						
							Term A: Trat						
							Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=451 MSE=20.22871 Critical Value=1.9652						
							Group						
							Count						
							Mean						
							Different From Groups						
							1.1						
							3.1						
							2.1						
							4.1						

<p>Response a</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>3</td> <td>602.1302</td> <td>200.7101</td> <td>12.93</td> <td>0.000000*</td> <td>0.999865</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>451</td> <td>7000.966</td> <td>15.52321</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>454</td> <td>7603.096</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>455</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: a Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=451 MSE=15.52321 Critical Value=1.9652</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.1</td> <td>131</td> <td>10.86863</td> <td>3.1, 2.1, 4.1</td> </tr> <tr> <td>3.1</td> <td>108</td> <td>12.12343</td> <td>1.1, 2.1, 4.1</td> </tr> <tr> <td>2.1</td> <td>108</td> <td>13.48861</td> <td>1.1, 3.1</td> </tr> <tr> <td>4.1</td> <td>108</td> <td>13.61491</td> <td>1.1, 3.1</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	3	602.1302	200.7101	12.93	0.000000*	0.999865	S(A)	451	7000.966	15.52321				Total (Adjusted)	454	7603.096					Total	455						Group	Count	Mean	Different From Groups	1.1	131	10.86863	3.1, 2.1, 4.1	3.1	108	12.12343	1.1, 2.1, 4.1	2.1	108	13.48861	1.1, 3.1	4.1	108	13.61491	1.1, 3.1	<p>Response Inhibición fúngica</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>451.6311</td> <td>225.8156</td> <td>0.79</td> <td>0.481091</td> <td>0.146231</td> </tr> <tr> <td>B: tiemp</td> <td>2</td> <td>8332.598</td> <td>4166.299</td> <td>14.66</td> <td>0.001475*</td> <td>0.986024</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>4</td> <td>1977.383</td> <td>494.3457</td> <td>1.74</td> <td>0.225078</td> <td>0.341919</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>9</td> <td>2557.867</td> <td>284.2075</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>17</td> <td>13319.48</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>18</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>iii) Bioensayo 3</p> <p>Diseño experimental:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>Control</li> <li>CS</li> <li>CH</li> <li>NCH</li> <li>NCGM</li> </ol> <p>Response pfp</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>4</td> <td>19.15249</td> <td>4.788123</td> <td>167.98</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>B: tiemp</td> <td>12</td> <td>410.1885</td> <td>34.18237</td> <td>1199.20</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>48</td> <td>11.78509</td> <td>0.2455227</td> <td>8.61</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>82</td> <td>2.337354</td> <td>2.850431E-02</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>146</td> <td>475.5851</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>147</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: pfp Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=82 MSE=2.850431E-02 Critical Value=1.9893</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td>32</td> <td>2.214856</td> <td>3, 5, 1, 2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>29</td> <td>2.809776</td> <td>4, 5, 1, 2</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>27</td> <td>2.94187</td> <td>4, 3, 1, 2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>28</td> <td>3.086282</td> <td>4, 3, 1, 2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>31</td> <td>3.106032</td> <td>4, 3, 5, 2</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	451.6311	225.8156	0.79	0.481091	0.146231	B: tiemp	2	8332.598	4166.299	14.66	0.001475*	0.986024	AB	4	1977.383	494.3457	1.74	0.225078	0.341919	S	9	2557.867	284.2075				Total (Adjusted)	17	13319.48					Total	18						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	4	19.15249	4.788123	167.98	0.000000*	1.000000	B: tiemp	12	410.1885	34.18237	1199.20	0.000000*	1.000000	AB	48	11.78509	0.2455227	8.61	0.000000*	1.000000	S	82	2.337354	2.850431E-02				Total (Adjusted)	146	475.5851					Total	147						Group	Count	Mean	Different From Groups	4	32	2.214856	3, 5, 1, 2	3	29	2.809776	4, 5, 1, 2	5	27	2.94187	4, 3, 1, 2	2	28	3.086282	4, 3, 1, 2	1	31	3.106032	4, 3, 5, 2
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																								
A: Trat	3	602.1302	200.7101	12.93	0.000000*	0.999865																																																																																																																																																																																								
S(A)	451	7000.966	15.52321																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	454	7603.096																																																																																																																																																																																												
Total	455																																																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																											
1.1	131	10.86863	3.1, 2.1, 4.1																																																																																																																																																																																											
3.1	108	12.12343	1.1, 2.1, 4.1																																																																																																																																																																																											
2.1	108	13.48861	1.1, 3.1																																																																																																																																																																																											
4.1	108	13.61491	1.1, 3.1																																																																																																																																																																																											
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																								
A: trat	2	451.6311	225.8156	0.79	0.481091	0.146231																																																																																																																																																																																								
B: tiemp	2	8332.598	4166.299	14.66	0.001475*	0.986024																																																																																																																																																																																								
AB	4	1977.383	494.3457	1.74	0.225078	0.341919																																																																																																																																																																																								
S	9	2557.867	284.2075																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	17	13319.48																																																																																																																																																																																												
Total	18																																																																																																																																																																																													
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																								
A: trat	4	19.15249	4.788123	167.98	0.000000*	1.000000																																																																																																																																																																																								
B: tiemp	12	410.1885	34.18237	1199.20	0.000000*	1.000000																																																																																																																																																																																								
AB	48	11.78509	0.2455227	8.61	0.000000*	1.000000																																																																																																																																																																																								
S	82	2.337354	2.850431E-02																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	146	475.5851																																																																																																																																																																																												
Total	147																																																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																											
4	32	2.214856	3, 5, 1, 2																																																																																																																																																																																											
3	29	2.809776	4, 5, 1, 2																																																																																																																																																																																											
5	27	2.94187	4, 3, 1, 2																																																																																																																																																																																											
2	28	3.086282	4, 3, 1, 2																																																																																																																																																																																											
1	31	3.106032	4, 3, 5, 2																																																																																																																																																																																											

<p>Response pH</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>4</td> <td>0.414835</td> <td>0.1037088</td> <td>2.21</td> <td>0.129257</td> <td>0.475277</td> </tr> <tr> <td>B: tiemp</td> <td>3</td> <td>6.219028E-02</td> <td>2.073009E-02</td> <td>0.44</td> <td>0.727456</td> <td>0.114006</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>12</td> <td>1.311189</td> <td>0.1092657</td> <td>2.33</td> <td>0.078760</td> <td>0.684459</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>12</td> <td>0.5632</td> <td>4.693333E-02</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>31</td> <td>3.449888</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>32</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	4	0.414835	0.1037088	2.21	0.129257	0.475277	B: tiemp	3	6.219028E-02	2.073009E-02	0.44	0.727456	0.114006	AB	12	1.311189	0.1092657	2.33	0.078760	0.684459	S	12	0.5632	4.693333E-02				Total (Adjusted)	31	3.449888					Total	32						<p>Response STT_ATT</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power (Alpha=0.05)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>4</td> <td>822.3801</td> <td>205.595</td> <td>3.15</td> <td>0.030008*</td> <td>0.744391</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>27</td> <td>1760.95</td> <td>65.22037</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>31</td> <td>2583.33</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>32</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: STT_ATT Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=27 MSE=65.22037 Critical Value=2.0518</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>6</td> <td>39.66867</td> <td>1, 2</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>6</td> <td>39.72417</td> <td>1, 2</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>6</td> <td>44.84933</td> <td></td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>8</td> <td>48.73763</td> <td>3, 5</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>6</td> <td>52.9395</td> <td>3, 5</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)	A: trat	4	822.3801	205.595	3.15	0.030008*	0.744391	S(A)	27	1760.95	65.22037				Total (Adjusted)	31	2583.33					Total	32						Group	Count	Mean	Different From Groups	3	6	39.66867	1, 2	5	6	39.72417	1, 2	4	6	44.84933		1	8	48.73763	3, 5	2	6	52.9395	3, 5
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																			
A: Trat	4	0.414835	0.1037088	2.21	0.129257	0.475277																																																																																																																			
B: tiemp	3	6.219028E-02	2.073009E-02	0.44	0.727456	0.114006																																																																																																																			
AB	12	1.311189	0.1092657	2.33	0.078760	0.684459																																																																																																																			
S	12	0.5632	4.693333E-02																																																																																																																						
Total (Adjusted)	31	3.449888																																																																																																																							
Total	32																																																																																																																								
Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)																																																																																																																			
A: trat	4	822.3801	205.595	3.15	0.030008*	0.744391																																																																																																																			
S(A)	27	1760.95	65.22037																																																																																																																						
Total (Adjusted)	31	2583.33																																																																																																																							
Total	32																																																																																																																								
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																						
3	6	39.66867	1, 2																																																																																																																						
5	6	39.72417	1, 2																																																																																																																						
4	6	44.84933																																																																																																																							
1	8	48.73763	3, 5																																																																																																																						
2	6	52.9395	3, 5																																																																																																																						
<p>Response TA</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>4</td> <td>0.0015</td> <td>0.000375</td> <td>0.43</td> <td>0.786663</td> <td>0.117585</td> </tr> <tr> <td>B: tiemp</td> <td>3</td> <td>4.583188E-04</td> <td>1.527729E-04</td> <td>0.17</td> <td>0.912029</td> <td>0.073684</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>12</td> <td>1.110213E-02</td> <td>9.251779E-04</td> <td>1.05</td> <td>0.465235</td> <td>0.323883</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>12</td> <td>0.0105455</td> <td>8.787917E-04</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>31</td> <td>4.846322E-02</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>32</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	4	0.0015	0.000375	0.43	0.786663	0.117585	B: tiemp	3	4.583188E-04	1.527729E-04	0.17	0.912029	0.073684	AB	12	1.110213E-02	9.251779E-04	1.05	0.465235	0.323883	S	12	0.0105455	8.787917E-04				Total (Adjusted)	31	4.846322E-02					Total	32						<p>Response Angulo de contacto</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>4</td> <td>1424.66</td> <td>356.1651</td> <td>631.27</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>10</td> <td>5.641998</td> <td>0.5641998</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>14</td> <td>1430.302</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: angulo Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=10 MSE=0.5641998 Critical Value=2.2281</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>3</td> <td>50.00767</td> <td>1, 3, 4</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>50.041</td> <td>1, 3, 4</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>3</td> <td>61.24533</td> <td>5, 2, 4</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>3</td> <td>61.791</td> <td>5, 2, 4</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3</td> <td>76.46633</td> <td>5, 2, 1, 3</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	4	1424.66	356.1651	631.27	0.000000*	1.000000	S	10	5.641998	0.5641998				Total (Adjusted)	14	1430.302					Total	15						Group	Count	Mean	Different From Groups	5	3	50.00767	1, 3, 4	2	3	50.041	1, 3, 4	1	3	61.24533	5, 2, 4	3	3	61.791	5, 2, 4	4	3	76.46633	5, 2, 1, 3
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																			
A: Trat	4	0.0015	0.000375	0.43	0.786663	0.117585																																																																																																																			
B: tiemp	3	4.583188E-04	1.527729E-04	0.17	0.912029	0.073684																																																																																																																			
AB	12	1.110213E-02	9.251779E-04	1.05	0.465235	0.323883																																																																																																																			
S	12	0.0105455	8.787917E-04																																																																																																																						
Total (Adjusted)	31	4.846322E-02																																																																																																																							
Total	32																																																																																																																								
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																			
A: trat	4	1424.66	356.1651	631.27	0.000000*	1.000000																																																																																																																			
S	10	5.641998	0.5641998																																																																																																																						
Total (Adjusted)	14	1430.302																																																																																																																							
Total	15																																																																																																																								
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																						
5	3	50.00767	1, 3, 4																																																																																																																						
2	3	50.041	1, 3, 4																																																																																																																						
1	3	61.24533	5, 2, 4																																																																																																																						
3	3	61.791	5, 2, 4																																																																																																																						
4	3	76.46633	5, 2, 1, 3																																																																																																																						
<p>Response TSS</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>4</td> <td>4.024</td> <td>1.006</td> <td>1.89</td> <td>0.177629</td> <td>0.410947</td> </tr> <tr> <td>B: tiemp</td> <td>3</td> <td>8.675555</td> <td>2.891852</td> <td>5.42</td> <td>0.013681*</td> <td>0.829159</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>12</td> <td>9.248524</td> <td>0.7707103</td> <td>1.45</td> <td>0.266696</td> <td>0.446047</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>12</td> <td>6.4</td> <td>0.5333334</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>31</td> <td>33.44</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>32</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	4	4.024	1.006	1.89	0.177629	0.410947	B: tiemp	3	8.675555	2.891852	5.42	0.013681*	0.829159	AB	12	9.248524	0.7707103	1.45	0.266696	0.446047	S	12	6.4	0.5333334				Total (Adjusted)	31	33.44					Total	32																																																																							
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																			
A: Trat	4	4.024	1.006	1.89	0.177629	0.410947																																																																																																																			
B: tiemp	3	8.675555	2.891852	5.42	0.013681*	0.829159																																																																																																																			
AB	12	9.248524	0.7707103	1.45	0.266696	0.446047																																																																																																																			
S	12	6.4	0.5333334																																																																																																																						
Total (Adjusted)	31	33.44																																																																																																																							
Total	32																																																																																																																								

Response Firmeza

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: Trat	4	4.3245E-04	1.081125E-04	0.00	0.999990	0.050377
B: Tiemp	3	0.2955209	9.850696E-02	1.95	0.135972	0.467683
AB	12	12.31113	1.025928	20.30	0.000000*	1.000000
S	43	2.173174	5.053894E-02			
Total (Adjusted)	62	3.855309				
Total	63					

\* Term significant at alpha = 0.05

Response L

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: trat	4	342.1737	85.54342	5.46	0.000272*	0.975277
S(A)	421	6599.181	15.67502			
Total (Adjusted)	425	6941.355				
Total	426					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Fisher's LSD Multiple-Comparison Test**

Response: L  
Term A: trat

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=421 MSE=15.67502 Critical Value=1.9656

Group	Count	Mean	Different From Groups
4	81	37.38654	3, 5, 2, 1
3	81	38.86309	4, 1
5	78	39.0868	4
2	81	39.23691	4
1	105	40.08962	4, 3

Response a

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: trat	4	5636.65	1409.162	80.15	0.000000*	1.000000
S(A)	421	7402.202	17.58243			
Total (Adjusted)	425	13038.85				
Total	426					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Fisher's LSD Multiple-Comparison Test**

Response: a  
Term A: trat

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=421 MSE=17.58243 Critical Value=1.9656

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	105	9.004381	5, 3, 4, 2
5	78	15.64231	1, 3, 4, 2
3	81	17.30309	1, 5
4	81	17.43358	1, 5
2	81	18.3984	1, 5

