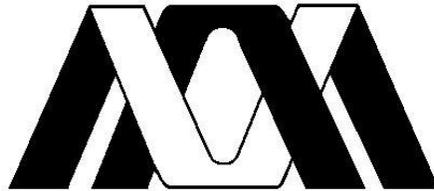


UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**Unidad Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de Biotecnología**

**PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE
Lactobacillus plantarum CON QUITOSANO Y SU APLICACIÓN EN LA
CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD POSCOSECHA DE LITCHI Y
RAMBUTÁN.**

T E S I S

**para obtener el grado de
Maestra en Biotecnología**

Presenta:

I.B.I. Lizbeth Tellez Avila

Directora

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto
Laboratorio de Biopolímeros

Asesores

Dra. Angélica Román Guerrero
Departamento de Biotecnología

Dr. Gustavo Martínez Castellanos
Instituto Tecnológico Superior de Misantla

Noviembre 2014

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

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

La validación tecnológica de los recubrimientos de litchi y rambután fue llevada a cabo gracias al financiamiento de la Fundación Produce Oaxaca A.C. (No. Proyecto P.20-2013-0306 C.13). Asimismo, expresamos el más sincero agradecimiento a los señores productores de la Región del Papaloapán en Oaxaca: Felipe Villaseñor Arano, Químico Roberto Moreno Sada y Rafael Torres Rivera, por las facilidades prestadas para la realización de los trabajos en campo.

México D.F. a 21 de Noviembre del 2014

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

Preparación y caracterización de microencapsulados de *Lactobacillus plantarum* con quitosano, su aplicación en calidad poscosecha de litchi y rambután.

Que presentó:

I.B.I. Lizbeth Tellez Avila

Comité tutorial:

Directora de tesis:

Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto.

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

Asesores:

Dra. Angélica Román Guerrero.

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología.

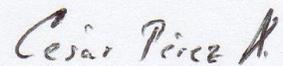
Dr. Gustavo Martínez Castellanos

Instituto Tecnológico Superior de Misantla

H. Jurado:

Presidente:

Dr. César Pérez Alonso. Universidad Autónoma del Estado de México
Universidad Autónoma del Estado de México



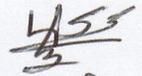
Secretario:

Dra. Angélica Román Guerrero de la Universidad Autónoma
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología



Vocales:

M. en C. Dulce María Sánchez Lima de la Universidad Autónoma
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología



M. en C. Alma Guadalupe Villa Lerma de la Universidad Autónoma
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Biotecnología. Laboratorio de Biopolímeros.



AGRADECIMIENTOS

En especial a la Dra. Keiko Shirai Matsumoto por la confianza, dirección y el apoyo que brindo a este proyecto y a todos los que trabajamos en el

A la Dra. Angélica Román por su tiempo, dedicación y ayuda a lo largo del proyecto.

A los compañeros del laboratorio por la ayuda y comprensión en horas de trabajo. En especial a Carmen por la paciencia y las largas jornadas de trabajo por saber reaccionar ante cualquier problema que se presentó en estos años.

A Rosalio, Lidia, Mariana, Daniela y Juan por el trabajo realizado, las salidas de campo.

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

A el Dr. José D. Sepúlveda por su asesoría en la realización del análisis microscópico de los epicarpios de los litchis tratados con los recubrimientos

A Celia Veronica Reyes Menendez de la compañía Derivados Macroquímicos S.A. de C.V. por la donación de las muestras de Hidroxipropilmetilcelulosa.

DEDICATORIAS

En especial a mis padres Yolanda y Emigdio por su apoyo, cariño, por siempre creer en mí, nunca dejarme sola en ningún momento y por enseñarme tantas cosas en la vida.

A mis hermanos Emmanuel por siempre estar conmigo aun sin estarlo y Alan por su cariño y por tener una sonrisa en momentos difíciles a pesar de ser tan enojón,

A mis ti@s Miguel, Fernando, Paz, Laura, Chely, Mario y a tod@s que siempre confiaron en mí , me apoyaron a lo largo de todo este proceso, a todos porque a pesar de estar lejos siempre tiene tiempo en momentos especiales e importantes en la vida.

A mis abuelos por siempre consentirme y tener palabras de aliento porque sin ustedes nada de esto se podría lograr.

A mis primos Mario, Cristian, Omar, y tod@s por creer en mí siempre y tener todas esas ideas locas, todo se puede lograr si lo quieres.

A los amigos y buenos amigos.....

Contenido

1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
3. MARCO TEORICO	6
4. JUSTIFICACIÓN.....	18
5. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo general.....	19
5.2. Objetivos particulares.....	19
6. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	19
7. HIPÓTESIS	20
7.1. Hipótesis de estadística.....	20
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	21
9. METODOLOGÍA.....	22
9.1. Obtención de quitina y quitosano	22
9.1.1. Obtención de quitina B-Q.....	22
9.1.2. Obtención de quitosano B-Q (Q).....	23
9.2. Caracterización de quitosano B-Q	23
9.2.1. Grado de acetilación (DA).....	23
9.2.2. Peso Molecular (M_v).....	23
9.3. Preparación y caracterización de los recubrimientos	24
9.3.1. Preparación de soluciones de polisacáridos.....	24
9.3.2. Distribución de tamaño de gota.....	27
9.3.3. Determinación del potencial zeta	27
9.4. Bioensayos <i>in vivo</i> de los recubrimientos.....	27
9.4.1. Aplicación de recubrimientos	27
10. DISEÑO EXPERIMENTAL	28

10.1. Bioensayo 1: Pruebas realizadas en litchi concentración y funcionalización de Q en solución y en emulsión con aceite de neem	28
10.3. Bioensayo 2: Pruebas realizadas en litchi concentración y funcionalización de Q, emulsiones y BAL	29
10.2. Bioensayo 3: Pruebas realizadas en rambután comparación de QC, Q y complejos solubles de neem	29
10.4. Bioensayo 4: Pruebas realizadas en litchi comparación de BAL libres y en coacervado para variedades Mauritius y Brewster.	30
10.5. Bioensayo 5: Pruebas realizadas en litchi comparación entre BAL libres y Q	30
10.6. Bioensayo 6: Pruebas realizadas en litchi comparación entre BAL libres y en complejo soluble en variedades Mauritius y Brewster.	31
10.6.1. Pérdida fisiológica peso (PFP)	32
10.6.2. Determinación de sólidos solubles totales (SST).	32
10.6.3. Determinación de acidez titulable (AT)	32
10.6.4. Extracción de fenoles y antocianinas	33
10.6.5. Determinación de antocianinas totales	33
10.6.6. Cuantificación de antocianinas	33
10.6.7. Determinación de fenoles totales	33
10.6.8. Análisis de cambios de color	34
10.6.9. Unidades Infectadas	34
10.7. Caracterización de los recubrimientos en los frutos de litchi.	34
10.7.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del pericarpio de litchi	35
10.7.2. Determinación de viabilidad de BAL en los frutos de litchi	35
11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
11.1. Caracterización de quitosano.....	36
11.2. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de Quitosano y Aceite de neem de <i>Lactobacillus plantarum</i>	37
11.3. Preparación de las emulsiones	38
11.4. Preparación y caracterización de complejos poliméricos	40
11.5. Preparación y caracterización de complejos solubles.....	43
11.6. Pruebas in vivo de los recubrimientos	45
11.6.1. Bioensayo 1.....	46

11.6.3. Bioensayo 2	50
11.6.2. Bioensayo 3	56
11.7. Aplicación en campo de los recubrimientos	62
11.7.1. Bioensayo 4	64
11.7.2. Bioensayo 5	71
11.7.3. Bioensayo 6	77
12. CONCLUSIONES	82
13. TRABAJO RELACIONADO	82
14. TRABAJOS PRESENTADOS	83
15. BIBLIOGRAFÍA	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Relación de CIE $L^*a^*b^*$ con $L^* C^* h$	8
Figura 3.2. Estructura general de las antocianinas (Durst & Wrolstad, 2001).....	9
Figura 3.3 Estructura de las antocianinas en diversos valores de pH (Coultate, 1984).....	9
Figura 3.4. Estructura de quitosano (Marmol et al., 2011).....	13
Fig. 3.5. - Estructura de la HPMC (Sánchez et al., 2010).....	14
Figura 3.6.- Estructura de pectina (López et al., 2011).....	14
Figura 3.7.- Estructura de la Azadiractina (Schaaf et al. 2000).....	16
Figura 8.1.-Estrategia general experimental.....	21
Figura 9.1.- Metodología realizada para la aplicación de recubrimientos.....	28
Figura 11.1.- Espectro de HRMN de quitosano.....	36
Figura 11.2.- Potencial zeta de las emulsiones con aceite de Neem, quitosano funcionalizado con HPMC (Q-g-HPMC) en dos concentraciones 5 y 10 g/L).....	38
Figura 11.3.- Diámetro volumétrico de las partículas en las emulsiones con aceite de Neem, quitosano funcionalizado con HPMC (Q-g-HPMC) en dos concentraciones 5 y 10 g/L.....	39
Figura 11.3.1.- Micrografías de las emulsiones con aceite de neem quitosano funcionalizado con HPMC en dos concentraciones 5(a) y 10 (b)g/L.....	39
Figura 11.4.- Span de las emulsiones con aceite de Neem, quitosano funcionalizado con HPMC (Q-g-HPMC) en dos concentraciones 5 y 10 g/L.....	40
Figura 11.5.- Perfil de potencial zeta de quitosano biológico-químico (Q) y pectina a pH de 2 a 6.....	41
Figura 11.6.- Potencial zeta a pH 4.5 y 5 de las relaciones de Q:P en el día 2 (a) y 3 días (b) después de la preparación y a pH 5 del P+MRS, MRS y BAL (c).....	42
Figura 11.7.-Potencial zeta de los tratamientos a los días 1 y 7.....	44
Figura 11.8.-Span tratamientos a los días 1 y 7.....	44
Figura 11.9.-Diámetro volumétrico a los días 1 y 7.....	45
Figura 11.10.- PFP determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.	46