Response b

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: trat	4	1100.661	275.1652	20.76	0.000000*	1.000000
S(A)	421	5580.075	13.25433			
Total (Adjusted)	425	6680.735				
Total	426					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Fisher's LSD Multiple-Comparison Test**

Response: b  
Term A: trat

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=421 MSE=13.25433 Critical Value=1.9656

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	105	10.2881	5, 3, 2
4	81	10.86531	5, 3, 2
5	78	13.19077	1, 4
3	81	13.87346	1, 4
2	81	14.04543	1, 4

Response WI							Response YI						
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term	(Alpha=0.05)						Term	(Alpha=0.05)					
A: trat	5	1162.489	232.4977	27.83	0.000000*	1.000000	A: trat	5	4000.319	800.0638	7.70	0.000002*	0.999329
S(A)	154	1286.674	8.355023				S(A)	154	16010.98	103.9674			
Total (Adjusted)	159	2449.162					Total (Adjusted)	159	20011.3				
Total	160						Total	160					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>							<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>						
Response: WI							Response: YI						
Term A: trat							Term A: trat						
Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=154 MSE=8.355023 Critical Value=1.9755							Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=154 MSE=103.9674 Critical Value=1.9755						
Group	Count	Mean	Different From Groups				Group	Count	Mean	Different From Groups			
1.1	26	60.33918	5, 4, 2, 3				1	27	33.83393	1.1, 2, 4, 3, 5			
1	27	60.52925	5, 4, 2, 3				1.1	26	41.08605	1, 3, 5			
5	26	64.18522	1.1, 1, 4, 2, 3				2	27	42.82316	1, 3, 5			
4	27	65.79567	1.1, 1, 5				4	27	46.38433	1, 1.1, 2			
2	27	66.5667	1.1, 1, 5				3	27	46.95452	1, 1.1, 2			
3	27	66.87901	1.1, 1, 5				5	26	48.94992	1, 1.1, 2			
Response RI							Response Fenoles						
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term	(Alpha=0.05)						Term	(Alpha=0.05)					
A: trat	5	19.58617	3.917233	16.43	0.000000*	1.000000	A: trat	4	6740.23	1685.057	0.17	0.952679	0.083534
S(A)	154	36.723	0.238461				S(A)	59	583505.8	9889.929			
Total (Adjusted)	159	56.30916					Total (Adjusted)	63	590246				
Total	160						Total	64					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>							<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>						
Response: RI							Response betanina						
Term A: trat							Term A: trat						
Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=154 MSE=0.238461 Critical Value=1.9755							Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=154 MSE=0.238461 Critical Value=1.9755						
Group	Count	Mean	Different From Groups				Group	Count	Mean	Different From Groups			
1.1	26	0.5635307	5, 1, 4, 3, 2				A: trat	4	4520.243	1130.061			
5	26	1.246269	1.1, 4, 3, 2				S(A)	59	43690.71	740.5204			
1	27	1.352822	1.1				Total (Adjusted)	63	48210.95				
4	27	1.544863	1.1, 5				Total	64					
3	27	1.554596	1.1, 5				* Term significant at alpha = 0.05						
2	27	1.570967	1.1, 5										

<p>Response indicanxita</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>4</td> <td>29762.53</td> <td>7440.632</td> <td>5.65</td> <td>0.000641*</td> <td>0.970540</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>59</td> <td>77678.89</td> <td>1316.591</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>63</td> <td>107441.4</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>64</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: indicanxita Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=59 MSE=1316.591 Critical Value=2.0010</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>16</td> <td>153.9626</td> <td>2, 3, 4</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>12</td> <td>157.197</td> <td>2, 3, 4</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>12</td> <td>177.0144</td> <td>1, 3, 4, 5</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>12</td> <td>186.3142</td> <td>1, 2, 5</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>12</td> <td>215.4067</td> <td>1, 2, 5</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	4	29762.53	7440.632	5.65	0.000641*	0.970540	S(A)	59	77678.89	1316.591				Total (Adjusted)	63	107441.4					Total	64						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	16	153.9626	2, 3, 4	5	12	157.197	2, 3, 4	2	12	177.0144	1, 3, 4, 5	3	12	186.3142	1, 2, 5	4	12	215.4067	1, 2, 5	<p>Response Inhibición fúngica</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>3</td> <td>12071.65</td> <td>4023.882</td> <td>6.71</td> <td>0.001036*</td> <td>0.959224</td> </tr> <tr> <td>B: tiemp</td> <td>2</td> <td>6483.119</td> <td>3241.559</td> <td>5.40</td> <td>0.008881*</td> <td>0.812471</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>6</td> <td>4103.285</td> <td>683.8809</td> <td>1.14</td> <td>0.359731</td> <td>0.388617</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>36</td> <td>21603.76</td> <td>600.1046</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>47</td> <td>44261.81</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>48</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Inh_fungica Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=36 MSE=600.1046 Critical Value=2.0281</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>12</td> <td>18.32225</td> <td>4, 3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>12</td> <td>35.08142</td> <td>4, 3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>12</td> <td>49.25925</td> <td>6</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>12</td> <td>60.7115</td> <td>6, 3</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	3	12071.65	4023.882	6.71	0.001036*	0.959224	B: tiemp	2	6483.119	3241.559	5.40	0.008881*	0.812471	AB	6	4103.285	683.8809	1.14	0.359731	0.388617	S	36	21603.76	600.1046				Total (Adjusted)	47	44261.81					Total	48						Group	Count	Mean	Different From Groups	5	12	18.32225	4, 3	2	12	35.08142	4, 3	3	12	49.25925	6	4	12	60.7115	6, 3
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																							
A: trat	4	29762.53	7440.632	5.65	0.000641*	0.970540																																																																																																																																							
S(A)	59	77678.89	1316.591																																																																																																																																										
Total (Adjusted)	63	107441.4																																																																																																																																											
Total	64																																																																																																																																												
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																										
1	16	153.9626	2, 3, 4																																																																																																																																										
5	12	157.197	2, 3, 4																																																																																																																																										
2	12	177.0144	1, 3, 4, 5																																																																																																																																										
3	12	186.3142	1, 2, 5																																																																																																																																										
4	12	215.4067	1, 2, 5																																																																																																																																										
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																							
A: trat	3	12071.65	4023.882	6.71	0.001036*	0.959224																																																																																																																																							
B: tiemp	2	6483.119	3241.559	5.40	0.008881*	0.812471																																																																																																																																							
AB	6	4103.285	683.8809	1.14	0.359731	0.388617																																																																																																																																							
S	36	21603.76	600.1046																																																																																																																																										
Total (Adjusted)	47	44261.81																																																																																																																																											
Total	48																																																																																																																																												
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																										
5	12	18.32225	4, 3																																																																																																																																										
2	12	35.08142	4, 3																																																																																																																																										
3	12	49.25925	6																																																																																																																																										
4	12	60.7115	6, 3																																																																																																																																										
<p>Response total de betalainas</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>4</td> <td>48546.71</td> <td>12136.68</td> <td>4.35</td> <td>0.003748*</td> <td>0.913173</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>59</td> <td>164450.1</td> <td>2787.291</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>63</td> <td>212996.9</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>64</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: total Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=59 MSE=2787.291 Critical Value=2.0010</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>16</td> <td>360.2625</td> <td>2, 3, 4</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>12</td> <td>379.1142</td> <td>2, 3, 4</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>12</td> <td>386.365</td> <td>1, 5</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>12</td> <td>411.5417</td> <td>1, 5</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>12</td> <td>442.0517</td> <td>1, 5</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	4	48546.71	12136.68	4.35	0.003748*	0.913173	S(A)	59	164450.1	2787.291				Total (Adjusted)	63	212996.9					Total	64						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	16	360.2625	2, 3, 4	5	12	379.1142	2, 3, 4	3	12	386.365	1, 5	2	12	411.5417	1, 5	4	12	442.0517	1, 5	<p>Response Inhibición bacterias</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>3</td> <td>2959.505</td> <td>986.5017</td> <td>22.77</td> <td>0.000030*</td> <td>0.999991</td> </tr> <tr> <td>B: tiemp</td> <td>2</td> <td>8873.516</td> <td>4436.758</td> <td>102.40</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>6</td> <td>1779.634</td> <td>296.6057</td> <td>6.85</td> <td>0.002434*</td> <td>0.977851</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>12</td> <td>519.9427</td> <td>43.32856</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>23</td> <td>14132.6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>24</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Inhibición_fúngica Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=12 MSE=43.32856 Critical Value=2.1788</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>6</td> <td>25.342</td> <td>3, 4, 5</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>6</td> <td>25.9085</td> <td>3, 4, 2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>6</td> <td>39.49633</td> <td>2, 5, 4</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>6</td> <td>52.304</td> <td>2, 5, 3</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	3	2959.505	986.5017	22.77	0.000030*	0.999991	B: tiemp	2	8873.516	4436.758	102.40	0.000000*	1.000000	AB	6	1779.634	296.6057	6.85	0.002434*	0.977851	S	12	519.9427	43.32856				Total (Adjusted)	23	14132.6					Total	24						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	6	25.342	3, 4, 5	5	6	25.9085	3, 4, 2	3	6	39.49633	2, 5, 4	4	6	52.304	2, 5, 3
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																							
A: trat	4	48546.71	12136.68	4.35	0.003748*	0.913173																																																																																																																																							
S(A)	59	164450.1	2787.291																																																																																																																																										
Total (Adjusted)	63	212996.9																																																																																																																																											
Total	64																																																																																																																																												
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																										
1	16	360.2625	2, 3, 4																																																																																																																																										
5	12	379.1142	2, 3, 4																																																																																																																																										
3	12	386.365	1, 5																																																																																																																																										
2	12	411.5417	1, 5																																																																																																																																										
4	12	442.0517	1, 5																																																																																																																																										
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																							
A: trat	3	2959.505	986.5017	22.77	0.000030*	0.999991																																																																																																																																							
B: tiemp	2	8873.516	4436.758	102.40	0.000000*	1.000000																																																																																																																																							
AB	6	1779.634	296.6057	6.85	0.002434*	0.977851																																																																																																																																							
S	12	519.9427	43.32856																																																																																																																																										
Total (Adjusted)	23	14132.6																																																																																																																																											
Total	24																																																																																																																																												
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																										
2	6	25.342	3, 4, 5																																																																																																																																										
5	6	25.9085	3, 4, 2																																																																																																																																										
3	6	39.49633	2, 5, 4																																																																																																																																										
4	6	52.304	2, 5, 3																																																																																																																																										

Response Liberación de Azadiractina							Response Viscosidad						
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>	<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
Term	(Alpha=0.05)						Term	(Alpha=0.05)					
A: C1	1	31877.27	31877.27	22.72	0.000083*	0.995336	A: Ciclos	3	3595486	1198495	379.04	0.000000*	1.000000
S(A)	23	32266.99	1402.913				S	24	75885.71	3161.905			
Total (Adjusted)	24	64144.27					Total (Adjusted)	27	3671372				
Total	25						Total	28					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>							<b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b>						
Response: Liberación Aza							Response: Viscosidad						
Term A: C1							Term A: Ciclos						
Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=23 MSE=1402.913 Critical Value=2.0687							Alpha=0.050 Error Term=S DF=24 MSE=3161.905 Critical Value=2.0639						
<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>				<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>			
5	7	-41.02957	4				2	7	3337.143	4, 6, 8			
4	18	38.49939	5				4	7	3771.428	2, 6, 8			
							6	7	3974.286	2, 4, 8			
							8	7	4328.571	2, 4, 6			
							<b>Response Tamaño_NF</b>						
							<b>Analysis of Variance Table</b>						
							<b>Source</b>	<b>DF</b>	<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
							Term	(Alpha=0.05)					
							A: Ciclos	4	13778.22	3444.555	290.73	0.000000*	1.000000
							S	25	296.2025	11.8481			
							Total (Adjusted)	29	14074.42				
							Total	30					
							* Term significant at alpha = 0.05						
							<b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b>						
							Response: Tamaño_NF						
							Term A: Ciclos						
							Alpha=0.050 Error Term=S DF=25 MSE=11.8481 Critical Value=4.1534						
							<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>			
							8	6	10.88817	4, 2, 0			
							6	6	15.82367	2, 0			
							4	6	18.31633	8, 2, 0			
							2	6	25.25017	8, 6, 4, 0			
							0	6	69.88033	8, 6, 4, 2			

ETAPA III. FORMULACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIÓN DE EMULSIONES PICKERING

a) Caracterización de NF

Diseño experimental

- 0) quitina
- 2) 2 ciclos
- 4) 4 ciclos
- 6) 6 ciclos
- 8) 8 ciclos

b) Caracterización de Cg

Diseño experimental

- 1) NCA 1%
- 3) NCA 1%
- 5) NCA 5%
- 8) NCA 8%
- 10) NCA 10%

Response entrecruzado

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: X_NCA	4	4056.053	1014.013	19.08	0.003137*	0.993927
S	5	265.7387	53.14775			
Total (Adjusted)	9	4321.792				
Total	10					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: entrecruzado  
Term A: X\_NCA

Alpha=0.050 Error Term=S DF=5 MSE=53.14775 Critical Value=5.6731

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	102.825	10, 8, 5
3	2	109.65	10, 8, 5
10	2	142.125	1, 3
8	2	146.45	1, 3
5	2	151.425	1, 3

Response conversion

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: X_NCA	4	1014.013	253.5033	19.08	0.003137*	0.993927
S	5	66.43468	13.28694			
Total (Adjusted)	9	1080.448				
Total	10					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: conversion  
Term A: X\_NCA

Alpha=0.050 Error Term=S DF=5 MSE=13.28694 Critical Value=5.6731

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	51.4125	10, 8, 5
3	2	54.825	10, 8, 5
10	2	71.0625	1, 3
8	2	73.225	1, 3
5	2	75.7125	1, 3

Response rendimiento

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: X_NCA	4	450.6691	112.6673	19.08	0.003137*	0.993926
S	5	29.52746	5.905491			
Total (Adjusted)	9	480.1965				
Total	10					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test**

Response: rendimiento  
Term A: X\_NCA

Alpha=0.050 Error Term=S DF=5 MSE=5.905491 Critical Value=5.6731

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	2	67.6085	10, 8, 5
3	2	69.8835	10, 8, 5
10	2	80.7085	1, 3
8	2	82.15	1, 3
5	2	83.8085	1, 3

<p>Response Grupos amino libres</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: X_NCA</td> <td>4</td> <td>16234.78</td> <td>4058.694</td> <td>593.19</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>25</td> <td>171.0532</td> <td>6.842128</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>29</td> <td>16405.83</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>30</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Nihidrina Term A: X_NCA</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=25 MSE=6.842128 Critical Value=4.1534</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>10</td> <td>6</td> <td>32.82283</td> <td>3, 1</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>6</td> <td>33.37117</td> <td>3, 1</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>6</td> <td>35.01083</td> <td>3, 1</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>6</td> <td>80.476</td> <td>10, 8, 5</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>6</td> <td>81.90067</td> <td>10, 8, 5</td> </tr> </tbody> </table> <p>c) Caracterización de emulsions Pickering</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: X_NCA	4	16234.78	4058.694	593.19	0.000000*	1.000000	S	25	171.0532	6.842128				Total (Adjusted)	29	16405.83					Total	30						Group	Count	Mean	Different From Groups	10	6	32.82283	3, 1	8	6	33.37117	3, 1	5	6	35.01083	3, 1	3	6	80.476	10, 8, 5	1	6	81.90067	10, 8, 5	<p>ii) Viscosidad de HNMSO+Cg-NF</p> <p>Response Viscosidad</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Tratamiento</td> <td>4</td> <td>1.72416E+07</td> <td>4310399</td> <td>35778.28</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>35</td> <td>4216.635</td> <td>120.4753</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>39</td> <td>1.724581E+07</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>40</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Viscosidad Term A: Tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=35 MSE=120.4753 Critical Value=4.0660</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>8</td> <td>21.75</td> <td>2, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>8</td> <td>289.125</td> <td>0, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>8</td> <td>577.25</td> <td>0, 2, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>8</td> <td>1044.75</td> <td>0, 2, 4, 8</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>8</td> <td>1888.75</td> <td>0, 2, 4, 6</td> </tr> </tbody> </table> <p>iii) Viscosidad CNMSO+ Cg-NF</p> <p>Response viscosidad</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: NF</td> <td>4</td> <td>2.742544E+07</td> <td>6856361</td> <td>28241.66</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>35</td> <td>8497.115</td> <td>242.7747</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>39</td> <td>2.743394E+07</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>40</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: viscosidad Term A: NF</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=35 MSE=242.7747 Critical Value=4.0660</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>8</td> <td>48.225</td> <td>2, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>8</td> <td>338.25</td> <td>0, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>8</td> <td>837.75</td> <td>0, 2, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>8</td> <td>1500</td> <td>0, 2, 4, 8</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>8</td> <td>2345</td> <td>0, 2, 4, 6</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Tratamiento	4	1.72416E+07	4310399	35778.28	0.000000*	1.000000	S	35	4216.635	120.4753				Total (Adjusted)	39	1.724581E+07					Total	40						Group	Count	Mean	Different From Groups	0	8	21.75	2, 4, 6, 8	2	8	289.125	0, 4, 6, 8	4	8	577.25	0, 2, 6, 8	6	8	1044.75	0, 2, 4, 8	8	8	1888.75	0, 2, 4, 6	Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: NF	4	2.742544E+07	6856361	28241.66	0.000000*	1.000000	S	35	8497.115	242.7747				Total (Adjusted)	39	2.743394E+07					Total	40						Group	Count	Mean	Different From Groups	0	8	48.225	2, 4, 6, 8	2	8	338.25	0, 4, 6, 8	4	8	837.75	0, 2, 6, 8	6	8	1500	0, 2, 4, 8	8	8	2345	0, 2, 4, 6
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																								
A: X_NCA	4	16234.78	4058.694	593.19	0.000000*	1.000000																																																																																																																																																																																								
S	25	171.0532	6.842128																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	29	16405.83																																																																																																																																																																																												
Total	30																																																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																											
10	6	32.82283	3, 1																																																																																																																																																																																											
8	6	33.37117	3, 1																																																																																																																																																																																											
5	6	35.01083	3, 1																																																																																																																																																																																											
3	6	80.476	10, 8, 5																																																																																																																																																																																											
1	6	81.90067	10, 8, 5																																																																																																																																																																																											
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																								
A: Tratamiento	4	1.72416E+07	4310399	35778.28	0.000000*	1.000000																																																																																																																																																																																								
S	35	4216.635	120.4753																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	39	1.724581E+07																																																																																																																																																																																												
Total	40																																																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																											
0	8	21.75	2, 4, 6, 8																																																																																																																																																																																											
2	8	289.125	0, 4, 6, 8																																																																																																																																																																																											
4	8	577.25	0, 2, 6, 8																																																																																																																																																																																											
6	8	1044.75	0, 2, 4, 8																																																																																																																																																																																											
8	8	1888.75	0, 2, 4, 6																																																																																																																																																																																											
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																								
A: NF	4	2.742544E+07	6856361	28241.66	0.000000*	1.000000																																																																																																																																																																																								
S	35	8497.115	242.7747																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	39	2.743394E+07																																																																																																																																																																																												
Total	40																																																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																											
0	8	48.225	2, 4, 6, 8																																																																																																																																																																																											
2	8	338.25	0, 4, 6, 8																																																																																																																																																																																											
4	8	837.75	0, 2, 6, 8																																																																																																																																																																																											
6	8	1500	0, 2, 4, 8																																																																																																																																																																																											
8	8	2345	0, 2, 4, 6																																																																																																																																																																																											

<p>iv) Viscosidad HNMNCSO+Cg-NF</p> <p>Response viscosidad</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: NF</td> <td>4</td> <td>2.555773E+07</td> <td>6389434</td> <td>5284.97</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>35</td> <td>42314.34</td> <td>1208.981</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>39</td> <td>2.560005E+07</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>40</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: viscosidad Term A: NF</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=35 MSE=1208.981 Critical Value=4.0660</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>8</td> <td>12.425</td> <td>2, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>8</td> <td>225</td> <td>0, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>8</td> <td>789.375</td> <td>0, 2, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>8</td> <td>1163.375</td> <td>0, 2, 4, 8</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>8</td> <td>2267.5</td> <td>0, 2, 4, 6</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: NF	4	2.555773E+07	6389434	5284.97	0.000000*	1.000000	S	35	42314.34	1208.981				Total (Adjusted)	39	2.560005E+07					Total	40						Group	Count	Mean	Different From Groups	0	8	12.425	2, 4, 6, 8	2	8	225	0, 4, 6, 8	4	8	789.375	0, 2, 6, 8	6	8	1163.375	0, 2, 4, 8	8	8	2267.5	0, 2, 4, 6	<p>Response FD_en_crem</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>4</td> <td>1746.582</td> <td>436.6455</td> <td>171.17</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>10</td> <td>25.51013</td> <td>2.551013</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>14</td> <td>1772.092</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: FD_en_crem Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=10 MSE=2.551013 Critical Value=4.6543</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6</td> <td>3</td> <td>2.432333</td> <td>8, 2, 0</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3</td> <td>6.165433</td> <td>2, 0</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>3</td> <td>7.7311</td> <td>6, 2, 0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>21.0047</td> <td>6, 4, 8, 0</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>3</td> <td>31.29207</td> <td>6, 4, 8, 2</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	4	1746.582	436.6455	171.17	0.000000*	1.000000	S	10	25.51013	2.551013				Total (Adjusted)	14	1772.092					Total	15						Group	Count	Mean	Different From Groups	6	3	2.432333	8, 2, 0	4	3	6.165433	2, 0	8	3	7.7311	6, 2, 0	2	3	21.0047	6, 4, 8, 0	0	3	31.29207	6, 4, 8, 2
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																													
A: NF	4	2.555773E+07	6389434	5284.97	0.000000*	1.000000																																																																																																																													
S	35	42314.34	1208.981																																																																																																																																
Total (Adjusted)	39	2.560005E+07																																																																																																																																	
Total	40																																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																
0	8	12.425	2, 4, 6, 8																																																																																																																																
2	8	225	0, 4, 6, 8																																																																																																																																
4	8	789.375	0, 2, 6, 8																																																																																																																																
6	8	1163.375	0, 2, 4, 8																																																																																																																																
8	8	2267.5	0, 2, 4, 6																																																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																													
A: Trat	4	1746.582	436.6455	171.17	0.000000*	1.000000																																																																																																																													
S	10	25.51013	2.551013																																																																																																																																
Total (Adjusted)	14	1772.092																																																																																																																																	
Total	15																																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																
6	3	2.432333	8, 2, 0																																																																																																																																
4	3	6.165433	2, 0																																																																																																																																
8	3	7.7311	6, 2, 0																																																																																																																																
2	3	21.0047	6, 4, 8, 0																																																																																																																																
0	3	31.29207	6, 4, 8, 2																																																																																																																																
<p>c) Eficiencia de encapsulado y fase dispersa en cremado</p> <p>i) HNM+Cg-NF</p> <p>Response EE</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>4</td> <td>7215.705</td> <td>1803.926</td> <td>288.95</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>10</td> <td>62.43133</td> <td>6.243134</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>14</td> <td>7278.136</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: EE Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=10 MSE=6.243134 Critical Value=4.6543</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>3</td> <td>17.33</td> <td>2, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>36.06</td> <td>0, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3</td> <td>53.75667</td> <td>0, 2, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>3</td> <td>70.07</td> <td>0, 2, 4, 8</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>3</td> <td>77.02333</td> <td>0, 2, 4, 6</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	4	7215.705	1803.926	288.95	0.000000*	1.000000	S	10	62.43133	6.243134				Total (Adjusted)	14	7278.136					Total	15						Group	Count	Mean	Different From Groups	0	3	17.33	2, 4, 6, 8	2	3	36.06	0, 4, 6, 8	4	3	53.75667	0, 2, 6, 8	6	3	70.07	0, 2, 4, 8	8	3	77.02333	0, 2, 4, 6	<p>ii) CNMSO+ Cg-NF</p> <p>Response EE</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>4</td> <td>4720.292</td> <td>1180.073</td> <td>188.60</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>10</td> <td>62.5698</td> <td>6.25698</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>14</td> <td>4782.862</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: EE Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=10 MSE=6.25698 Critical Value=4.6543</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>3</td> <td>11.83</td> <td>2, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>36.70333</td> <td>0, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3</td> <td>41.10333</td> <td>0, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>3</td> <td>52.78</td> <td>0, 2, 4, 8</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>3</td> <td>64.79667</td> <td>0, 2, 4, 6</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	4	4720.292	1180.073	188.60	0.000000*	1.000000	S	10	62.5698	6.25698				Total (Adjusted)	14	4782.862					Total	15						Group	Count	Mean	Different From Groups	0	3	11.83	2, 4, 6, 8	2	3	36.70333	0, 6, 8	4	3	41.10333	0, 6, 8	6	3	52.78	0, 2, 4, 8	8	3	64.79667	0, 2, 4, 6
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																													
A: Trat	4	7215.705	1803.926	288.95	0.000000*	1.000000																																																																																																																													
S	10	62.43133	6.243134																																																																																																																																
Total (Adjusted)	14	7278.136																																																																																																																																	
Total	15																																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																
0	3	17.33	2, 4, 6, 8																																																																																																																																
2	3	36.06	0, 4, 6, 8																																																																																																																																
4	3	53.75667	0, 2, 6, 8																																																																																																																																
6	3	70.07	0, 2, 4, 8																																																																																																																																
8	3	77.02333	0, 2, 4, 6																																																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																													
A: Trat	4	4720.292	1180.073	188.60	0.000000*	1.000000																																																																																																																													
S	10	62.5698	6.25698																																																																																																																																
Total (Adjusted)	14	4782.862																																																																																																																																	
Total	15																																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																
0	3	11.83	2, 4, 6, 8																																																																																																																																
2	3	36.70333	0, 6, 8																																																																																																																																
4	3	41.10333	0, 6, 8																																																																																																																																
6	3	52.78	0, 2, 4, 8																																																																																																																																
8	3	64.79667	0, 2, 4, 6																																																																																																																																