Figura 11.11.-Concentración de fenoles determinada en los epicarpios de litchi almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %	47
Figura 11.12.- Antocianinas totales determinadas mediante absorbancias por gramo de epicarpios de litchi almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %	48
Figura 11.13.-Cambio de color en los epicarpios de litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	49
Figura 11.14.- PFP determinada en litchi tratados con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	51
Figura 11.15.- Antocianinas totales determinadas mediante absorbancias por gramo de epicarpios de litchi almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	51
Figura 11.16.-Concentración de antocianinas por HPLC calculada con un estándar de cianidina 3-rutinosido durante 13 días.	52
Figura 11.17.- Concentración de fenoles determinada en los epicarpios de litchi almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).	53
Figura 11.18- Cambio de color en los frutos con los tratamientos aplicados durante 18 días.	54
Figura 11.19- Cambio de color en los epicarpios de litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	55
Figura 11.20.- PFP determinada en rambután tratados con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).	57
Figura 11.21.- Antocianinas totales determinadas mediante absorbancias por gramo de epicarpios de rambután almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %	58
Figura 11.22.- Concentración de cianidin-3-rutinósido determinada en los epicarpios de rambután almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %	59
Figura 11.23.- Concentración de fenoles determinada en los epicarpios de rambután almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %	59
Figura 11.24.-Cambio de color en los epicarpios de rambután tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	61

Figura 11.25.- Cultivares de litchi: a) Mauritius (Racimo rojo) y b) Brewster (Ralo rojo).....	63
Figura 11.26.- Mapa de localización de la Región de Papaloapan en Oaxaca en los municipios de Santa María Jacatepec, San José Chiltepec y María Lombardo de Caso.....	63
Figura 11.27.- PFP determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. a) Mauritius b) Brewster.....	65
Figura 11.28.- Antocianinas total determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. a) Mauritius b) Brewster.....	67
Figura 11.29.- Antocianinas HPLC determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. a) Mauritius b) Brewster.....	68
Figura 11.30.- Fenoles determinados en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. a) Mauritius b) Brewster.....	69
Figura 11.31.-Determinación de color a los 0 y 7 días del bioensayo con variedad Mauritius determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	70
Figura 11.32.- Determinación de color a los 0 y 7 días del bioensayo con variedad Brewster determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	71
Figura 11.33.- PFP en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Brewster.....	72
Figura 11.34.- Antocianinas total determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	73
Figura 11.35.- Antocianinas determinadas por HPLC en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	73
Figura 11.36.- Fenoles determinados en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.....	74
Figura 11.37.- Determinación de color a los 0, 21 y 28 días en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %	75

Figura 11.38.-SEM de epicarpio de litchi control (a) y con tratamientos: BAL(b), BAL+Q5g/L (c), Q5g/L(d) y CoBAL (e).....	77
Figura 11.39.- PFP en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.....	78
Figura 11.40.- Antocianinas totales durante 7, 14 y 21 días en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.....	79
Figura 11.41.- Antocianinas determinados por HPLC durante 7, 14 y 21 días en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.....	79
Figura 11.42.- Fenoles determinados durante 7, 14 y 21 días en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.....	80
Figura 11.43.- Viabilidad de BAL en fruto de litchi 7, 14 y 21 días del bioensayo en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.....	80
Figura 11.44.- Determinación de parámetros de color a los 3 y 21 días del bioensayo en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75%.....	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 11.1.- Características de quitosano.....	37
Tabla 11.2.- Crecimiento de <i>Lactobacillus plantarum</i> en MRS adicionado con diferentes concentraciones de quitosano y aceite de neem.....	38
Tabla 11.3.- Potencial Z de los coacervados de Q: P con BAL.....	43
Tabla 11.4.- Resumen de las principales variables de respuesta de los recubrimientos aplicados en epicarpios de litchi y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.	50
Tabla 11.5.- Resumen de las principales variables respuesta de los recubrimientos aplicados en epicarpios de litchi a 10°C y una humedad relativa de 75 %	56
Tabla 11.6.-Unidades infectadas en porcentaje al finalizar los 12 días de almacenamiento a 10°C a una humedad relativa de 75 %.	60
Tabla 11.7.- Resumen de las principales variables de respuesta de los recubrimientos aplicados en epicarpios de rambután a 10°C a una humedad relativa de 75 %	62
Tabla 11.8.- Análisis de medias para los resultados de pH, STT, AT y relación STT/AT en litchi de los cultivares Mauritius y Brewster tratados con los recubrimientos durante los 7 días de almacenamiento.....	66
Tabla 11.9.-pH, SST, AT y su relación en el jugo extraído de los litchi tratado con los recubrimientos.....	72
Tabla 11.10.- pH Sólidos solubles totales acidez total titulable del jugo extraído de los litchi tratado con los recubrimientos.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Aza	Azadiractina
B-Q	Biológico - Químico
BAL	<i>Lactobacillus plantarum</i>
MRS	Man Rogosa Sharpe
SEM	Microscopía electrónica de barrido
Q	Quitosano Biológico-Químico
P	Pectina
DA	Grado de acetilación
M_v	Peso Molecular
CMI	Concentración mínima inhibitoria
PFP	Pérdida fisiológica peso
SST	Sólidos solubles totales
AT	Acidez Titulable
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
N	Aceite de Neem
A	Absorbancia
kDa	kilo Dalton
QC	Quitosano comercial
Q-g-HPMC	Quitosano funcionalizado
NQ-g-HPMC	Emulsión de aceite de neem-aceite de girasol-quitosano funcionalizado
NQP	Complejo soluble Neem Quitosano Pectina
QPBAL	Complejo soluble Quitosano Pectina <i>Lactobacillus plantarum</i>
CoBAL	Coacervado de <i>Lactobacillus plantarum</i>
O/W	Emulsión aceite-en-agua
O/W/O	Emulsión aceite-en-agua-en-aceite
W/O/W	Emulsión agua-en-aceite-en-agua

Preparación, caracterización de recubrimientos de *Lactobacillus plantarum* con quitosano y su aplicación en la conservación de la calidad poscosecha de litchi y rambután.

1. RESUMEN

Los frutos no climatéricos de la familia de las sapindáceas, como el litchi y el rambután, ven afectada su comercialización por problemas de pérdida de peso y oscurecimiento del epicarpio, debido a la degradación de los pigmentos rojos característicos. El pardeamiento es un proceso bioquímico favorecido por el cambio de pH y la deshidratación. Por este motivo se han implementado tratamientos químicos de conservación del color que no obstante su efectividad no garantizan inocuidad de los frutos al ser un riesgo para la salud humana. Por tanto en el presente estudio se propone el empleo de recubrimientos comestibles y biodegradables que no afectan al consumidor. El objetivo del trabajo fue elaborar recubrimientos con polímeros naturales y bacterias lácticas que mantuvieran el color rojo de los epicarpios de los frutos de rambután y litchi. Las aplicaciones en litchi se realizaron tanto en laboratorio como en campo, éstos últimos fueron llevados a cabo en las fincas de productores cooperantes en la Región del Papaloapan en el estado de Oaxaca.