<p>Response FD_en_crem</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>4</td> <td>6793.443</td> <td>1698.361</td> <td>90.82</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>10</td> <td>187.0026</td> <td>18.70026</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>14</td> <td>6980.446</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: FD_en_crem Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=10 MSE=18.70026 Critical Value=4.6543</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6</td> <td>3</td> <td>4.166467</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3</td> <td>6.081533</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>7.683367</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>3</td> <td>8.699367</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>3</td> <td>59.72277</td> <td>6, 4, 2, 8</td> </tr> </tbody> </table> <p>iii) HNM-CNM-SO+Cg-NF</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	4	6793.443	1698.361	90.82	0.000000*	1.000000	S	10	187.0026	18.70026				Total (Adjusted)	14	6980.446					Total	15						Group	Count	Mean	Different From Groups	6	3	4.166467	0	4	3	6.081533	0	2	3	7.683367	0	8	3	8.699367	0	0	3	59.72277	6, 4, 2, 8	<p>Response FD_en_crem</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>4</td> <td>15738.65</td> <td>3934.662</td> <td>300.63</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>10</td> <td>130.8809</td> <td>13.08809</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>14</td> <td>15869.53</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: FD_en_crem Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=10 MSE=13.08809 Critical Value=4.6543</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6</td> <td>3</td> <td>4.7078</td> <td>2, 0</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3</td> <td>8.509367</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>3</td> <td>13.50543</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>16.05707</td> <td>6, 0</td> </tr> <tr> <td>0</td> <td>3</td> <td>91.07637</td> <td>6, 4, 8, 2</td> </tr> </tbody> </table> <p>d) Viscosidad de emulsiones Pickering a diferentes pH</p> <p>i) NF 0.4%</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	4	15738.65	3934.662	300.63	0.000000*	1.000000	S	10	130.8809	13.08809				Total (Adjusted)	14	15869.53					Total	15						Group	Count	Mean	Different From Groups	6	3	4.7078	2, 0	4	3	8.509367	0	8	3	13.50543	0	2	3	16.05707	6, 0	0	3	91.07637	6, 4, 8, 2
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																													
A: Trat	4	6793.443	1698.361	90.82	0.000000*	1.000000																																																																																																																													
S	10	187.0026	18.70026																																																																																																																																
Total (Adjusted)	14	6980.446																																																																																																																																	
Total	15																																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																
6	3	4.166467	0																																																																																																																																
4	3	6.081533	0																																																																																																																																
2	3	7.683367	0																																																																																																																																
8	3	8.699367	0																																																																																																																																
0	3	59.72277	6, 4, 2, 8																																																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																													
A: Trat	4	15738.65	3934.662	300.63	0.000000*	1.000000																																																																																																																													
S	10	130.8809	13.08809																																																																																																																																
Total (Adjusted)	14	15869.53																																																																																																																																	
Total	15																																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																
6	3	4.7078	2, 0																																																																																																																																
4	3	8.509367	0																																																																																																																																
8	3	13.50543	0																																																																																																																																
2	3	16.05707	6, 0																																																																																																																																
0	3	91.07637	6, 4, 8, 2																																																																																																																																
<p>Response EE</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>4</td> <td>4242.374</td> <td>1060.594</td> <td>128.55</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>10</td> <td>82.5048</td> <td>8.25048</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>14</td> <td>4324.878</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>15</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: EE Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=10 MSE=8.25048 Critical Value=4.6543</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>3</td> <td>11.98333</td> <td>2, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>3</td> <td>28.49333</td> <td>0, 4, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>3</td> <td>40.18333</td> <td>0, 2, 6, 8</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>3</td> <td>49.93</td> <td>0, 2, 4, 8</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>3</td> <td>60.36</td> <td>0, 2, 4, 6</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	4	4242.374	1060.594	128.55	0.000000*	1.000000	S	10	82.5048	8.25048				Total (Adjusted)	14	4324.878					Total	15						Group	Count	Mean	Different From Groups	0	3	11.98333	2, 4, 6, 8	2	3	28.49333	0, 4, 6, 8	4	3	40.18333	0, 2, 6, 8	6	3	49.93	0, 2, 4, 8	8	3	60.36	0, 2, 4, 6	<p>Response Viscosidad</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Tratamiento</td> <td>3</td> <td>1357891</td> <td>452630.2</td> <td>8791.22</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>28</td> <td>1441.625</td> <td>51.48661</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>31</td> <td>1359332</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>32</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Viscosidad Term A: Tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=28 MSE=51.48661 Critical Value=3.8613</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5.5</td> <td>8</td> <td>389.625</td> <td>4.5, 3.5, 2.5</td> </tr> <tr> <td>4.5</td> <td>8</td> <td>510.125</td> <td>5.5, 3.5, 2.5</td> </tr> <tr> <td>3.5</td> <td>8</td> <td>549.875</td> <td>5.5, 4.5, 2.5</td> </tr> <tr> <td>2.5</td> <td>8</td> <td>939</td> <td>5.5, 4.5, 3.5</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Tratamiento	3	1357891	452630.2	8791.22	0.000000*	1.000000	S	28	1441.625	51.48661				Total (Adjusted)	31	1359332					Total	32						Group	Count	Mean	Different From Groups	5.5	8	389.625	4.5, 3.5, 2.5	4.5	8	510.125	5.5, 3.5, 2.5	3.5	8	549.875	5.5, 4.5, 2.5	2.5	8	939	5.5, 4.5, 3.5				
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																													
A: Trat	4	4242.374	1060.594	128.55	0.000000*	1.000000																																																																																																																													
S	10	82.5048	8.25048																																																																																																																																
Total (Adjusted)	14	4324.878																																																																																																																																	
Total	15																																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																
0	3	11.98333	2, 4, 6, 8																																																																																																																																
2	3	28.49333	0, 4, 6, 8																																																																																																																																
4	3	40.18333	0, 2, 6, 8																																																																																																																																
6	3	49.93	0, 2, 4, 8																																																																																																																																
8	3	60.36	0, 2, 4, 6																																																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																													
A: Tratamiento	3	1357891	452630.2	8791.22	0.000000*	1.000000																																																																																																																													
S	28	1441.625	51.48661																																																																																																																																
Total (Adjusted)	31	1359332																																																																																																																																	
Total	32																																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																
5.5	8	389.625	4.5, 3.5, 2.5																																																																																																																																
4.5	8	510.125	5.5, 3.5, 2.5																																																																																																																																
3.5	8	549.875	5.5, 4.5, 2.5																																																																																																																																
2.5	8	939	5.5, 4.5, 3.5																																																																																																																																

<p>ii) NF 0.6%</p> <p>Response Viscosidad</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Tratamient</td> <td>3</td> <td>1.33692E+07</td> <td>4456400</td> <td>8942.10</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>28</td> <td>13954.13</td> <td>498.3616</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>31</td> <td>1.338315E+07</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>32</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Viscosidad Term A: Tratamient</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=28 MSE=498.3616 Critical Value=3.8613</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5.5</td> <td>8</td> <td>514.875</td> <td>4.5, 3.5, 2.5</td> </tr> <tr> <td>4.5</td> <td>8</td> <td>798.625</td> <td>5.5, 3.5, 2.5</td> </tr> <tr> <td>3.5</td> <td>8</td> <td>1163.375</td> <td>5.5, 4.5, 2.5</td> </tr> <tr> <td>2.5</td> <td>8</td> <td>2220.75</td> <td>5.5, 4.5, 3.5</td> </tr> </tbody> </table> <p>e) Eficiencia de encapsulación y fase dispersa en cremado</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Tratamient	3	1.33692E+07	4456400	8942.10	0.000000*	1.000000	S	28	13954.13	498.3616				Total (Adjusted)	31	1.338315E+07					Total	32						Group	Count	Mean	Different From Groups	5.5	8	514.875	4.5, 3.5, 2.5	4.5	8	798.625	5.5, 3.5, 2.5	3.5	8	1163.375	5.5, 4.5, 2.5	2.5	8	2220.75	5.5, 4.5, 3.5	<p>Response FD_en_crem</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>3</td> <td>13.63381</td> <td>4.544604</td> <td>3.44</td> <td>0.131992</td> <td>0.371144</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>4</td> <td>5.288092</td> <td>1.322023</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>7</td> <td>18.9219</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>ii) NF 0.6%</p> <p>Response EE</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>3</td> <td>910.8601</td> <td>303.6201</td> <td>32.35</td> <td>0.002899*</td> <td>0.998263</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>4</td> <td>37.54195</td> <td>9.385488</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>7</td> <td>948.4021</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: EE Term A: Trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=4 MSE=9.385488 Critical Value=5.7569</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5.5</td> <td>2</td> <td>30.085</td> <td>2.5</td> </tr> <tr> <td>4.5</td> <td>2</td> <td>33.03</td> <td>2.5</td> </tr> <tr> <td>3.5</td> <td>2</td> <td>39.755</td> <td>2.5</td> </tr> <tr> <td>2.5</td> <td>2</td> <td>57.565</td> <td>5.5, 4.5, 3.5</td> </tr> </tbody> </table> <p>Response FD_en_crem</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: Trat</td> <td>3</td> <td>2.716712</td> <td>0.9055706</td> <td>0.55</td> <td>0.676811</td> <td>0.096529</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>4</td> <td>6.635545</td> <td>1.658886</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>7</td> <td>9.352257</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	3	13.63381	4.544604	3.44	0.131992	0.371144	S	4	5.288092	1.322023				Total (Adjusted)	7	18.9219					Total	8						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	3	910.8601	303.6201	32.35	0.002899*	0.998263	S	4	37.54195	9.385488				Total (Adjusted)	7	948.4021					Total	8						Group	Count	Mean	Different From Groups	5.5	2	30.085	2.5	4.5	2	33.03	2.5	3.5	2	39.755	2.5	2.5	2	57.565	5.5, 4.5, 3.5	Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: Trat	3	2.716712	0.9055706	0.55	0.676811	0.096529	S	4	6.635545	1.658886				Total (Adjusted)	7	9.352257					Total	8					
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																											
A: Tratamient	3	1.33692E+07	4456400	8942.10	0.000000*	1.000000																																																																																																																																																																																											
S	28	13954.13	498.3616																																																																																																																																																																																														
Total (Adjusted)	31	1.338315E+07																																																																																																																																																																																															
Total	32																																																																																																																																																																																																
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																														
5.5	8	514.875	4.5, 3.5, 2.5																																																																																																																																																																																														
4.5	8	798.625	5.5, 3.5, 2.5																																																																																																																																																																																														
3.5	8	1163.375	5.5, 4.5, 2.5																																																																																																																																																																																														
2.5	8	2220.75	5.5, 4.5, 3.5																																																																																																																																																																																														
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																											
A: Trat	3	13.63381	4.544604	3.44	0.131992	0.371144																																																																																																																																																																																											
S	4	5.288092	1.322023																																																																																																																																																																																														
Total (Adjusted)	7	18.9219																																																																																																																																																																																															
Total	8																																																																																																																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																											
A: Trat	3	910.8601	303.6201	32.35	0.002899*	0.998263																																																																																																																																																																																											
S	4	37.54195	9.385488																																																																																																																																																																																														
Total (Adjusted)	7	948.4021																																																																																																																																																																																															
Total	8																																																																																																																																																																																																
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																														
5.5	2	30.085	2.5																																																																																																																																																																																														
4.5	2	33.03	2.5																																																																																																																																																																																														
3.5	2	39.755	2.5																																																																																																																																																																																														
2.5	2	57.565	5.5, 4.5, 3.5																																																																																																																																																																																														
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																											
A: Trat	3	2.716712	0.9055706	0.55	0.676811	0.096529																																																																																																																																																																																											
S	4	6.635545	1.658886																																																																																																																																																																																														
Total (Adjusted)	7	9.352257																																																																																																																																																																																															
Total	8																																																																																																																																																																																																

g) Evaluación en fruta

Bioensayo 1

Tratamientos:

- 1) Control
- 2) Cg
- 3) NF
- 4) NNCg

Response PFP

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: tratamiento	3	57.52844	19.17615	91.63	0.000000*	1.000000
B: tiempo	14	1526.528	109.0377	521.04	0.000000*	1.000000
AB	42	39.63528	0.9436972	4.51	0.000000*	1.000000
S	120	25.11222	0.2092685			
Total (Adjusted)	179	1648.804				
Total	180					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Fisher's LSD Multiple-Comparison Test**

Response: PFP  
Term A: tratamiento

Alpha=0.050 Error Term=S DF=120 MSE=0.2092685 Critical Value=1.9799

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	45	2.732807	1, 4, 3
1	45	4.008984	2
4	45	4.038547	2
3	45	4.065213	2

Response Inhibición fúngica

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: trat	2	4608.104	2304.052	18.39	0.000662*	0.996638
B: tiemp	2	1464.082	732.0409	5.84	0.023632*	0.731373
AB	4	1966.733	491.6831	3.92	0.041084*	0.687428
S	9	1127.518	125.2798			
Total (Adjusted)	17	9166.436				
Total	18					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Fisher's LSD Multiple-Comparison Test**

Response: I  
Term A: trat

Alpha=0.050 Error Term=S DF=9 MSE=125.2798 Critical Value=2.2622

Group	Count	Mean	Different From Groups
3	6	47.3248	2
4	6	52.11618	2
2	6	83.4074	3, 4

Response Firmeza

**Analysis of Variance Table**

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: tratamiento	3	7.970371	2.65679	3.03	0.034597*	0.690668
S(A)	74	64.87017	0.876624			
Total (Adjusted)	77	72.84055				
Total	78					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Fisher's LSD Multiple-Comparison Test**

Response: N  
Term A: tratamiento

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=74 MSE=0.876624 Critical Value=1.9925

Group	Count	Mean	Different From Groups
1	24	1.889583	3, 2, 4
3	18	2.558333	1
2	18	2.586111	1
4	18	2.6	1

<p>Response Grosor_epicarpio</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>0.2582051</td> <td>8.606838E-02</td> <td>3.58</td> <td>0.017670*</td> <td>0.770197</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>74</td> <td>1.776667</td> <td>2.400901E-02</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>77</td> <td>2.034872</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>78</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Grosor_epicarpio Term A: tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=74 MSE=2.400901E-02 Critical Value=1.9925</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>18</td> <td>0.2555556</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>18</td> <td>0.2611111</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>24</td> <td>0.35</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>18</td> <td>0.3944444</td> <td>3, 4</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	0.2582051	8.606838E-02	3.58	0.017670*	0.770197	S(A)	74	1.776667	2.400901E-02				Total (Adjusted)	77	2.034872					Total	78						Group	Count	Mean	Different From Groups	3	18	0.2555556	2	4	18	0.2611111	2	1	24	0.35		2	18	0.3944444	3, 4	<p>Response STT TA<sup>-1</sup></p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>19508.44</td> <td>6502.813</td> <td>5.95</td> <td>0.1554</td> <td>0.940600</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>48</td> <td>52448.77</td> <td>1092.683</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>51</td> <td>71957.21</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>52</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>Response pH_pulpa</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trata</td> <td>3</td> <td>0.3056667</td> <td>0.1018889</td> <td>1.19</td> <td>0.323704</td> <td>0.299178</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>48</td> <td>4.111533</td> <td>8.565694E-02</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>51</td> <td>4.4172</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>52</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p style="text-align: center;"><b>DETERMINACIONES EN EPICARPIO</b></p> <p>Response betanina</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trata</td> <td>3</td> <td>3345.11</td> <td>1115.037</td> <td>8.40</td> <td>0.000244*</td> <td>0.986837</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>35</td> <td>4645.887</td> <td>132.7396</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>38</td> <td>7990.997</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>39</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: betanina Term A: trata</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=35 MSE=132.7396 Critical Value=2.0301</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>9</td> <td>30.15556</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>9</td> <td>31.11111</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>12</td> <td>40.25583</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>9</td> <td>54.13667</td> <td>3, 4, 1</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	19508.44	6502.813	5.95	0.1554	0.940600	S(A)	48	52448.77	1092.683				Total (Adjusted)	51	71957.21					Total	52						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trata	3	0.3056667	0.1018889	1.19	0.323704	0.299178	S(A)	48	4.111533	8.565694E-02				Total (Adjusted)	51	4.4172					Total	52						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trata	3	3345.11	1115.037	8.40	0.000244*	0.986837	S(A)	35	4645.887	132.7396				Total (Adjusted)	38	7990.997					Total	39						Group	Count	Mean	Different From Groups	3	9	30.15556	2	4	9	31.11111	2	1	12	40.25583	2	2	9	54.13667	3, 4, 1	<p>Response SST</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>111.0125</td> <td>37.00415</td> <td>1.70</td> <td>0.174822</td> <td>0.426029</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>67</td> <td>1456.087</td> <td>21.73264</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>70</td> <td>1567.099</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>71</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>Response TA</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>7.371159E-03</td> <td>2.457053E-03</td> <td>3.94</td> <td>0.136199</td> <td>0.799673</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>48</td> <td>2.992972E-02</td> <td>6.235359E-04</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>51</td> <td>3.730088E-02</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>52</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	111.0125	37.00415	1.70	0.174822	0.426029	S(A)	67	1456.087	21.73264				Total (Adjusted)	70	1567.099					Total	71						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	7.371159E-03	2.457053E-03	3.94	0.136199	0.799673	S(A)	48	2.992972E-02	6.235359E-04				Total (Adjusted)	51	3.730088E-02					Total	52					
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																																																																								
A: tratamiento	3	0.2582051	8.606838E-02	3.58	0.017670*	0.770197																																																																																																																																																																																																																																																																								
S(A)	74	1.776667	2.400901E-02																																																																																																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	77	2.034872																																																																																																																																																																																																																																																																												
Total	78																																																																																																																																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																																																																																																											
3	18	0.2555556	2																																																																																																																																																																																																																																																																											
4	18	0.2611111	2																																																																																																																																																																																																																																																																											
1	24	0.35																																																																																																																																																																																																																																																																												
2	18	0.3944444	3, 4																																																																																																																																																																																																																																																																											
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																																																																								
A: tratamiento	3	19508.44	6502.813	5.95	0.1554	0.940600																																																																																																																																																																																																																																																																								
S(A)	48	52448.77	1092.683																																																																																																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	51	71957.21																																																																																																																																																																																																																																																																												
Total	52																																																																																																																																																																																																																																																																													
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																																																																								
A: trata	3	0.3056667	0.1018889	1.19	0.323704	0.299178																																																																																																																																																																																																																																																																								
S(A)	48	4.111533	8.565694E-02																																																																																																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	51	4.4172																																																																																																																																																																																																																																																																												
Total	52																																																																																																																																																																																																																																																																													
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																																																																								
A: trata	3	3345.11	1115.037	8.40	0.000244*	0.986837																																																																																																																																																																																																																																																																								
S(A)	35	4645.887	132.7396																																																																																																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	38	7990.997																																																																																																																																																																																																																																																																												
Total	39																																																																																																																																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																																																																																																											
3	9	30.15556	2																																																																																																																																																																																																																																																																											
4	9	31.11111	2																																																																																																																																																																																																																																																																											
1	12	40.25583	2																																																																																																																																																																																																																																																																											
2	9	54.13667	3, 4, 1																																																																																																																																																																																																																																																																											
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																																																																								
A: tratamiento	3	111.0125	37.00415	1.70	0.174822	0.426029																																																																																																																																																																																																																																																																								
S(A)	67	1456.087	21.73264																																																																																																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	70	1567.099																																																																																																																																																																																																																																																																												
Total	71																																																																																																																																																																																																																																																																													
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																																																																								
A: tratamiento	3	7.371159E-03	2.457053E-03	3.94	0.136199	0.799673																																																																																																																																																																																																																																																																								
S(A)	48	2.992972E-02	6.235359E-04																																																																																																																																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	51	3.730088E-02																																																																																																																																																																																																																																																																												
Total	52																																																																																																																																																																																																																																																																													

<p>Response Indicaxan</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trata</td> <td>3</td> <td>15521.5</td> <td>5173.833</td> <td>13.07</td> <td>0.000007*</td> <td>0.999605</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>35</td> <td>13858.86</td> <td>395.9675</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>38</td> <td>29380.36</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>39</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Indicaxan Term A: trata</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=35 MSE=395.9675 Critical Value=2.0301</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>12</td> <td>58.70833</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>9</td> <td>62.87556</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>9</td> <td>71.83111</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>9</td> <td>109.8533</td> <td>1, 3, 4</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trata	3	15521.5	5173.833	13.07	0.000007*	0.999605	S(A)	35	13858.86	395.9675				Total (Adjusted)	38	29380.36					Total	39						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	12	58.70833	2	3	9	62.87556	2	4	9	71.83111	2	2	9	109.8533	1, 3, 4	<p>Response L</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>910.4869</td> <td>303.4956</td> <td>24.77</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>256</td> <td>3136.103</td> <td>12.2504</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>259</td> <td>4046.59</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>260</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: L Term A: tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=256 MSE=12.2504 Critical Value=1.9693</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td>60</td> <td>35.27117</td> <td>1, 2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>36.015</td> <td>1, 2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>37.758</td> <td>4, 3, 2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>40.32516</td> <td>4, 3, 1</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	910.4869	303.4956	24.77	0.000000*	1.000000	S(A)	256	3136.103	12.2504				Total (Adjusted)	259	4046.59					Total	260						Group	Count	Mean	Different From Groups	4	60	35.27117	1, 2	3	60	36.015	1, 2	1	80	37.758	4, 3, 2	2	60	40.32516	4, 3, 1
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																					
A: trata	3	15521.5	5173.833	13.07	0.000007*	0.999605																																																																																																																					
S(A)	35	13858.86	395.9675																																																																																																																								
Total (Adjusted)	38	29380.36																																																																																																																									
Total	39																																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																								
1	12	58.70833	2																																																																																																																								
3	9	62.87556	2																																																																																																																								
4	9	71.83111	2																																																																																																																								
2	9	109.8533	1, 3, 4																																																																																																																								
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																					
A: tratamiento	3	910.4869	303.4956	24.77	0.000000*	1.000000																																																																																																																					
S(A)	256	3136.103	12.2504																																																																																																																								
Total (Adjusted)	259	4046.59																																																																																																																									
Total	260																																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																								
4	60	35.27117	1, 2																																																																																																																								
3	60	36.015	1, 2																																																																																																																								
1	80	37.758	4, 3, 2																																																																																																																								
2	60	40.32516	4, 3, 1																																																																																																																								
<p>Response Total de Betalaínas</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trata</td> <td>3</td> <td>30251.75</td> <td>10083.92</td> <td>17.90</td> <td>0.000000*</td> <td>0.999993</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>35</td> <td>19717.5</td> <td>563.3573</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>38</td> <td>49969.26</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>39</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: Total de Betalaínas Term A: trata</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=35 MSE=563.3573 Critical Value=2.0301</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>9</td> <td>93.03445</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>12</td> <td>98.9625</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>9</td> <td>102.9433</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>9</td> <td>163.99</td> <td>3, 1, 4</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trata	3	30251.75	10083.92	17.90	0.000000*	0.999993	S(A)	35	19717.5	563.3573				Total (Adjusted)	38	49969.26					Total	39						Group	Count	Mean	Different From Groups	3	9	93.03445	2	1	12	98.9625	2	4	9	102.9433	2	2	9	163.99	3, 1, 4	<p>Response a</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>1141.025</td> <td>380.3416</td> <td>15.87</td> <td>0.000000*</td> <td>0.999990</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>256</td> <td>6134.182</td> <td>23.96165</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>259</td> <td>7275.206</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>260</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: a Term A: tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=256 MSE=23.96165 Critical Value=1.9693</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td>60</td> <td>5.798333</td> <td>3, 1, 2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>8.794833</td> <td>4, 2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>9.10075</td> <td>4, 2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>11.95533</td> <td>4, 3, 1</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	1141.025	380.3416	15.87	0.000000*	0.999990	S(A)	256	6134.182	23.96165				Total (Adjusted)	259	7275.206					Total	260						Group	Count	Mean	Different From Groups	4	60	5.798333	3, 1, 2	3	60	8.794833	4, 2	1	80	9.10075	4, 2	2	60	11.95533	4, 3, 1
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																					
A: trata	3	30251.75	10083.92	17.90	0.000000*	0.999993																																																																																																																					
S(A)	35	19717.5	563.3573																																																																																																																								
Total (Adjusted)	38	49969.26																																																																																																																									
Total	39																																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																								
3	9	93.03445	2																																																																																																																								
1	12	98.9625	2																																																																																																																								
4	9	102.9433	2																																																																																																																								
2	9	163.99	3, 1, 4																																																																																																																								
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																					
A: tratamiento	3	1141.025	380.3416	15.87	0.000000*	0.999990																																																																																																																					
S(A)	256	6134.182	23.96165																																																																																																																								
Total (Adjusted)	259	7275.206																																																																																																																									
Total	260																																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																								
4	60	5.798333	3, 1, 2																																																																																																																								
3	60	8.794833	4, 2																																																																																																																								
1	80	9.10075	4, 2																																																																																																																								
2	60	11.95533	4, 3, 1																																																																																																																								

Response b

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: tratamiento	3	1411.744	470.5813	38.86	0.000000*	1.000000
S(A)	256	3100.123	12.10986			
Total (Adjusted)	259	4511.867				
Total	260					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Fisher's LSD Multiple-Comparison Test**

Response: b

Term A: tratamiento

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=256 MSE=12.10986 Critical Value=1.9693

Group	Count	Mean	Different From Groups
4	60	8.428166	1, 3, 2
1	80	11.21025	4, 2
3	60	12.245	4, 2
2	60	15.19433	4, 1, 3

Response WI

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: tratamiento	3	356.0007	118.6669	11.81	0.000000*	0.999602
S(A)	256	2572.953	10.0506			
Total (Adjusted)	259	2928.954				
Total	260					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Fisher's LSD Multiple-Comparison Test**

Response: WI

Term A: tratamiento

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=256 MSE=10.0506 Critical Value=1.9693

Group	Count	Mean	Different From Groups
2	60	63.04475	1, 4, 3
1	80	64.21264	2, 4, 3
4	60	65.8343	2, 1
3	60	65.96178	2, 1

Response RI

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: tratamiento	3	0.4736511	0.1578837	1.05	0.369257	0.284216
S(A)	256	38.34774	0.1497959			
Total (Adjusted)	259	38.82139				
Total	260					

\* Term significant at alpha = 0.05

Response YI

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: tratamiento	3	14752.32	4917.441	40.90	0.000000*	1.000000
S(A)	256	30781.61	120.2406			
Total (Adjusted)	259	45533.93				
Total	260					

\* Term significant at alpha = 0.05

**Fisher's LSD Multiple-Comparison Test**

Response: YI

Term A: tratamiento

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=256 MSE=120.2406 Critical Value=1.9693

Group	Count	Mean	Different From Groups
4	60	32.56933	1, 3, 2
1	80	42.12309	4, 3, 2
3	60	48.20285	4, 1, 2
2	60	53.63602	4, 1, 3

**EN PULPA**

Response L

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A: tratamiento	3	46.4161	15.47203	1.43	0.233782	0.377829
S(A)	256	2765.307	10.80198			
Total (Adjusted)	259	2811.723				
Total	260					

\* Term significant at alpha = 0.05

<p>Response a</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>271.5744</td> <td>90.5248</td> <td>2.55</td> <td>0.056130</td> <td>0.625202</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>256</td> <td>9083.489</td> <td>35.48238</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>259</td> <td>9355.063</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>260</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	271.5744	90.5248	2.55	0.056130	0.625202	S(A)	256	9083.489	35.48238				Total (Adjusted)	259	9355.063					Total	260						<p>Response WI</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>92.21944</td> <td>30.73981</td> <td>4.51</td> <td>0.004229*</td> <td>0.879162</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>256</td> <td>1746.657</td> <td>6.82288</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>259</td> <td>1838.877</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>260</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: WI Term A: tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=256 MSE=6.82288 Critical Value=1.9693</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>78.9132</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>79.5362</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>79.69363</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>60</td> <td>80.64399</td> <td>2, 3, 1</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	92.21944	30.73981	4.51	0.004229*	0.879162	S(A)	256	1746.657	6.82288				Total (Adjusted)	259	1838.877					Total	260						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	60	78.9132	4	3	60	79.5362	4	1	80	79.69363	4	4	60	80.64399	2, 3, 1																				
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																					
A: tratamiento	3	271.5744	90.5248	2.55	0.056130	0.625202																																																																																																																					
S(A)	256	9083.489	35.48238																																																																																																																								
Total (Adjusted)	259	9355.063																																																																																																																									
Total	260																																																																																																																										
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																					
A: tratamiento	3	92.21944	30.73981	4.51	0.004229*	0.879162																																																																																																																					
S(A)	256	1746.657	6.82288																																																																																																																								
Total (Adjusted)	259	1838.877																																																																																																																									
Total	260																																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																								
2	60	78.9132	4																																																																																																																								
3	60	79.5362	4																																																																																																																								
1	80	79.69363	4																																																																																																																								
4	60	80.64399	2, 3, 1																																																																																																																								
<p>Response b</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>196.1734</td> <td>65.39114</td> <td>4.39</td> <td>0.004951*</td> <td>0.869684</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>256</td> <td>3815.693</td> <td>14.90505</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>259</td> <td>4011.867</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>260</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: b Term A: tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=256 MSE=14.90505 Critical Value=1.9693</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>10.0055</td> <td>4, 1, 3</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>60</td> <td>11.58417</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>12.15713</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>12.17667</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	196.1734	65.39114	4.39	0.004951*	0.869684	S(A)	256	3815.693	14.90505				Total (Adjusted)	259	4011.867					Total	260						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	60	10.0055	4, 1, 3	4	60	11.58417	2	1	80	12.15713	2	3	60	12.17667	2	<p>Response RI</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>4.578514</td> <td>1.526171</td> <td>10.52</td> <td>0.000002*</td> <td>0.998781</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>256</td> <td>37.1391</td> <td>0.1450746</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>259</td> <td>41.71762</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>260</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: RI Term A: tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=256 MSE=0.1450746 Critical Value=1.9693</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>2.137511</td> <td>4, 2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>2.189545</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>60</td> <td>2.293323</td> <td>1, 2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>2.484415</td> <td>1, 3, 4</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	4.578514	1.526171	10.52	0.000002*	0.998781	S(A)	256	37.1391	0.1450746				Total (Adjusted)	259	41.71762					Total	260						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	80	2.137511	4, 2	3	60	2.189545	2	4	60	2.293323	1, 2	2	60	2.484415	1, 3, 4
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																					
A: tratamiento	3	196.1734	65.39114	4.39	0.004951*	0.869684																																																																																																																					
S(A)	256	3815.693	14.90505																																																																																																																								
Total (Adjusted)	259	4011.867																																																																																																																									
Total	260																																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																								
2	60	10.0055	4, 1, 3																																																																																																																								
4	60	11.58417	2																																																																																																																								
1	80	12.15713	2																																																																																																																								
3	60	12.17667	2																																																																																																																								
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																					
A: tratamiento	3	4.578514	1.526171	10.52	0.000002*	0.998781																																																																																																																					
S(A)	256	37.1391	0.1450746																																																																																																																								
Total (Adjusted)	259	41.71762																																																																																																																									
Total	260																																																																																																																										
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																								
1	80	2.137511	4, 2																																																																																																																								
3	60	2.189545	2																																																																																																																								
4	60	2.293323	1, 2																																																																																																																								
2	60	2.484415	1, 3, 4																																																																																																																								