Las características funcionales de los componentes de los recubrimientos empleados fueron aprovechados tales como su actividad antimicrobiana, biodegradabilidad y biocompatibilidad del quitosano; nematocida y fungistática del aceite de neem (N); así como la producción de ácido láctico *in situ* de *Lactobacillus plantarum* (BAL). Se elaboraron diversas formulaciones con estos componentes variando las concentraciones de 5g/L y 10 g/L, asimismo se modificó químicamente el quitosano nativo mediante funcionalización con hidroxipropilmetilcelulosa (Q-g-HPMC) quitosano biológico-químico (Q) y comercial (QC) y BAL las cuales se probaron libres en combinación con quitosano B-Q, en coacervados (CoBAL) y en complejos solubles(QPBAL), los tratamientos de CoBAL formulados con quitosano y pectina en relación 1:2 y QPBAL en relación 1:1, debido a las propiedades del quitosano y la pectina, el primero de carácter catiónico y el segundo aniónico. Los tratamientos en emulsión, disminuyeron la pérdida fisiológica de peso (PFP) de los frutos, sin embargo las demás

variables de calidad medidas como las concentraciones de antocianinas totales, cianidina-3-rutinósido y catequina fueron bajas, lo cual pudo deberse a la oxidación del aceite vegetal utilizado en la preparación de las emulsiones. Se compararon los quitosanos Q y QC, siendo el primero el que presentó mejores resultados en la conservación de la calidad poscosecha de los frutos. El mejor tratamiento fue el que contenía a las BAL libres, seguida de COBAL y QPBAL. Los complejos solubles y coacervados obtuvieron buenos resultados en comparación al control pero en algunos bioensayos no hubo diferencias entre estos y el de BAL libre lográndose extender la vida poscosecha de los frutos hasta 21 días.

1. ABSTRACT

The non-climacteric fruits of the family Sapindaceae, as litchi and rambutan, are mainly affected by their weight loss and darkening of the pericarp due to degradation of their characteristic red pigments. Browning is favored by biochemical changes triggered by pH and dehydration. The color conservation treatments based on chemical procedures do not guarantee safety of the fruits for human consumption despite their effectiveness. Therefore, in this study the use of edible and biodegradable coatings that do not affect the consumer health are proposed. The objective was to develop coatings with chitosan and lactic bacteria that maintain the red color of the pericarp in rambutan and lychee fruits. Applications in litchi were performed both in the laboratory and in the field; the latter were carried out on the farms of cooperating producers in the Papaloapan Region in the Mexican State of Oaxaca.

The functional characteristics of the components of the coatings were related to their antimicrobial activity, biodegradability and biocompatibility of chitosan; fungistatic and nematicide from neem oil (N); and lactic acid production *in situ* by *Lactobacillus plantarum* (LAB). Various formulations were prepared with these components by varying concentrations of 5g/L and 10 g/L, also the native chitosan was chemically modified by functionalization with hydroxypropylmethylcellulose (Q-g-HPMC), biological-chemical obtained chitosan (Q) and commercial (QC) and BAL were also tested along with chitosan free BQ in coacervates (CoBAL) and soluble complexes (QPBAL), CoBAL treatments formulated with chitosan and pectin in ratios of 1: 2 and QPBAL at 1: 1 respectively, due to the cationic and anionic

behavior of both polymers. The emulsion treatments decreased the physiological weight loss (PFP %) of fruits, however other quality variables measured as the concentrations of total anthocyanins, cyanidin-3-rutinoside and catechin were low, which was attributed to oxidation of the vegetable oil used in the preparation of emulsions. Chitosans obtained by chemical and biological-chemical methods were compared; the latter showed the best results in the conservation of postharvest quality of fruits. The best treatment was using free BAL followed by soluble complexes and coacervates. Soluble complexes and coacervate treatments displayed better results than control, even when some bioassays did not show significant differences among the earlier and free BAL treatment. The postharvest life of fruits was extended up to 21 days.

2. INTRODUCCIÓN

Los frutos de litchi (*Litchi chinensis* Sonn) y Rambután (*Nephelium lappaceum* L) son frutos que pertenecen a la familia de las "Sapindáceas", ya que estos presentan una vida de anaquel muy corta (2-3 días) debido principalmente a la rápida degradación de los pigmentos que los hacen poco agradables hacia el consumidor y por ser susceptibles a la contaminación microbiana. En los últimos años se han implementado técnicas para la conservación de frutos, entre las cuales se encuentran los tratamientos químicos o biológicos. Los métodos químicos que son los más explotados debido a su eficacia y bajo costo, sin embargo han originado una problemática ya que ocasionan consecuencias negativas en la salud de los consumidores, así como a la generación de resistencia a los microorganismos fitopatógenos; de ahí su rechazo en el mercado internacional, mientras que los biológicos al provenir de fuentes naturales no presentan esta desventaja. El empleo de microorganismos como agentes de control biológico, para solucionar el problema de micro y macro organismos que son patógenos para cultivos, resulta una tecnología emergente (Janisiewicz y Korsten 2002), no obstante su efectividad se ve limitada por la disminución de viabilidad en los frutos por lo que en este estudio se realizó la microencapsulación de BAL, que compiten con microorganismos fitopatógenos como levaduras y mohos por el espacio y nutrientes, además de que por su producción de ácido láctico permite mantener un medio ácido en el epicarpio del fruto y con ello reducir la oxidación del mismo (Martínez Castellanos et al., 2009; 2011); dichos microencapsulados contendrán BAL y aceite de neem, el cual es utilizado por su efectividad anti fúngica en cultivos, con la finalidad incrementando la vida de anaquel de los frutos, debido a la liberación controlada del compuesto activo.

La microencapsulación se define como un proceso en el cual se realiza un recubrimiento de pequeñas partículas o gotitas de un compuesto determinado o la incrustación en una matriz homogénea o heterogénea (Chi-Leung *et al.*, 2012). El compuesto puede ser liberado por diversos mecanismos como la fricción, la presión u otras condiciones que dependan del diseño interior de la cápsula o de la pared. Esta tecnología se ha utilizado durante muchos años en la industria farmacéutica, ya que estos sistemas se consideran como sistemas de liberación

controlada de compuestos, tales como aromas, vitaminas, células; asimismo en la agricultura, para la encapsulación de pesticidas y fertilizantes, sin embargo también se utilizan polímeros para formar un revestimiento o complejo el cual cubre al compuesto de interés por la acción de cargas dando protección, ya que en investigaciones anteriores se observan propiedades de algunos polímeros enfocados a incrementar la eficacia y proveer a los productos características especiales (Ahmadi & Ahmadi, 2007).

La microcápsula consta de un núcleo rodeado por una pared o una barrera de espesor uniforme o no uniforme, que puede estar formado por uno o más polímeros de recubrimiento (Chi-Leung *et al.*, 2012). Como se sabe, la obtención de un tipo de estructura depende de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y de los materiales de recubrimiento, estructura u otra así como del proceso tecnológico elegido.

Entre los materiales empleados se encuentra el quitosano, que es un polisacárido, compuesto de glucosamina y N-acetilglucosamina obtenido por desacetilación parcial de la quitina. La quitina la cual se encuentra en los exoesqueletos del camarón, membrana peritrófica, y los capullos de insectos. El quitosano varía en cristalinidad, el grado de covalencia al unirse a otros componentes de la pared celular y el grado de acetilación debido a sus atributos como la biocompatibilidad, propiedades de biodegradación y propiedades bactericidas (Kumar *et al.*, 2004).

3. MARCO TEORICO

Los frutos de la familia "Sapindáceas" como el Litchi (*Litchi chinensis Sonn*) y el Rambután (*Nephelium lappaceum L*) son frutos no climatéricos, es decir su maduración no continua después de que los frutos han sido cosechados o retirados del árbol, ya que no poseen la capacidad de producir etileno en grandes cantidades. En el 2013 en México la superficie de área sembrada de litchi fue de 3,439.73 ha. con una producción de 19,888.05 ton. y un valor de 261,746.89 miles de pesos, mientras que para rambután fue de 221.5 ha, con una producción de 1,860.56 ton y un valor de aproximado de 1,553,299,000 de pesos. No obstante, su importancia económica y comercialización está limitadas por el rápido oscurecimiento del pericarpio en un periodo muy corto (2-3 días) en condiciones ambientales (Zhang., 1997; Akamine, 1960). Las microfisuras que se producen en los frutos son identificadas comercialmente como los mayores contribuyentes en la reducción de su calidad durante el almacenamiento y su transporte. Estos defectos en el epicarpio producen una rápida pérdida de masa y encarecimiento de las características de calidad en los frutos, además de que sirven como entrada de fitopatógenos que promueven cambios de pH, lo que conlleva a la oxidación de las antocianinas presentes (Jacuinde, 2009).

La utilización del SO₂ es un tratamiento químico que hace a perdurar el color de frutos de litchi ya que forma un complejo con las antocianinas, estabilizándolas, evita el crecimiento de microorganismos y limita la actividad de la enzima polifenoloxidasa (PPO). Sin embargo, el uso de este químico a elevadas concentraciones (1-1.5%) origina una decoloración total e irreversible de las antocianinas, mientras que a menores concentraciones (500-2000 ppm) reacciona con el catión flavilo, formando un complejo de adición incoloro. (Sivakumar, et al., 2007). Esto tiene un impacto negativo sobre la inocuidad de la fruta y el medio ambiente debido a que el consumo de sulfitos puede ocasionar reacciones alérgicas en los consumidores y requiere tratamientos de inmersión con ácidos lo que produce efluentes contaminantes.