<p>Response YI</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>7765.134</td> <td>2588.378</td> <td>5.61</td> <td>0.000975*</td> <td>0.942236</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>256</td> <td>118201.3</td> <td>461.724</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>259</td> <td>125966.5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>260</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: YI Term A: tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=256 MSE=461.724 Critical Value=1.9693</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>54.52451</td> <td>3, 1, 4</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>65.97856</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>67.52316</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>60</td> <td>68.44942</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	7765.134	2588.378	5.61	0.000975*	0.942236	S(A)	256	118201.3	461.724				Total (Adjusted)	259	125966.5					Total	260						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	60	54.52451	3, 1, 4	3	60	65.97856	2	1	80	67.52316	2	4	60	68.44942	2	<p>Response fenoles en pulpa</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>18324.36</td> <td>6108.119</td> <td>0.68</td> <td>0.571112</td> <td>0.178234</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>35</td> <td>315094.3</td> <td>9002.693</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>38</td> <td>333418.6</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>39</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>Response Ac ascorbico</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: TRATAMIENTO</td> <td>3</td> <td>4.249474E-02</td> <td>1.416491E-02</td> <td>3.04</td> <td>0.041509*</td> <td>0.664406</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>35</td> <td>0.1628158</td> <td>4.651879E-03</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>38</td> <td>0.2053105</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>39</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: vitC_g_kg Term A: TRATAMIENTO</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=35 MSE=4.651879E-03 Critical Value=2.0301</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4</td> <td>9</td> <td>0.2423166</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>9</td> <td>0.2533065</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>12</td> <td>0.2985527</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>9</td> <td>0.3262628</td> <td>4, 3</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	18324.36	6108.119	0.68	0.571112	0.178234	S(A)	35	315094.3	9002.693				Total (Adjusted)	38	333418.6					Total	39						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: TRATAMIENTO	3	4.249474E-02	1.416491E-02	3.04	0.041509*	0.664406	S(A)	35	0.1628158	4.651879E-03				Total (Adjusted)	38	0.2053105					Total	39						Group	Count	Mean	Different From Groups	4	9	0.2423166	2	3	9	0.2533065	2	1	12	0.2985527		2	9	0.3262628	4, 3
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																								
A: tratamiento	3	7765.134	2588.378	5.61	0.000975*	0.942236																																																																																																																																																								
S(A)	256	118201.3	461.724																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	259	125966.5																																																																																																																																																												
Total	260																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																											
2	60	54.52451	3, 1, 4																																																																																																																																																											
3	60	65.97856	2																																																																																																																																																											
1	80	67.52316	2																																																																																																																																																											
4	60	68.44942	2																																																																																																																																																											
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																								
A: tratamiento	3	18324.36	6108.119	0.68	0.571112	0.178234																																																																																																																																																								
S(A)	35	315094.3	9002.693																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	38	333418.6																																																																																																																																																												
Total	39																																																																																																																																																													
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																								
A: TRATAMIENTO	3	4.249474E-02	1.416491E-02	3.04	0.041509*	0.664406																																																																																																																																																								
S(A)	35	0.1628158	4.651879E-03																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	38	0.2053105																																																																																																																																																												
Total	39																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																											
4	9	0.2423166	2																																																																																																																																																											
3	9	0.2533065	2																																																																																																																																																											
1	12	0.2985527																																																																																																																																																												
2	9	0.3262628	4, 3																																																																																																																																																											
<p>Response fenoles en epicarpio</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: tratamiento</td> <td>3</td> <td>1476246</td> <td>492081.9</td> <td>6.21</td> <td>0.001700*</td> <td>0.943240</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>35</td> <td>2773135</td> <td>79232.43</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>38</td> <td>4249381</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>39</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: fenoles Term A: tratamiento</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=35 MSE=79232.43 Critical Value=2.0301</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>12</td> <td>795.9371</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>9</td> <td>823.3863</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>9</td> <td>831.3191</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>9</td> <td>1275.404</td> <td>1, 3, 4</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: tratamiento	3	1476246	492081.9	6.21	0.001700*	0.943240	S(A)	35	2773135	79232.43				Total (Adjusted)	38	4249381					Total	39						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	12	795.9371	2	3	9	823.3863	2	4	9	831.3191	2	2	9	1275.404	1, 3, 4	<p style="text-align: center;">Bioensayo 2</p> <p>Tratamientos:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Control</li> <li>2) CS</li> <li>3) NCH</li> </ol>																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																								
A: tratamiento	3	1476246	492081.9	6.21	0.001700*	0.943240																																																																																																																																																								
S(A)	35	2773135	79232.43																																																																																																																																																											
Total (Adjusted)	38	4249381																																																																																																																																																												
Total	39																																																																																																																																																													
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																											
1	12	795.9371	2																																																																																																																																																											
3	9	823.3863	2																																																																																																																																																											
4	9	831.3191	2																																																																																																																																																											
2	9	1275.404	1, 3, 4																																																																																																																																																											

<p>PFp temperatura ambiente</p> <p>Response PFP Tamb</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>0.2018012</td> <td>0.1009006</td> <td>0.74</td> <td>0.480477</td> <td>0.169630</td> </tr> <tr> <td>B: tiempo</td> <td>8</td> <td>41.72865</td> <td>5.216082</td> <td>38.41</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>16</td> <td>0.565837</td> <td>3.536481E-02</td> <td>0.26</td> <td>0.997677</td> <td>0.149394</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>54</td> <td>7.333122</td> <td>0.1357986</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>80</td> <td>49.82941</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>81</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	0.2018012	0.1009006	0.74	0.480477	0.169630	B: tiempo	8	41.72865	5.216082	38.41	0.000000*	1.000000	AB	16	0.565837	3.536481E-02	0.26	0.997677	0.149394	S	54	7.333122	0.1357986				Total (Adjusted)	80	49.82941					Total	81						<p>Temperatura ambiente</p> <p>Response INHIB</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: TRAT</td> <td>1</td> <td>890.5524</td> <td>890.5524</td> <td>28.77</td> <td>0.005832*</td> <td>0.973751</td> </tr> <tr> <td>B: TIEMP</td> <td>1</td> <td>37.76296</td> <td>37.76296</td> <td>1.22</td> <td>0.331345</td> <td>0.138318</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>1</td> <td>128.7899</td> <td>128.7899</td> <td>4.16</td> <td>0.110977</td> <td>0.346728</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>4</td> <td>123.8213</td> <td>30.95534</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>7</td> <td>1180.927</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>8</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: TRAT	1	890.5524	890.5524	28.77	0.005832*	0.973751	B: TIEMP	1	37.76296	37.76296	1.22	0.331345	0.138318	AB	1	128.7899	128.7899	4.16	0.110977	0.346728	S	4	123.8213	30.95534				Total (Adjusted)	7	1180.927					Total	8					
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																									
A: trat	2	0.2018012	0.1009006	0.74	0.480477	0.169630																																																																																																									
B: tiempo	8	41.72865	5.216082	38.41	0.000000*	1.000000																																																																																																									
AB	16	0.565837	3.536481E-02	0.26	0.997677	0.149394																																																																																																									
S	54	7.333122	0.1357986																																																																																																												
Total (Adjusted)	80	49.82941																																																																																																													
Total	81																																																																																																														
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																									
A: TRAT	1	890.5524	890.5524	28.77	0.005832*	0.973751																																																																																																									
B: TIEMP	1	37.76296	37.76296	1.22	0.331345	0.138318																																																																																																									
AB	1	128.7899	128.7899	4.16	0.110977	0.346728																																																																																																									
S	4	123.8213	30.95534																																																																																																												
Total (Adjusted)	7	1180.927																																																																																																													
Total	8																																																																																																														
<p>Temperatura refrigeracion</p> <p>Response pfp</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>43.57927</td> <td>21.78963</td> <td>49.10</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>B: tiempo</td> <td>15</td> <td>1149.777</td> <td>76.65179</td> <td>172.72</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>AB</td> <td>30</td> <td>33.54717</td> <td>1.118239</td> <td>2.52</td> <td>0.000361*</td> <td>0.999378</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>96</td> <td>42.60349</td> <td>0.4437864</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>143</td> <td>1269.507</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>144</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: pfp Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=96 MSE=0.4437864 Critical Value=1.9850</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>48</td> <td>3.250962</td> <td>2, 1</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>48</td> <td>4.218091</td> <td>3, 1</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>48</td> <td>4.547145</td> <td>3, 2</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	43.57927	21.78963	49.10	0.000000*	1.000000	B: tiempo	15	1149.777	76.65179	172.72	0.000000*	1.000000	AB	30	33.54717	1.118239	2.52	0.000361*	0.999378	S	96	42.60349	0.4437864				Total (Adjusted)	143	1269.507					Total	144						Group	Count	Mean	Different From Groups	3	48	3.250962	2, 1	2	48	4.218091	3, 1	1	48	4.547145	3, 2	<p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: INHIB Term A: TRAT</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S DF=4 MSE=30.95534 Critical Value=2.7764</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>4</td> <td>45.85263</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>4</td> <td>66.95419</td> <td>3</td> </tr> </tbody> </table>							Group	Count	Mean	Different From Groups	3	4	45.85263	2	2	4	66.95419	3																					
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																									
A: trat	2	43.57927	21.78963	49.10	0.000000*	1.000000																																																																																																									
B: tiempo	15	1149.777	76.65179	172.72	0.000000*	1.000000																																																																																																									
AB	30	33.54717	1.118239	2.52	0.000361*	0.999378																																																																																																									
S	96	42.60349	0.4437864																																																																																																												
Total (Adjusted)	143	1269.507																																																																																																													
Total	144																																																																																																														
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																												
3	48	3.250962	2, 1																																																																																																												
2	48	4.218091	3, 1																																																																																																												
1	48	4.547145	3, 2																																																																																																												
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																												
3	4	45.85263	2																																																																																																												
2	4	66.95419	3																																																																																																												
<p>Temperatura ambiente</p> <p>Response Firmeza</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>0.1987309</td> <td>9.936547E-02</td> <td>0.26</td> <td>0.774602</td> <td>0.087639</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>39</td> <td>15.07377</td> <td>0.3865068</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>41</td> <td>15.2725</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>42</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	0.1987309	9.936547E-02	0.26	0.774602	0.087639	S(A)	39	15.07377	0.3865068				Total (Adjusted)	41	15.2725					Total	42																																																																											
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																									
A: trat	2	0.1987309	9.936547E-02	0.26	0.774602	0.087639																																																																																																									
S(A)	39	15.07377	0.3865068																																																																																																												
Total (Adjusted)	41	15.2725																																																																																																													
Total	42																																																																																																														

Temperatura refrigeración							Temperatura ambiente						
Response		Firmeza					Response		STT TA <sup>-1</sup>				
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term		(Alpha=0.05)					Term		(Alpha=0.05)				
A: trat	2	3.97041	1.985205	6.56	0.002736*	0.894596	A: TRAT	2	2695.872	1347.936	1.24	0.313632	0.234926
S(A)	57	17.25809	0.3027735				S(A)	18	19605.62	1089.201			
Total (Adjusted)	59	21.2285					Total (Adjusted)	20	22301.5				
Total	60						Total	21					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>							Temperatura refrigeracion						
Response: N							Response						
Term A: trat							STT TA <sup>-1</sup>						
Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=57 MSE=0.3027735 Critical Value=2.0025							<b>Analysis of Variance Table</b>						
							Source						
							Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
								(Alpha=0.05)					
Group	Count	Mean	Different From				A: TRAT	2	1792.441	896.2206	1.04	0.368798	0.211684
2	18	1.616667	1, 3				S(A)	27	23373.27	865.6765			
1	24	1.964583	2				Total (Adjusted)	29	25165.71				
3	18	2.280555	2				Total	30					
Temperatura ambiente							* Term significant at alpha = 0.05						
Response		GROSOR					Temperatura ambiente		Response				
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term		(Alpha=0.05)					Term		(Alpha=0.05)				
A: trat	2	0.0515377	2.576885E-02	2.13	0.131960	0.411038	A: TRAT	2	3.652301E-02	1.826151E-02	0.15	0.860389	0.069902
S(A)	39	0.4709028	1.207443E-02				S(A)	18	2.167772	0.1204318			
Total (Adjusted)	41	0.5224405					Total (Adjusted)	20	2.204295				
Total	42						Total	21					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
Response		GROSOR					Temperatura refrigeracion		Response				
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term		(Alpha=0.05)					Term		(Alpha=0.05)				
A: trat	2	1.034028E-02	5.170139E-03	0.55	0.580741	0.136409	A: TRAT	2	1.899222E-02	9.496111E-03	0.09	0.912942	0.062518
S(A)	57	0.5371181	9.423124E-03				S(A)	27	2.805478	0.1039066			
Total (Adjusted)	59	0.5474584					Total (Adjusted)	29	2.82447				
Total	60						Total	30					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						

<p>Temperatura ambiente</p> <p>Response            betanina</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>2223.805</td> <td>1111.902</td> <td>8.30</td> <td>0.002786*</td> <td>0.927297</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>18</td> <td>2410.362</td> <td>133.909</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>20</td> <td>4634.167</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>21</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: betanina Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=18 MSE=133.909 Critical Value=2.1009</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>6</td> <td>30.82333</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>6</td> <td>33.67167</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>9</td> <td>52.92778</td> <td>2, 3</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	2223.805	1111.902	8.30	0.002786*	0.927297	S(A)	18	2410.362	133.909				Total (Adjusted)	20	4634.167					Total	21						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	6	30.82333	1	3	6	33.67167	1	1	9	52.92778	2, 3	<p><b>EPICARPIO</b></p> <p>Temperatura ambiente</p> <p>Response            indicanxa</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>739.9411</td> <td>369.9706</td> <td>3.28</td> <td>0.060875</td> <td>0.548760</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>18</td> <td>2028.46</td> <td>112.6922</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>20</td> <td>2768.401</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>21</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>Temperatura refrigeracion</p> <p>Response            indicanxa</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>184.6227</td> <td>92.31135</td> <td>0.39</td> <td>0.678185</td> <td>0.107003</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>27</td> <td>6326.324</td> <td>234.3083</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>29</td> <td>6510.946</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>30</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>Temperatura ambiente</p> <p>Response            bet_totales</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>613.6631</td> <td>306.8316</td> <td>1.14</td> <td>0.341204</td> <td>0.219521</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>18</td> <td>4835.613</td> <td>268.6452</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>20</td> <td>5449.276</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>21</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	739.9411	369.9706	3.28	0.060875	0.548760	S(A)	18	2028.46	112.6922				Total (Adjusted)	20	2768.401					Total	21						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	184.6227	92.31135	0.39	0.678185	0.107003	S(A)	27	6326.324	234.3083				Total (Adjusted)	29	6510.946					Total	30						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	613.6631	306.8316	1.14	0.341204	0.219521	S(A)	18	4835.613	268.6452				Total (Adjusted)	20	5449.276					Total	21					
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																			
A: trat	2	2223.805	1111.902	8.30	0.002786*	0.927297																																																																																																																																																																			
S(A)	18	2410.362	133.909																																																																																																																																																																						
Total (Adjusted)	20	4634.167																																																																																																																																																																							
Total	21																																																																																																																																																																								
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																						
2	6	30.82333	1																																																																																																																																																																						
3	6	33.67167	1																																																																																																																																																																						
1	9	52.92778	2, 3																																																																																																																																																																						
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																			
A: trat	2	739.9411	369.9706	3.28	0.060875	0.548760																																																																																																																																																																			
S(A)	18	2028.46	112.6922																																																																																																																																																																						
Total (Adjusted)	20	2768.401																																																																																																																																																																							
Total	21																																																																																																																																																																								
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																			
A: trat	2	184.6227	92.31135	0.39	0.678185	0.107003																																																																																																																																																																			
S(A)	27	6326.324	234.3083																																																																																																																																																																						
Total (Adjusted)	29	6510.946																																																																																																																																																																							
Total	30																																																																																																																																																																								
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																			
A: trat	2	613.6631	306.8316	1.14	0.341204	0.219521																																																																																																																																																																			
S(A)	18	4835.613	268.6452																																																																																																																																																																						
Total (Adjusted)	20	5449.276																																																																																																																																																																							
Total	21																																																																																																																																																																								
<p>Temperatura refrigeracion</p> <p>Response            betanina</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>3067.123</td> <td>1533.561</td> <td>11.31</td> <td>0.000271*</td> <td>0.985807</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>27</td> <td>3662.305</td> <td>135.6409</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>29</td> <td>6729.427</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>30</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: betanina Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=27 MSE=135.6409 Critical Value=2.0518</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>9</td> <td>32.47889</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>12</td> <td>44.53917</td> <td>2, 3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>9</td> <td>58.55667</td> <td>2, 1</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	3067.123	1533.561	11.31	0.000271*	0.985807	S(A)	27	3662.305	135.6409				Total (Adjusted)	29	6729.427					Total	30						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	9	32.47889	1, 3	1	12	44.53917	2, 3	3	9	58.55667	2, 1																																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																			
A: trat	2	3067.123	1533.561	11.31	0.000271*	0.985807																																																																																																																																																																			
S(A)	27	3662.305	135.6409																																																																																																																																																																						
Total (Adjusted)	29	6729.427																																																																																																																																																																							
Total	30																																																																																																																																																																								
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																						
2	9	32.47889	1, 3																																																																																																																																																																						
1	12	44.53917	2, 3																																																																																																																																																																						
3	9	58.55667	2, 1																																																																																																																																																																						