Los cambios que se ven asociados a la madurez de los frutos y que se pretenden contrarrestar se relacionan con el cumplimiento de los gustos exigidos por el consumidor, entre los parámetros físico-químicos más representativos se encuentran:

Ya que los azúcares son los componentes mayoritarios de sólidos solubles que hay en el en el zumo de la fruta, por eso el contenido de sólidos solubles (SST) estima el contenido de azúcares en la muestra, muchos frutos no climatéricos deben tener un contenido mínimo de SST para ser cosechados (Silva *et al.*, 2003).

La acidez titulable (AT) mide el contenido de los ácidos orgánicos tales como cítrico, málico, oxálico y tartárico, es componente del sabor y tiende a disminuir a medida que el fruto madura.

La firmeza y el color son los principales parámetros para estimar el grado de madurez de un fruto. La firmeza se usa principalmente como índice de cosecha y es medido con instrumentos que registran la fuerza necesaria para una determinada deformación o resistencia a la penetración de un émbolo de dimensiones conocidas. Por su parte, el color es el cambio más notorio en las frutas de clorofilas a los pigmentos naturales de los frutos, el litchi y el rambután contienen pigmentos en el epicarpio que le dan el color rojo, cianidina-3-rutinósido y cianidina-3-glucósido y malvidina-3-acetilglucósido, el primero en mayor concentración (Lee & Mimbire, 1991). El color se mide empleando colorímetros que describen la coloración del fruto determinando los parámetros L* (luminosidad de negro a blanco), a* (de rojo a verde) y b* (de amarillo a azul).

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

Donde C* croma es la saturación del color, la relación que existe entre los parámetros de a y b

$$h^* = \arctg (b/a)$$

Donde h*(ángulo de hue), es el tono de color, que nos muestra en que parte del plan se encuentran los puntos a* y b* (Figura 3.1)

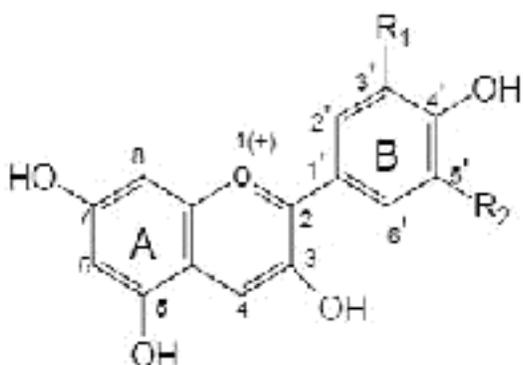


Figura 3.2. Estructura general de las antocianinas (Durst & Wrolstad, 2001).

La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula (Figura 3.3). En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable o de ion oxonio o catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales (A, A^-) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Hutchings, 1999).

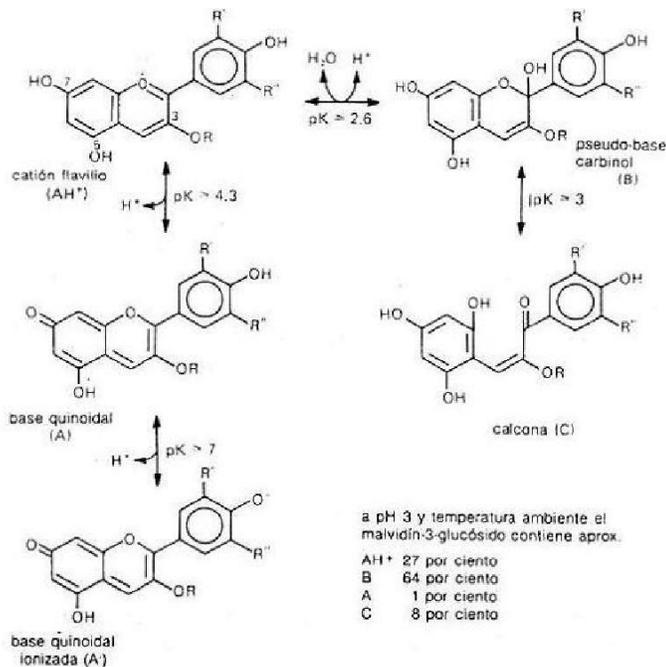


Figura 3.3 Estructura de las antocianinas en diversos valores de pH (Coultrate, 1984)

Por otra parte, existen diversas alternativas comerciales para conservar la calidad de frutos, dentro de los cuales se encuentran los recubrimientos a base de quitosano debido a que es un compuesto no tóxico, biocompatible, biodegradable, antimicrobiano y filmogénico. Por estas características se ha aplicado en la conservación de las características de los frutos, también se estudiado combinado con microorganismos, los cuales controlan el desarrollo de microorganismos fitopatógenos, entre los microorganismos utilizados se encuentran hongos, bacterias y levaduras (Yañez-Mendizabal, 2012), como *Trichoderma harzianum* en rambután (Sivakumar et al., 2000); *Bacillus* en nectarina (Yañez-Mendizabal, 2012); *Lactobacillus plantarum* en rambután y litchi (Martínez-Castellanos et al 2009; Martínez-Castellanos et al., 2010). Las bacterias lácticas pueden ser utilizadas como alternativa para la eliminación de tratamientos químicos como la fumigación con dióxido de azufre (SO₂) e inmersión en soluciones ácidas (Sivakumar et al., 2007) en litchi y rambután, ya que el ácido permiten mantener el pH del epicarpio lo que favorece a la estabilidad de los pigmentos.

Entre las nuevas tecnologías la liberación controlada de activos en un sistema se utiliza polímeros en forma de micro y nanopartículas de interés en la agroindustria ya que muchos de los principios activos utilizados no son solubles en sistemas simples como son soluciones acuosas. Entre los trabajos que buscan obtener sistemas de liberación controlada de compuestos bioactivos en aplicaciones agrícolas (Ahmadi, 2007; Bin Hussein *et al.*, 2009; El Bahri y Taverdet, 2005, 2007; Grillo *et al.*, 2010; Hirech *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2010; Lobo *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2008, 2010), se ha encontrado que los materiales empleados incluyen sílice, bentonita y sepiolita arcillas, y sustancias poliméricas tales como alginato, lignina y polímeros sintéticos (Lobo *et al.*, 2011). Dichos sistemas de liberación se basan en la obtención de sistemas dispersos (emulsiones), los más utilizados son los formados por agua aceite (O/W), aunque dentro de las dobles existen las agua aceite agua (W₁/O/W₂) y aceite agua aceite (O₁/W/O₂), con estos sistemas se busca obtener un sistema de liberación controlada que puede estar basado en la encapsulación de un principio activo en una emulsión que puede ser sencilla o múltiple donde el principio activo se encuentre rodeado de una película interfacial y

una fase inmisible que bajo estímulos específicos del ambiente como la temperatura, fuerza iónica, etc., permita la liberación del principio activo a velocidades controlada.

También hay otros sistemas los cuales se forman por la interacción de polímeros los cuales dan la protección, cuando la interacción es total en el sistema se forma un precipitado (coacervados), la coacervación es un procedimiento de recubrimiento relativamente nuevo, fenómeno que está asociado con las sustancias coloidales, donde el sistema coloidal está constituido por dos fases, una líquida soluble en el sobrenadante y otra rica en biopolímeros (Dong *et al.*, 2011).

Se distinguen dos tipos de coacervación, la denominada coacervación simple y la coacervación compleja, la coacervación simple se produce cuando se tiene un polielectrólito y al agregarse sales se llega a la neutralidad y forma el precipitado, lo que provoca la separación de dos fases, una que contiene una alta cantidad de la sustancia coloidal y otra una muy baja proporción de la misma. La coacervación compleja se obtiene cuando reaccionan dos sustancias de tipo coloidal produciendo un complejo que reacciona en su totalidad y precipita, mientras que también se pueden formar complejos solubles donde estas cargas no interaccionan en su totalidad y forma complejos que son solubles en todo el sistema (Esquivel, 2013).

Para la formación de microencapsulados, complejos solubles y coacervados se emplean diversos compuestos entre ellos los polisacáridos. Éstos son polímeros naturales versátiles debido al amplio espectro de propiedades químicas, físicas y funcionales que confluyen en los organismos vivos, tales como conferir estructura, almacenar energía y otras funciones mucho más especializadas, tales como reconocimiento y adhesión en células eucariontes, señalización y activación de procesos de resistencia en plantas, formación de biopelículas en microorganismos, entre otras. A pesar del elevado tonelaje de polisacáridos que se utilizan como materias primas en las industrias de fibras, textil, papel y alimentos (p. ej. derivados de celulosa y almidones) hay cada vez mayor evidencia que sugiere que ciertas familias de polisacáridos poseen propiedades funcionales tales que pueden ser explotadas en otros sectores industriales especializados como el biomédico, cosmético y farmacéutico. Es especialmente relevante que algunos de estos biopolímeros combinan propiedades fisicoquímicas como la

capacidad de formar sistemas tipo hidrogeles, micro y nanopartículas, con propiedades biológicas como la bio y mucoadhesividad que en su conjunto los hacen particularmente atractivos en la ingeniería y diseño de materiales empleados en ciencias de la salud (Goycoolea *et al.*, 2011).

Los materiales poliméricos utilizados para la elaboración de micro y nanoestructurados empleados en el transporte de productos químicos o activos en la industria alimentaria, farmacéutica entre otras (Chi-Leung *et al.*, 2012; Domínguez-Delgado *et al.*, 2011). Las ventajas de estos materiales incluyen la estabilidad física, química y biológica, los procedimientos de preparación sencilla y reproducible, y la aplicabilidad a una amplia gama de productos químicos. En algunos casos se usa para que el principio activo se libere lentamente y de forma continua, lo que permite el uso de cantidades más pequeñas con una mayor eficacia, lo que reduce el riesgo de los efectos ambientales adversos (Sinha *et al.*, 2004; Sopena *et al.*, 2009; Esquivel Chávez, 20013; Sopena *et al.*, 2009).

Entre los polímeros más empleados debido a sus propiedades fisicoquímicas y funcionales se encuentra el quitosano (Figura 3.4) que es un heteropolisacárido lineal derivado de la *N*-desacetilación de la quitina. Este biopolímero ha recibido atención de todo el mundo debido a sus diferentes características bioactivas como antimicrobianas, antitumorales, antialérgicos, antioxidantes, activantes del sistemas inmunitario, anti-hipertensivos y para bajar niveles de colesterol, además de ser de origen natural, reproduciblemente biológico, casi no tóxico, biocompatible y biodegradable, esto hace que tenga diversas aplicaciones en muchos campos, (Cho *et al.*, 2006; Hwang & Shin, 2000; Klaypradit y Huang, 2008; Boonsongrit *et al.*, 2007; Ling *et al.*, 2011) como en la industria cosmética por su efecto hidratante y cicatrizante, tiene la habilidad de formar geles, como agente floculante en aguas residuales, aditivo alimentario como encapsulante de probióticos (Chávarri *et al.*, 2010).

El mayor impacto del quitosano ha sido en la rama farmacéutica como encapsulante de principios activos o agente de biomedicina (Rabea *et al.*, 2003; Pacheco *et al.*, 2011) ya que al utilizarlo como recubrimiento permite la liberación controlada de fármacos aplicados vía oral,

ocular, nasal y ótica, debido a su compatibilidad con las mucosas del organismo, (Goycoolea *et al.*, 2011). También se ha dado el auge en el sector agrícola, en la conservación poscosecha (Martínez- Castellanos *et al.*, 2009; 2011), tanto por ser un compuesto antimicrobiano y filmogenico, éste es utilizado en recubrimientos para la preservación poscosecha de frutos como litchi (Martínez- Castellanos *et al.*, 2011;) y papaya (Ali, *et al.*, 2010).

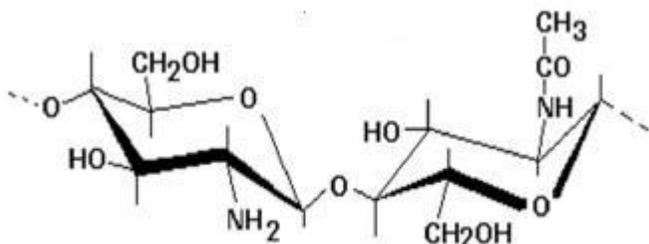


Figura 3.4. Estructura de quitosano (Marmol *et al.*, 2011).

Se ha evaluado y confirmado su actividad fungicida, mediante la inhibición de la germinación de las esporas de *Aspergillus niger* y *Penicillium digitatum* (Pacheco *et al.*, 2008).

Otro polímero muy utilizado en la industria, es la celulosa y sus derivados, como lo es la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) presentada en la Figura 3.5, polímero no iónico que procede de la esterificación con halogenuros de alquilo, la HPMC es empleada como aglutinante de granulados, agente de recubrimiento, estabilizante de suspensiones y emulsiones (Ansel *et al.*, 2004)., evita la coalescencia y formación de sedimentos en coloides, en la industria cosmética como en gotas oftálmicas así como el uso en productos alimenticios, para sistemas de liberación controlada de fármacos (Sánchez *et al.*, 2010).

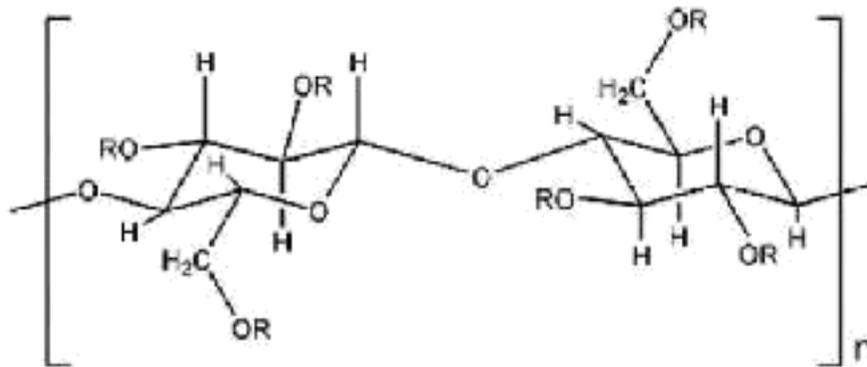


Fig. 3.5. - Estructura de la HPMC (Sánchez et al., 2010).

La pectina (Figura 3.6) polisacárido de alta demanda en la industria de los alimentos, es uno de los principales componentes de la pared celular de tejidos vegetales parenquimatosos, se encuentra en los espacios intercelulares de los tejidos vegetales y les confiere propiedades específicas de firmeza y textura. Las pectinas se describen como alternaciones de regiones “lisas” (Homogalacturonanos, HG) y regiones “ramificadas” (Ramnogalacturonanos tipo I, RGI) (Koubala et al., 2008; Schols et al., 2009). Como agente emulsificante, espesante y estabilizante, se caracteriza porque las unidades poliméricas contienen grupos ionizables permitiendo ser utilizado como floculante (Sánchez-Untiveros, 2004) debido a su capacidad para la formación de puentes entre las partículas todo esto depende de las condiciones en las que se encuentra en disolución. Las pectinas en soluciones acuosas tienden a formar largas cadenas polianiónicas coloidales las cuales pueden flocular por acción de iones de carga positiva.

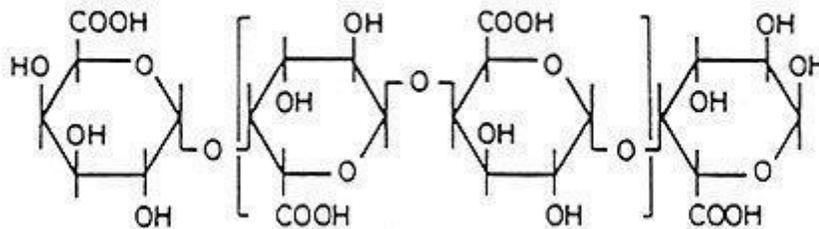


Figura 3.6.- Estructura de pectina (López et al., 2011).

Las pectinas de uso comercial se clasifican en pectinas de alto y bajo metoxilo según su porcentaje de grupos carboxilo metil esterificado, las de alto metoxilo tienen más del 50%; mientras que, las de bajo metoxilo tienen menos del 50%. El grado de metoxilación influye en las propiedades funcionales de la pectina, por ejemplo en la capacidad para formar geles (Contreras- Esquivel et al., 2006; Lopez-Martinez *et al.*, 2011). Las pectinas de alto metoxilo gelifican en medio ácido y altas concentraciones de azúcar. Por otro lado las pectinas de bajo metoxilo lo hacen por su interacción con cationes divalentes, particularmente Ca^{2+} (Sánchez Fiorentini *et al.*, 2004).

Por otro lado las bacterias ácido lácticas (BAL) utilizadas para conservar el color de frutos de litchi en trabajos anteriores (Martínez-Castellanos *et al.*, 2011) son un grupo de microorganismos integrado por géneros con características morfológicas, fisiológicas y metabólicas en común. Pueden ser descritos como cocos o bacilos Gram-positivos no esporulados, anaeróbicos, microaerofílicos o aerotolerantes; los cuales son oxidasa, catalasa y bencidina negativos, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito, son clasificadas como homofermentativas y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de los carbohidratos. (Holt *et al.*, 1998; Herrero *et al.*, 1996).

El género *Lactobacillus* es un grupo de bacterias las cuales tienen poder acidificante y capacidad proteolítica (Waldir, *et al.*, 2007). Los probióticos han sido adicionados a una gama de productos alimentarios como yogurt, bebidas lácteas, quesos, cremas, helados y postres lácteos.