Temperatura refrigeración							PULPA						
<b>Analysis of Variance Table</b>							Temperatura ambiente						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Response	betanina					
Term		(Alpha=0.05)					<b>Analysis of Variance Table</b>						
A: trat	2	2874.528	1437.264	3.37	0.049223*	0.586484	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
S(A)	27	11502.52	426.0194				Term		(Alpha=0.05)				
Total (Adjusted)	29	14377.05					A: trat	2	5077.354	2538.677	1.15	0.338849	0.220780
Total	30						S(A)	18	39737.41	2207.634			
* Term significant at alpha = 0.05							Total (Adjusted)						
<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>							Total						
Response: bet_totales							21						
Term A: trat							* Term significant at alpha = 0.05						
Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=27 MSE=426.0194 Critical Value=2.0518							Temperatura refrigeracion						
Group	Count	Mean	Different From Groups				Response						
2	9	65.93222	3				betanina						
1	12	82.29583	2				<b>Analysis of Variance Table</b>						
3	9	90.7					Source						
							Term						
							DF						
							Sum of Squares						
							(Alpha=0.05)						
							Mean Square						
							F-Ratio						
							Prob Level						
							Power						
							A: trat						
							2						
							1882.828						
							941.4139						
							0.98						
							0.386727						
							0.203035						
							S(A)						
							27						
							25824.56						
							956.4653						
							Total (Adjusted)						
							29						
							27707.39						
							Total						
							30						
							* Term significant at alpha = 0.05						
							Temperatura ambiente						
							Response						
							indicanxa						
							<b>Analysis of Variance Table</b>						
							Source						
							Term						
							DF						
							Sum of Squares						
							(Alpha=0.05)						
							Mean Square						
							F-Ratio						
							Prob Level						
							Power						
							A: trat						
							2						
							5622.995						
							2811.497						
							0.46						
							0.640766						
							0.112938						
							S(A)						
							18						
							110911.8						
							6161.768						
							Total (Adjusted)						
							20						
							116534.8						
							Total						
							21						
							* Term significant at alpha = 0.05						
							Temperatura refrigeracion						
							Response						
							bet_totales						
							<b>Analysis of Variance Table</b>						
							Source						
							Term						
							DF						
							Sum of Squares						
							(Alpha=0.05)						
							Mean Square						
							F-Ratio						
							Prob Level						
							Power						
							A: trat						
							2						
							21514.81						
							10757.4						
							2.08						
							0.144722						
							0.389486						
							S(A)						
							27						
							139762.2						
							5176.379						
							Total (Adjusted)						
							29						
							161277						
							Total						
							30						

<p>Temperatura refrigeracion</p> <p>Response            indicaxa</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>14964.02</td> <td>7482.008</td> <td>2.19</td> <td>0.131619</td> <td>0.407657</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>27</td> <td>92325.52</td> <td>3419.463</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>29</td> <td>107289.5</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>30</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	14964.02	7482.008	2.19	0.131619	0.407657	S(A)	27	92325.52	3419.463				Total (Adjusted)	29	107289.5					Total	30						<p>Temperatura ambiente</p> <p>Response            a</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>939.0574</td> <td>469.5287</td> <td>12.87</td> <td>0.000008*</td> <td>0.996650</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>137</td> <td>4998.883</td> <td>36.4882</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>139</td> <td>5937.941</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>140</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	939.0574	469.5287	12.87	0.000008*	0.996650	S(A)	137	4998.883	36.4882				Total (Adjusted)	139	5937.941					Total	140																																					
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: trat	2	14964.02	7482.008	2.19	0.131619	0.407657																																																																																																													
S(A)	27	92325.52	3419.463																																																																																																																
Total (Adjusted)	29	107289.5																																																																																																																	
Total	30																																																																																																																		
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: trat	2	939.0574	469.5287	12.87	0.000008*	0.996650																																																																																																													
S(A)	137	4998.883	36.4882																																																																																																																
Total (Adjusted)	139	5937.941																																																																																																																	
Total	140																																																																																																																		
<p><b>COLOR DE EPICARPIO</b></p>																																																																																																																			
<p>Temperatura ambiente</p> <p>Response            L</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>419.6979</td> <td>209.8489</td> <td>12.69</td> <td>0.000009*</td> <td>0.996280</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>137</td> <td>2266.154</td> <td>16.54127</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>139</td> <td>2685.851</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>140</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: a Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=137 MSE=36.4882 Critical Value=1.9774</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>60</td> <td>9.131166</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>40</td> <td>11.525</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>40</td> <td>15.38525</td> <td>1, 2</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	419.6979	209.8489	12.69	0.000009*	0.996280	S(A)	137	2266.154	16.54127				Total (Adjusted)	139	2685.851					Total	140						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	60	9.131166	3	2	40	11.525	3	3	40	15.38525	1, 2	<p>Temperatura refrigeración</p> <p>Response            a</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>3116.893</td> <td>1558.446</td> <td>59.07</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>197</td> <td>5197.813</td> <td>26.38484</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>199</td> <td>8314.705</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>200</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: a Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=197 MSE=26.38484 Critical Value=1.9721</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>8.660375</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>9.828834</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>17.71083</td> <td>1, 2</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	3116.893	1558.446	59.07	0.000000*	1.000000	S(A)	197	5197.813	26.38484				Total (Adjusted)	199	8314.705					Total	200						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	80	8.660375	3	2	60	9.828834	3	3	60	17.71083	1, 2
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: trat	2	419.6979	209.8489	12.69	0.000009*	0.996280																																																																																																													
S(A)	137	2266.154	16.54127																																																																																																																
Total (Adjusted)	139	2685.851																																																																																																																	
Total	140																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																
1	60	9.131166	3																																																																																																																
2	40	11.525	3																																																																																																																
3	40	15.38525	1, 2																																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: trat	2	3116.893	1558.446	59.07	0.000000*	1.000000																																																																																																													
S(A)	197	5197.813	26.38484																																																																																																																
Total (Adjusted)	199	8314.705																																																																																																																	
Total	200																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																
1	80	8.660375	3																																																																																																																
2	60	9.828834	3																																																																																																																
3	60	17.71083	1, 2																																																																																																																
<p>Temperatura refrigeración</p> <p>Response            L</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>35.96391</td> <td>17.98195</td> <td>2.73</td> <td>0.067412</td> <td>0.535686</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>197</td> <td>1295.608</td> <td>6.576689</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>199</td> <td>1331.572</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>200</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	35.96391	17.98195	2.73	0.067412	0.535686	S(A)	197	1295.608	6.576689				Total (Adjusted)	199	1331.572					Total	200																																																																															
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: trat	2	35.96391	17.98195	2.73	0.067412	0.535686																																																																																																													
S(A)	197	1295.608	6.576689																																																																																																																
Total (Adjusted)	199	1331.572																																																																																																																	
Total	200																																																																																																																		

<p>Temperatura ambiente</p> <p>Response            b</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>1316.039</td> <td>658.0193</td> <td>24.69</td> <td>0.000000*</td> <td>0.999998</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>137</td> <td>3651.536</td> <td>26.65355</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>139</td> <td>4967.574</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>140</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: b Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=137 MSE=26.65355 Critical Value=1.9774</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>60</td> <td>10.62017</td> <td>2, 3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>40</td> <td>16.10475</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>40</td> <td>17.374</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table> <p>Temperatura refrigeración</p> <p>Response            b</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>592.889</td> <td>296.4445</td> <td>25.27</td> <td>0.000000*</td> <td>0.999999</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>197</td> <td>2311.304</td> <td>11.73251</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>199</td> <td>2904.194</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>200</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: b Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=197 MSE=11.73251 Critical Value=1.9721</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>11.73875</td> <td>2, 3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>13.99467</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>15.86183</td> <td>1, 2</td> </tr> </tbody> </table>	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	1316.039	658.0193	24.69	0.000000*	0.999998	S(A)	137	3651.536	26.65355				Total (Adjusted)	139	4967.574					Total	140						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	60	10.62017	2, 3	2	40	16.10475	1	3	40	17.374	1	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	592.889	296.4445	25.27	0.000000*	0.999999	S(A)	197	2311.304	11.73251				Total (Adjusted)	199	2904.194					Total	200						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	80	11.73875	2, 3	2	60	13.99467	1, 3	3	60	15.86183	1, 2	<p>Temperatura ambiente</p> <p>Response            WI</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>44.26063</td> <td>22.13031</td> <td>2.93</td> <td>0.056900</td> <td>0.563014</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>137</td> <td>1035.725</td> <td>7.560034</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>139</td> <td>1079.985</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>140</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>Temperatura refrigeración</p> <p>Response            WI</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>325.1017</td> <td>162.5509</td> <td>37.88</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>197</td> <td>845.4488</td> <td>4.291618</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>199</td> <td>1170.551</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>200</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: WI Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=197 MSE=4.291618 Critical Value=1.9721</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>63.55412</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>63.99606</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>66.56004</td> <td>2, 1</td> </tr> </tbody> </table>	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	44.26063	22.13031	2.93	0.056900	0.563014	S(A)	137	1035.725	7.560034				Total (Adjusted)	139	1079.985					Total	140						Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	325.1017	162.5509	37.88	0.000000*	1.000000	S(A)	197	845.4488	4.291618				Total (Adjusted)	199	1170.551					Total	200						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	60	63.55412	3	1	80	63.99606	3	3	60	66.56004	2, 1
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																							
A: trat	2	1316.039	658.0193	24.69	0.000000*	0.999998																																																																																																																																																																																							
S(A)	137	3651.536	26.65355																																																																																																																																																																																										
Total (Adjusted)	139	4967.574																																																																																																																																																																																											
Total	140																																																																																																																																																																																												
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																										
1	60	10.62017	2, 3																																																																																																																																																																																										
2	40	16.10475	1																																																																																																																																																																																										
3	40	17.374	1																																																																																																																																																																																										
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																							
A: trat	2	592.889	296.4445	25.27	0.000000*	0.999999																																																																																																																																																																																							
S(A)	197	2311.304	11.73251																																																																																																																																																																																										
Total (Adjusted)	199	2904.194																																																																																																																																																																																											
Total	200																																																																																																																																																																																												
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																										
1	80	11.73875	2, 3																																																																																																																																																																																										
2	60	13.99467	1, 3																																																																																																																																																																																										
3	60	15.86183	1, 2																																																																																																																																																																																										
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																							
A: trat	2	44.26063	22.13031	2.93	0.056900	0.563014																																																																																																																																																																																							
S(A)	137	1035.725	7.560034																																																																																																																																																																																										
Total (Adjusted)	139	1079.985																																																																																																																																																																																											
Total	140																																																																																																																																																																																												
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																							
A: trat	2	325.1017	162.5509	37.88	0.000000*	1.000000																																																																																																																																																																																							
S(A)	197	845.4488	4.291618																																																																																																																																																																																										
Total (Adjusted)	199	1170.551																																																																																																																																																																																											
Total	200																																																																																																																																																																																												
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																										
2	60	63.55412	3																																																																																																																																																																																										
1	80	63.99606	3																																																																																																																																																																																										
3	60	66.56004	2, 1																																																																																																																																																																																										

<p>Temperatura ambiente</p> <p>Response RI</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>0.5045552</td> <td>0.2522776</td> <td>2.31</td> <td>0.103162</td> <td>0.462104</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>137</td> <td>14.96494</td> <td>0.1092332</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>139</td> <td>15.4695</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>140</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	0.5045552	0.2522776	2.31	0.103162	0.462104	S(A)	137	14.96494	0.1092332				Total (Adjusted)	139	15.4695					Total	140						<p>Temperatura ambiente</p> <p>Response YI</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>12551.87</td> <td>6275.936</td> <td>30.33</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>137</td> <td>28347.52</td> <td>206.9162</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>139</td> <td>40899.39</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>140</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: YI Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=137 MSE=206.9162 Critical Value=1.9774</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>60</td> <td>39.63059</td> <td>2, 3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>40</td> <td>57.81448</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>40</td> <td>59.61502</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	12551.87	6275.936	30.33	0.000000*	1.000000	S(A)	137	28347.52	206.9162				Total (Adjusted)	139	40899.39					Total	140						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	60	39.63059	2, 3	2	40	57.81448	1	3	40	59.61502	1																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: trat	2	0.5045552	0.2522776	2.31	0.103162	0.462104																																																																																																													
S(A)	137	14.96494	0.1092332																																																																																																																
Total (Adjusted)	139	15.4695																																																																																																																	
Total	140																																																																																																																		
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: trat	2	12551.87	6275.936	30.33	0.000000*	1.000000																																																																																																													
S(A)	137	28347.52	206.9162																																																																																																																
Total (Adjusted)	139	40899.39																																																																																																																	
Total	140																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																
1	60	39.63059	2, 3																																																																																																																
2	40	57.81448	1																																																																																																																
3	40	59.61502	1																																																																																																																
<p>Temperatura refrigeración</p> <p>Response RI</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>8.557219</td> <td>4.278609</td> <td>30.00</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>197</td> <td>28.09924</td> <td>0.1426357</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>199</td> <td>36.65646</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>200</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: RI Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=197 MSE=0.1426357 Critical Value=1.9721</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>0.6926233</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>0.7282338</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>1.163203</td> <td>2, 1</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	8.557219	4.278609	30.00	0.000000*	1.000000	S(A)	197	28.09924	0.1426357				Total (Adjusted)	199	36.65646					Total	200						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	60	0.6926233	3	1	80	0.7282338	3	3	60	1.163203	2, 1	<p>Temperatura refrigeración</p> <p>Response YI</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>8610.831</td> <td>4305.416</td> <td>40.52</td> <td>0.000000*</td> <td>1.000000</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>197</td> <td>20930.85</td> <td>106.248</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>199</td> <td>29541.68</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>200</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: YI Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=197 MSE=106.248 Critical Value=1.9721</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>43.34712</td> <td>2, 3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>51.15166</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>59.15373</td> <td>1, 2</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	8610.831	4305.416	40.52	0.000000*	1.000000	S(A)	197	20930.85	106.248				Total (Adjusted)	199	29541.68					Total	200						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	80	43.34712	2, 3	2	60	51.15166	1, 3	3	60	59.15373	1, 2
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: trat	2	8.557219	4.278609	30.00	0.000000*	1.000000																																																																																																													
S(A)	197	28.09924	0.1426357																																																																																																																
Total (Adjusted)	199	36.65646																																																																																																																	
Total	200																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																
2	60	0.6926233	3																																																																																																																
1	80	0.7282338	3																																																																																																																
3	60	1.163203	2, 1																																																																																																																
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																													
A: trat	2	8610.831	4305.416	40.52	0.000000*	1.000000																																																																																																													
S(A)	197	20930.85	106.248																																																																																																																
Total (Adjusted)	199	29541.68																																																																																																																	
Total	200																																																																																																																		
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																
1	80	43.34712	2, 3																																																																																																																
2	60	51.15166	1, 3																																																																																																																
3	60	59.15373	1, 2																																																																																																																

<p>Temperatura refrigeración</p> <p>Response DELTA_E</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>477.2124</td> <td>238.6062</td> <td>15.33</td> <td>0.000001*</td> <td>0.999266</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>197</td> <td>3067.039</td> <td>15.56872</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>199</td> <td>3544.251</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>200</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: DELTA_E Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=197 MSE=15.56872 Critical Value=1.9721</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>80</td> <td>41.32386</td> <td>2, 3</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>60</td> <td>42.91685</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>60</td> <td>45.05463</td> <td>1, 2</td> </tr> </tbody> </table> <p style="text-align: center;"><b>COLOR DE PULPA</b></p> <p>Temperatura ambiente</p> <p>Response L</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>108.1063</td> <td>54.05313</td> <td>8.10</td> <td>0.000472*</td> <td>0.955020</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>137</td> <td>913.8392</td> <td>6.670359</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>139</td> <td>1021.945</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>140</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p><b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b></p> <p>Response: L Term A: trat</p> <p>Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=137 MSE=6.670359 Critical Value=1.9774</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Count</th> <th>Mean</th> <th>Different From Groups</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>40</td> <td>23.82375</td> <td>1, 3</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>60</td> <td>25.44617</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>40</td> <td>26.05125</td> <td>2</td> </tr> </tbody> </table>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	477.2124	238.6062	15.33	0.000001*	0.999266	S(A)	197	3067.039	15.56872				Total (Adjusted)	199	3544.251					Total	200						Group	Count	Mean	Different From Groups	1	80	41.32386	2, 3	2	60	42.91685	1, 3	3	60	45.05463	1, 2	Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	108.1063	54.05313	8.10	0.000472*	0.955020	S(A)	137	913.8392	6.670359				Total (Adjusted)	139	1021.945					Total	140						Group	Count	Mean	Different From Groups	2	40	23.82375	1, 3	1	60	25.44617	2	3	40	26.05125	2	<p>Temperatura refrigeración</p> <p>Response L</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>29.4561</td> <td>14.72805</td> <td>1.58</td> <td>0.208405</td> <td>0.332409</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>197</td> <td>1835.388</td> <td>9.316692</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>199</td> <td>1864.844</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>200</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>Temperatura ambiente</p> <p>Response a</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>180.4987</td> <td>90.24934</td> <td>2.89</td> <td>0.059138</td> <td>0.556815</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>137</td> <td>4282.615</td> <td>31.25996</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>139</td> <td>4463.113</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>140</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p> <p>Temperatura refrigeración</p> <p>Response a</p> <p><b>Analysis of Variance Table</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Source Term</th> <th>DF</th> <th>Sum of Squares (Alpha=0.05)</th> <th>Mean Square</th> <th>F-Ratio</th> <th>Prob Level</th> <th>Power</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A: trat</td> <td>2</td> <td>36.26288</td> <td>18.13144</td> <td>0.63</td> <td>0.534157</td> <td>0.154283</td> </tr> <tr> <td>S(A)</td> <td>197</td> <td>5678.101</td> <td>28.82285</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total (Adjusted)</td> <td>199</td> <td>5714.363</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>Total</td> <td>200</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>* Term significant at alpha = 0.05</p>							Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	29.4561	14.72805	1.58	0.208405	0.332409	S(A)	197	1835.388	9.316692				Total (Adjusted)	199	1864.844					Total	200						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	180.4987	90.24934	2.89	0.059138	0.556815	S(A)	137	4282.615	31.25996				Total (Adjusted)	139	4463.113					Total	140						Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	A: trat	2	36.26288	18.13144	0.63	0.534157	0.154283	S(A)	197	5678.101	28.82285				Total (Adjusted)	199	5714.363					Total	200					
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																						
A: trat	2	477.2124	238.6062	15.33	0.000001*	0.999266																																																																																																																																																																																																																						
S(A)	197	3067.039	15.56872																																																																																																																																																																																																																									
Total (Adjusted)	199	3544.251																																																																																																																																																																																																																										
Total	200																																																																																																																																																																																																																											
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																																																									
1	80	41.32386	2, 3																																																																																																																																																																																																																									
2	60	42.91685	1, 3																																																																																																																																																																																																																									
3	60	45.05463	1, 2																																																																																																																																																																																																																									
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																						
A: trat	2	108.1063	54.05313	8.10	0.000472*	0.955020																																																																																																																																																																																																																						
S(A)	137	913.8392	6.670359																																																																																																																																																																																																																									
Total (Adjusted)	139	1021.945																																																																																																																																																																																																																										
Total	140																																																																																																																																																																																																																											
Group	Count	Mean	Different From Groups																																																																																																																																																																																																																									
2	40	23.82375	1, 3																																																																																																																																																																																																																									
1	60	25.44617	2																																																																																																																																																																																																																									
3	40	26.05125	2																																																																																																																																																																																																																									
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																						
A: trat	2	29.4561	14.72805	1.58	0.208405	0.332409																																																																																																																																																																																																																						
S(A)	197	1835.388	9.316692																																																																																																																																																																																																																									
Total (Adjusted)	199	1864.844																																																																																																																																																																																																																										
Total	200																																																																																																																																																																																																																											
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																						
A: trat	2	180.4987	90.24934	2.89	0.059138	0.556815																																																																																																																																																																																																																						
S(A)	137	4282.615	31.25996																																																																																																																																																																																																																									
Total (Adjusted)	139	4463.113																																																																																																																																																																																																																										
Total	140																																																																																																																																																																																																																											
Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power																																																																																																																																																																																																																						
A: trat	2	36.26288	18.13144	0.63	0.534157	0.154283																																																																																																																																																																																																																						
S(A)	197	5678.101	28.82285																																																																																																																																																																																																																									
Total (Adjusted)	199	5714.363																																																																																																																																																																																																																										
Total	200																																																																																																																																																																																																																											

Temperatura ambiente							Temperatura ambiente						
Database							Response WI						
Response b							Analysis of Variance Table						
Analysis of Variance Table							Source						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
		(Alpha=0.05)						(Alpha=0.05)					
A: trat	2	54.98013	27.49006	2.69	0.071340	0.525965	A: trat	2	40.00985	20.00493	6.43	0.002134*	0.898427
S(A)	137	1399.094	10.21237				S(A)	137	425.9471	3.109102			
Total (Adjusted)	139	1454.074					Total (Adjusted)	139	465.9569				
Total	140						Total	140					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
Temperatura refrigeración							Fisher's LSD Multiple-Comparison Test						
Response b							Response: wi						
Analysis of Variance Table							Term A: trat						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=137 MSE=3.109102 Critical Value=1.9774						
		(Alpha=0.05)					Group	Count	Mean	Different From			
A: trat	2	12.35586	6.177928	0.55	0.576863	0.140475	3	40	78.2681	Groups			
S(A)	197	2206.044	11.19819				1	60	79.20702	1, 2			
Total (Adjusted)	199	2218.4					2	40	79.64375	3			
Total	200						Response RI						
* Term significant at alpha = 0.05							Analysis of Variance Table						
Temperatura refrigeración							Source						
Response WI							Term						
Analysis of Variance Table							DF						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power		Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	
		(Alpha=0.05)						(Alpha=0.05)					
A: trat	2	2.807954	1.403977	0.36	0.694728	0.108086	A: trat	2	0.1566046	7.830232E-02	0.52	0.594102	0.134745
S(A)	197	757.9528	3.847476				S(A)	137	20.52354	0.1498069			
Total (Adjusted)	199	760.7607					Total (Adjusted)	139	20.68014				
Total	200						Total	140					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
Temperatura refrigeración							Temperatura refrigeración						
Response WI							Response RI						
Analysis of Variance Table							Analysis of Variance Table						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power	Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
		(Alpha=0.05)							(Alpha=0.05)				
A: trat	2	2.807954	1.403977	0.36	0.694728	0.108086	A: trat	2	8.397035E-02	4.198518E-02	0.47	0.628549	0.125338
S(A)	197	757.9528	3.847476				S(A)	197	17.77058	9.020598E-02			
Total (Adjusted)	199	760.7607					Total (Adjusted)	199	17.85455				
Total	200						Total	200					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						

Temperatura ambiente							Temperatura ambiente						
Response YI							Response Fenoles de epicarpio						
<b>Analysis of Variance Table</b>							<b>Analysis of Variance Table</b>						
<b>Source</b>		<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>	<b>Source</b>		<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>					<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>				
A: trat	2	243.3834	121.6917	0.52	0.597569	0.133721	A: trat	2	2275245	1137622	9.05	0.001908*	0.946793
S(A)	137	32258.04	235.4602				S(A)	18	2263469	125748.3			
Total (Adjusted)	139	32501.43					Total (Adjusted)	20	4538714				
Total	140						Total	21					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
Temperatura refrigeración							Fisher's LSD Multiple-Comparison Test						
Response YI							Response: fenoles						
<b>Analysis of Variance Table</b>							Term A: trat						
<b>Source</b>		<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>	Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=18 MSE=125748.3 Critical Value=2.1009						
<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>					<b>Group</b>	<b>Count</b>	<b>Mean</b>	<b>Different From Groups</b>			
A: trat	2	19.2148	9.607402	0.05	0.955589	0.056777	1	9	882.5789	2, 3			
S(A)	197	41653.89	211.4411				2	6	1278.951	1			
Total (Adjusted)	199	41673.1					3	6	1672.727	1			
Total	200												
* Term significant at alpha = 0.05							Temperatura ambiente de pulpa						
Temperatura refrigeración							Response fenoles						
Response Fenoles de epicarpio							<b>Analysis of Variance Table</b>						
<b>Source</b>		<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>	<b>Source</b>		<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>					<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>				
A: trat	2	87904.57	43952.29	0.28	0.758016	0.089737	A: trat	2	43521.9	21760.95	1.19	0.327366	0.227064
S(A)	27	4239577	157021.4				S(A)	18	329459.5	18303.31			
Total (Adjusted)	29	4327481					Total (Adjusted)	20	372981.4				
Total	30						Total	21					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						
Temperatura refrigeración de pulpa							Response fenoles						
Response Fenoles de epicarpio							<b>Analysis of Variance Table</b>						
<b>Source</b>		<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>	<b>Source</b>		<b>Sum of Squares</b>	<b>Mean Square</b>	<b>F-Ratio</b>	<b>Prob Level</b>	<b>Power</b>
<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>					<b>Term</b>	<b>DF</b>	<b>(Alpha=0.05)</b>				
A: trat	2	27332.82	13666.41	1.11	0.344559	0.224178	A: trat	2	27332.82	13666.41	1.11	0.344559	0.224178
S(A)	27	332826.2	12326.9				S(A)	27	332826.2	12326.9			
Total (Adjusted)	29	360159					Total (Adjusted)	29	360159				
Total	30						Total	30					
* Term significant at alpha = 0.05							* Term significant at alpha = 0.05						

Temperatura ambiente						
Response	Ácido ascórbico					
<b>Analysis of Variance Table</b>						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term	(Alpha=0.05)					
A: trat	2	6.105425E-03	3.052712E-03	2.19	0.141091	0.387979
S(A)	18	2.511659E-02	1.395366E-03			
Total (Adjusted)	20	3.122202E-02				
Total	21					
* Term significant at alpha = 0.05						
Temperatura refrigeración						
Response	ácido ascórbico					
<b>Analysis of Variance Table</b>						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
Term	(Alpha=0.05)					
A: trat	2	1.558042E-02	7.790212E-03	4.88	0.015487*	0.756849
S(A)	27	4.307754E-02	1.595464E-03			
Total (Adjusted)	29	5.865796E-02				
Total	30					
* Term significant at alpha = 0.05						
<b>Fisher's LSD Multiple-Comparison Test</b>						
Response: acido						
Term A: trat						
Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=27 MSE=1.595464E-03 Critical Value=2.0518						
Group	Count	Mean	Different From Groups			
1	12	0.1404195	3			
2	9	0.1481654	3			
3	9	0.1929744	1, 2			



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00212

Matrícula: 2143808442

ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS Y BIOLÓGICAS DE MICROENCAPSULADOS DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE NEEM EN MATRICES DE QUITOSANO

En la Ciudad de México, se presentaron a las 13:00 horas del día 14 del mes de mayo del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. MIQUEL GIMENO SECO  
DRA. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA  
DRA. ADRIANA HERNANDEZ RANGEL  
DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGIA

DE: CARMEN GUADALUPE HERNANDEZ VALENCIA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

CARMEN GUADALUPE HERNANDEZ VALENCIA  
ALUMNA

REVISÓ  
  
MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. MIQUEL GIMENO SECO

VOCAL

DRA. MARIA DE LOS ANGELES AGUILAR SANTAMARIA

VOCAL

DRA. ADRIANA HERNANDEZ RANGEL

SECRETARIA

DRA. ANGELICA ROMAN GUERRERO