A pesar de las ventajas que implica su ingesta, el mayor problema se ha presentado en la supervivencia de los microorganismos al procesamiento y almacenaje de los alimentos e incluso en procesos posteriores a su consumo, como las agresivas condiciones gastrointestinales. *Lactobacillus plantarum* un microorganismo anaerobio facultativo no patógeno, naturalmente existe en la saliva y tracto gastrointestinal humano, son muy utilizadas en la industria alimenticia debido a su acción como probiótico y usado en la fermentación de alimentos.

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han definido los probióticos como microorganismos

vivos (bacterias o levaduras) que al ser ingeridos o con aplicaciones localizadas en una cantidad suficiente confieren uno o más beneficios previamente demostrados para la salud del huésped. Las bacterias probióticas más empleadas por la industria pertenecen a los géneros

Lactobacillus, con la finalidad de proteger y mejorar la biodisponibilidad de los microorganismos, tanto en los productos alimentarios como en el tracto gastrointestinal (Krasaekoop *et al.*, 2003; 2004).

Mientras que otras fuentes de compuestos antimicrobianos como lo son las plantas, entre ellas el Neem (*Azadirachta indica*), es un árbol tropical que se ha utilizado para el desarrollo de productos médicos e industriales con aplicaciones medicinales contra el cáncer, trastornos de la piel, la diabetes, úlceras, como agente antibacteriano, antifúngicos y antiviral (Jerobin, *et al.*, 2012; Pereyra *et al.*, 2012). El aceite de neem como tal puede actuar como un plaguicida natural, siendo la Azadiractina A limonoide tetranortriterpenoide el principio activo en mayor concentración encontrado en las semillas y las hojas del árbol de neem es la Azadiractina es un compuesto termolábil, fotosensible y biológicamente activo, tiene aplicaciones en productos a base de plantas medicinales, bioplaguicidas, utilizado en nanoemulsiones ya que tiene propiedad larvicida (Jerobin *et al.*, 2012; Anjali *et al.*, 2011)

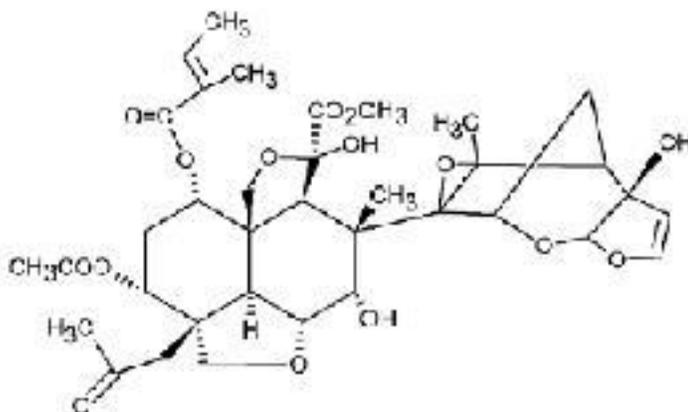


Figura 3.7.- Estructura de la Azadiractina (Schaaf *et al.* 2000).

Su mecanismo de acción se ve reflejado durante la ingesta del principio activo en el aceite de neem la Azadiractina (Aza) (Figura 3.7) por el insecto ya que no lo mata directamente sino que afecta su patrón alimenticio (efecto anti alimentario), el desarrollo de su cuerpo y su

ciclo reproductivo, actuando como una toxina. Así se sabe que Aza interfiere con las glándulas corpora cardíaca y corpora alata, inhibiendo la producción de neurohormona protoracicotrópica, la cual a su vez regula la biosíntesis de las hormonas de la metamorfosis y la hormona juvenil. Estas hormonas son esenciales para los insectos, pues determinan la muda y la maduración de huevos y sin ellas, las larvas en sus primeros estadios no cambian de forma y finalmente mueren, mientras que en los adultos muestran una fecundidad reducida (Orozco y Rodríguez, 2007). Los productos derivados del neem como pesticidas, no sólo afectan a los insectos peste, sino que también tienen efecto sobre algunas bacterias Gram positivas, nemátodos, caracoles y hongos nocivos, incluyendo especies de *Aspergillus* sp. productores de aflatoxinas (Saxena, 2002; Royal Garden Botanics,2006).

4. JUSTIFICACIÓN

El encarecimiento de las características poscosecha en frutos no climatéricos es una gran limitante en su distribución a nivel mundial, existen pérdidas para los productores ya que los atractivos visuales disminuyen y por lo tanto no son aceptados por los consumidores, por consiguiente el generar alternativas para el tratamiento poscosecha de frutos y así aumentar la vida de anaquel representa el reto actual.

En el presente trabajo se propone, quitosano aceite de Neem y *Lactobacillus plantarum*, el quitosano ha sido empleado para la formulación de recubrimientos de frutos para alargar su vida en poscosecha, *Lactobacillus plantarum* una bacteria láctica que degrada azúcares produciendo como metabolito principal al ácido láctico, lo cual permitirá mantener el medio ácido en el epicarpio de los frutos. Se han empleado soluciones ácidas en frutos de litchi para perdurar el color y el aceite de neem como bioplaguicida, buscando que al usar estos compuestos en la formulación de recubrimientos se microencapsulen las bacterias lácticas y el aceite de neem creando una protección de estos principios activos que puedan presentar un efecto sinérgico logrando que el color perdure y se reduzca la contaminación de los frutos en poscosecha.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Preparación y caracterización de recubrimientos basados en el uso de quitosano, aceite de neem y BAL para prolongar la vida poscosecha de litchi y rambután.

5.2. Objetivos particulares

- Establecimiento de las concentraciones mínimas inhibitorias de quitosano biológico químico y aceite de neem sobre la viabilidad de *L. plantarum*.
- Obtención y caracterización de los recubrimientos biopoliméricos con y sin BAL sobre la calidad de los frutos.
- Caracterización de las principales propiedades de calidad en frutos durante su almacenamiento

6. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el recubrimiento que presenta las mejores características fisicoquímicas?

¿Cuál es el recubrimiento que presenta la mayor actividad fungicida sobre los hongos fitopatógenos en los frutos de litchi y rambután?

¿Cuál es el recubrimiento que presenta las mejores condiciones para extender la vida de anaquel en frutos de litchi y rambután?

7. HIPÓTESIS

Los recubrimientos elaborados con polisacáridos solos o funcionalizados y microorganismos disminuirán la contaminación de hongos fitopatógenos, prolongarán el color rojo y la vida poscosecha de litchi y rambután.

7.1. Hipótesis de estadística

Hipótesis nula: Todas las medias de los tratamientos utilizados para prolongar los parámetros de calidad en frutos de litchi y rambután serán iguales.

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6 = \mu_7 = \mu_8 = \mu_9 = \mu_{10}$$

Hipótesis alternativa: Al menos habrá una media de los tratamientos utilizados para prolongar los parámetros de calidad en frutos de litchi y rambután que será diferente de las demás.

$$H_{a1}: \mu_i \neq \mu_j \text{ (donde } i \text{ es un tratamiento y } j \text{ cualquier otro)}$$

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El trabajo realizado se divide en cuatro etapas generales las cuales son:

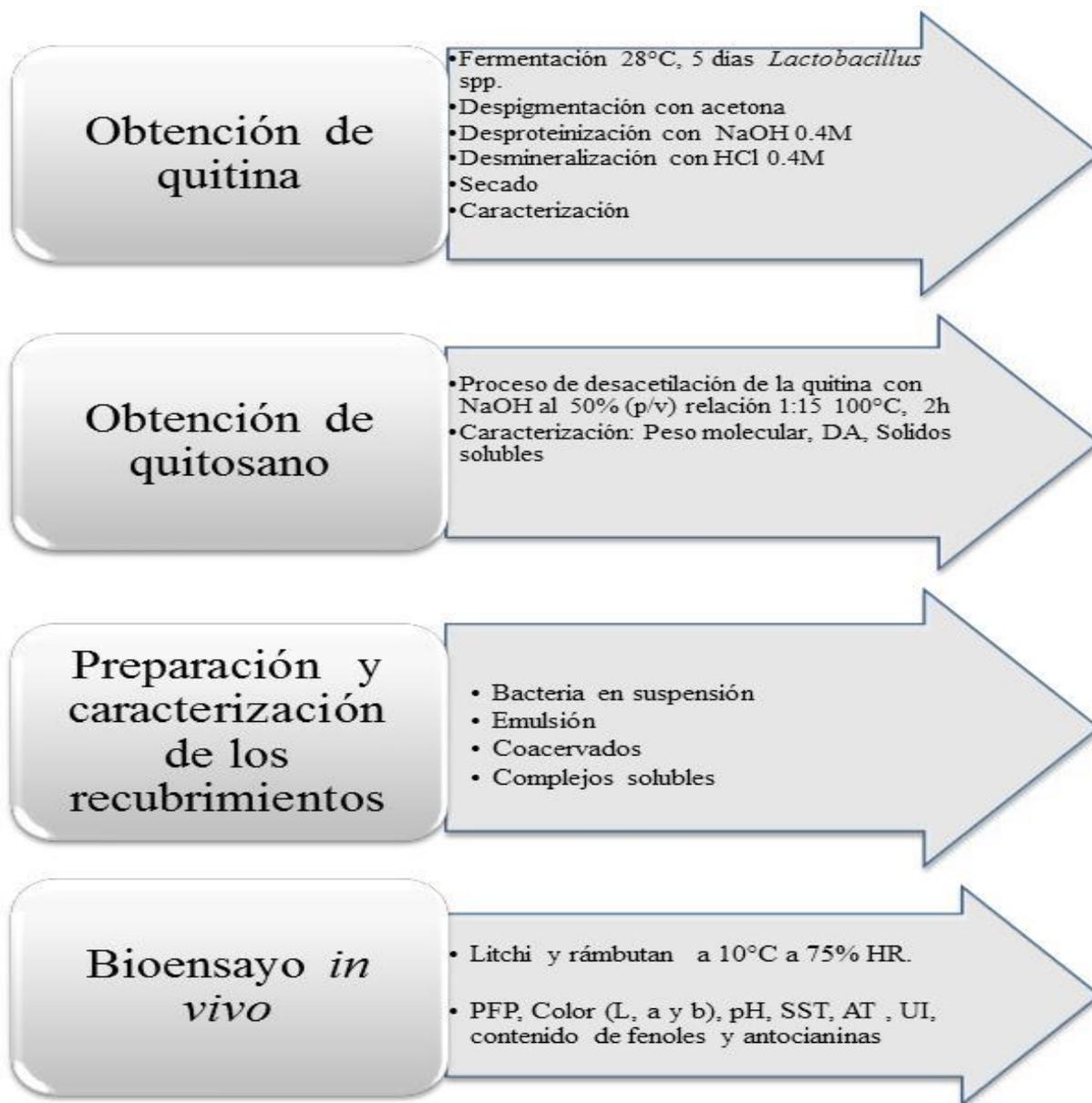


Figura 8.1.-Estrategia general experimental

9. METODOLOGÍA

9.1. Obtención de quitina y quitosano

9.1.1. Obtención de quitina B-Q

Se realizó la recolección de desechos de camarón en naves del mercado de pescados y mariscos del D.F. Los residuos se trituraron con un molino a un tamaño de partícula aproximado de 0.5mm. Se realizó una fermentación de una mezcla de 30 kg de desechos de camarón con un inóculo de *Lactobacillus* sp. (Aislada en el laboratorio de biopolímeros, UAMI) al 5% (v/p) y 10% (p/p) de azúcar de caña en un reactor tipo columna a temperatura de 30°C durante 120 h. Al finalizar la fermentación se obtuvieron dos fracciones, la primera de quitina como un precipitado y la segunda del licor rico en proteína, minerales y pigmentos.

Posteriormente la quitina cruda fue sometida a una purificación química posterior siguiendo la metodología reportada por Cira *et al.*, (2002). Los pigmentos, principalmente compuestos por astaxantinas, se extrajeron con acetona grado industrial en una relación 1:15 p/v con agitación constante durante una hora a 25°C (Gimeno *et al.*, 2007).

La desmineralización se realizó empleando soluciones diluidas de HCl (0.4 M) en relación quitina: ácido de 1:15 a 25°C, con agitación constante durante 1 h. El producto que se obtuvo fue lavado hasta su neutralidad con agua corriente y secado en una cámara aclimatada a una temperatura de 40°C durante 1 h. (Cira *et al.*, 2002).

La desproteínización de la quitina se realizó utilizando una solución acuosa de NaOH 0.4M, con agitación baja constante durante 1 h, a 25°C, con relación 1:15 (p/v) Quitina:NaOH . Una vez concluida la reacción se lavó con agua corriente hasta neutralidad y se secó a una temperatura de 40°C durante 24 h, obteniendo así quitina pura (Cira *et al.*, 2002).

9.1.2. Obtención de quitosano B-Q (Q)

La desacetilación de la quitina para la obtención del quitosano fue heterogénea, se realizó por hidrólisis de los grupos acetamida (en C-2). La quitina obtenida se desacetilo con solución de NaOH al 50% (p/v) en una relación 1:15 a en un reactor enchaquetado con agitación a 100 °C por 2 h. El producto obtenido correspondiente a quitosano se enjuagó con agua corriente hasta la neutralidad y secado en una cámara aclimatada a una temperatura de 40°C para su posterior análisis y caracterización (Juárez, 2010).

9.2. Caracterización de quitosano B-Q

9.2.1. Grado de acetilación (DA).

El grado de acetilación del quitosano (DA) se determinó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (RMN¹H). Los quitosanos disueltos en solución HCl/D₂O (20% p/p) mediante agitación magnética durante 12 h a temperatura ambiente fueron analizados en un espectrómetro Bruker AVANCE-III 500 (Alemania) para ¹H a 298 K. se obtuvieron las áreas correspondientes al grupo metilo y los masivos A y B, integrando las curvas con el programa “Spinworks” (V2.5.5). Posteriormente los valores de las áreas obtenidos se sustituyeron en la ec. 1 (Pacheco *et al.*, 2011).

$$DA(\%) = \left[\frac{\frac{1}{3}A_{CH_2}}{\frac{1}{6} \sum_{i=2}^6 A_{H_i}} \right] \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

9.2.2. Peso Molecular (M_v).

El peso molecular viscosimétrico del quitosano representa una media de los pesos de las moléculas presentes en la muestra, se calcula mediante la determinación de la viscosidad intrínseca. Para tal fin se prepararon soluciones con diversas concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2, 4 g/L de quitosano que fueron disueltos en ácido acético 2% (p/v), acetato de sodio 0.2M utilizado como disolvente. Las soluciones se analizaron en un viscosímetro manual tipo Ostwald con el capilar de 12cm de longitud y 0.4mm de diámetro, a 25 °C para obtener el

tiempo que tardó la solución en recorrer el capilar con el fin de determinar la viscosidad intrínseca del biopolímeros y así estimar el valor de peso molecular (Ec. 2) de Mark – Houwink-Sakurada donde:

$$k = 1.38 \times 10^{-5} \text{ L g}^{-1} \text{ y } = 0.85 \text{ (Kjoniksen, et al., 1997).}$$

Donde $[\eta]$ es la viscosidad intrínseca, M_v fue el peso molecular y k y y , las cuales son constantes que dependen de la naturaleza del disolvente y del polímero (Kumar, 2007).

9.2.3. Determinación de solubles

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

9.3. Preparación y caracterización de los recubrimientos

Para la preparación de las emulsiones complejos solubles y coacervados primero se realizó la preparación de soluciones stock de los biopolímeros a utilizar para llegar a las concentraciones finales usadas en los frutos.

9.3.1. Preparación de soluciones de polisacáridos

Para los recubrimientos a base de quitosano tanto B-Q como Comercial (Fluka peso molecular medio) se utilizaron concentraciones de 5 y 10 (g/L), diluyéndose en ácido acético (J.T. Baker) 1N, bajo agitación durante 4 días para su total disolución.

La solución de HPMC (DEMACSA, Lote: 438/05 Derivados Macroquímicos S.A. de C.V.) se llevó a cabo disolviendo 15g de HPMC en 332 mL de agua a 25° C durante 24 h. Posteriormente se adicionaron 166 mL de etanol y 1.6 mL polietilenglicol-600 diácido (Fluka) bajo agitación a 25° C durante 2 h (Nicio, 2012)

La pectina de bajo metoxilo a concentraciones de 5 y 10 g/L se disolvió en agua destilada bajo agitación durante 24 h.

Reacción de entrecruzamiento o funcionalización de quitosano

Para realizar la reacción de funcionalización del quitosano (Q-g-HPMC) tanto la solución de quitosano como la de HPMC se mezclaron en relación 1:1 Q: HPMC adicionando ácido cítrico a una concentración de 50 (g/L), 37.5 g de fosfato de sodio monobásico y 10 g de sorbitol durante 3 min a 110°C (Nicio, 2012).

9.3.2. Preparación de la suspensión celular

Lactobacillus plantarum subps. plantarum CDBB-B-1115 adquirida de la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares del CINVESTAV, ésta fue inoculada en medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS) e incubada a 30 °C durante 24 h hasta obtener una cuenta de 1×10^9 UFCmL⁻¹. La suspensión celular fue preparada mediante centrifugación de dicho cultivo a 959 g y 20 °C durante 15 min, el pellet fue lavado con solución amortiguadora de fosfatos (pH 6) 0.02M y centrifugadas nuevamente teniendo una solución concentrada de lactobacilos, los cuales se cuantificaron nuevamente mediante cuenta de UFC en placa de agar MRS.

9.3.3. Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC)

Estas fueron determinadas mediante el crecimiento de bacterias en placa, para lo cual el pH del medio MRS se ajustó a pH 5 con ácido acético y se llevó a concentraciones de quitosano de 1, 2.5, 5, 7.5, 10 y 15 g/L, para el aceite de neem se adiciono al medio MRS sin ajustar el pH a concentraciones de 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 16, 17, 20 y 25 g/L. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales seriadas de los microorganismos previamente cultivadas en medio MRS a 30 °C durante un periodo de 24 h y se sembraron alícuotas de cada dilución por extensión en placa (Pacheco et al., 2007).

9.3.4. Preparación de emulsiones, Quitosano-Aceite de Neem (NQ-g-HPMC)

La emulsión de Neem consistió en aceite de Neem-aceite de girasol ($\Phi= 0.3$), la fase continua fue Q-g-HPMC y como emulsionante se usó Tween20 (100g/L), el Neem a una concentración de 16 g/L comprado en Biotecnología Agroindustrial S. A. de C.V. en Morelia, Michoacan, éste se diluyó en aceite de girasol (marca 1, 2,3. Corona S.A. de C.V.), donde la solución de aceites

fue incorporada a la solución de quitosano funcionalizado Q-g-HPMC por goteo en un dispersor de alto rendimiento (Ultra-turrax marca IKA.) a 20,000 rpm por 10 min.

9.3.5. Preparación de complejos solubles con aceite de Neem y BAL

Los complejos solubles fueron formados por solución de pectina y quitosano en concentración 5 y 10 g/L y se mezcló en relación 2:1 P:Q para los coacervados incorporando el aceite de Neem 16 g/L por goteo en el ultra turrax a 20,000 rpm durante 10 min.

Mientras que para la bacteria láctica, la pectina se disolvió en agua durante 24 h, posteriormente se agregó la BAL concentrada en solución amortiguadora de fosfatos 0.02M, para después incorporar por goteo a la solución de quitosano que se encuentra bajo un dispersor de alto rendimiento (Ultra-turrax marca IKA) a 5,000 rpm por 10 min.

9.3.6. Barrido de Potencial zeta en pectina y quitosano biológico químico(Q)

Se determinó el potencial zeta de los biopolímeros a valores de pH de 2, 3, 4, 5 y 6 usando un Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK). El pH de las soluciones de biopolímeros fue ajustado con ácido acético y acetato de sodio. (Jiménez, 2010). Se construyeron gráficas de potencial zeta contra pH y a partir de éstas se determinó el valor de pH donde existe la máxima interacción estequiométrica de cargas electrostáticas entre los compuestos de pectina y quitosano B-Q, para la obtención de coacervados y la mínima interacción para los complejos solubles.

9.3.7. Preparación de coacervados con BAL

Los coacervados se formaron mezclando la suspensión de *Lactobacillus plantarum* en solución amortiguadora de fosfatos 0.02 M (pH 7.0) y solución de pectina para tener una concentración final de (10g/L), estas mezcladas durante una hora para su posterior incorporación, en la solución de quitosano en concentración (10g/L) las soluciones de pectina+BAL:quitosano agregadas en relación 1:1, para formar el precipitado rico en polímeros, el quitosano que se mantiene bajo agitación magnética durante la incorporación de

la solución pectina+BAL con una jeringa (aguja de 3mm) para después ajustar a un pH de 5 con solución de hidróxido de sodio 0.1N.

9.3.2. Distribución de tamaño de gota

El tamaño de partícula ($D_{3,0}$) y la distribución se determinaron por difracción de rayo láser empleando el analizador de tamaño de gota Masterziser Malvern serie 2000 (Malvern Instruments, Malvern, R.U.). Las emulsiones se dispersaron en agua destilada (IR de 1.333) a 200 rpm (Pérez *et. al.*, 2010).

9.3.3. Determinación del potencial zeta

El potencial zeta se determinó utilizando agua como dispersante. Con un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, Worcestershire, UK).

9.4. Bioensayos *in vivo* de los recubrimientos.

En estos bioensayos se dividieron en dos los primeros tres bioensayos realizados en el laboratorio controlando la temperatura y humedad relativa después de la aplicación de los recubrimientos en los frutos y los bioensayos 4, 5 y 6 que se realizaron en campo los cuales se mantuvieron bajo las mismas condiciones no inmediatamente después de la aplicación, si no después de su transporte a la cámara de refrigeración.

9.4.1. Aplicación de recubrimientos

En la selección se conservaron los frutos que no tenían fisuras y que no estuvieran contaminados los frutos en mejores condiciones de comercialización, la aplicación se realizó por inmersión donde los frutos se sumergían en el recubrimiento por completo para después ser secados con aire forzado, pesados y empaquetados en unidades experimentales (UE) de 500g.



Figura 9.1.- Metodología realizada para la aplicación de recubrimientos

10. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se determinó el comportamiento en la pérdida de calidad en los frutos al ser aplicados los recubrimientos con quitosano B-Q y C, los lotes del fruto al haber dos variedades Mauritius y Brewster en, los recubrimientos que pueden ser en emulsión complejo soluble y coacervado y si contenían o no a la BAL

10.1. Bioensayo 1: Pruebas realizadas en litchi concentración y funcionalización de Q en solución y en emulsión con aceite de neem

Tratamientos utilizados en el primer bioensayo con litchi:

Control

- Quitosano 5g/L (Q 5g/L)
- Quitosano 10g/L (Q 10g/L)
- Quitosano5(g/L) -g-HPMC (Q5g/L-g-HPMC)
- Quitosano10 (g/L) –g- HPMC (Q10g/L-g-HPMC)

- Neem+ Q5 (g/L) -g-HPMC (NQ (5g/L)-g-HPMC)
- Neem+ Q10 (g/L) -g- HPMC (NQ (10g/L) -g-HPMC)

FACTOR VARIABLE: Concentraciones, Emulsión, Quitosano nativo, funcionalizado y Tratamientos

VARIABLES RESPUESTA: Pérdida fisiológica de peso (PFP), Color (L*, a* y b*), contenido de fenoles y antocianinas

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) Con prueba de Duncan para la comparación múltiple de medias ($p < 0.05$).

10.3. Bioensayo 2: Pruebas realizadas en litchi concentración y funcionalización de Q, emulsiones y BAL

Tratamientos utilizados en el segundo bioensayo con litchi:

- Control
- Quitosano 5g/L; Q 5g/L
- Quitosano 10g/L ;Q 10g/L
- Q 5(g/L) -g-HPMC; Q (5g/L)-g-HPMC
- Q 10(g/L) -g- HPMC; Q (10g/L)-g-HPMC
- Neem+ Q 5(g/L) -g-HPMC; NQ (5g/L)-g-HPMC

- Neem+ Q 10(g/L) -g- HPMC; NQ (10g/L)-g-HPMC
- *Lactobacillus plantarum* ;(BAL)
- *Lactobacillus plantarum* + Quitosano10 (g/L) ;(BAL+Q (10g/L))

FACTOR VARIABLE: Concentraciones, Emulsión, BAL, Quitosano nativo, funcionalizado y Tratamiento

VARIABLES RESPUESTA: PFP, Color (L*, a* y b*) contenido de fenoles y antocianinas

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) Con prueba de Duncan para la comparación múltiple de medias ($p < 0.05$).

10.2. Bioensayo 3: Pruebas realizadas en rambután comparación de QC, Q y complejos solubles de neem

Tratamientos utilizados en el bioensayo con rambután:

- Control
- Quitosano 5g/L (Q)
- Quitosano Comercial 5g/L (QC)
- Neem +Quitosano5g/L+ Pectina (NPQ)
- Neem + Quitosano Comercial 5(g/L)+ Pectina (NQPC)

FACTOR VARIABLE: Complejos solubles, quitosano comercial y biológico–químico

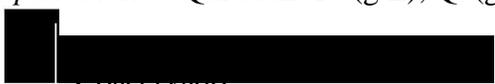
VARIABLES RESPUESTA: PFP, Color (L^* , a^* y b^*), Unidades infectadas, contenido de fenoles y antocianinas

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) Con prueba de Duncan para la comparación múltiple de medias ($p < 0.05$).

10.4. Bioensayo 4: Pruebas realizadas en litchi comparación de BAL libres y en coacervado para variedades Mauritius y Brewster.

Se realizaron micrografías de los epicarpios de litchi solo en variedad Brewster.

Tratamientos utilizados en el bioensayo con litchi:

- Control
- Quitosano 5g/L; Q5(g/L)
- *Lactobacillus plantarum*; BAL
- *Lactobacillus plantarum* + Quitosano10 (g/L); Q5(g/L)+ BAL
- CoBAL  Coacervado

FACTOR VARIABLE: Tratamiento y variedad

VARIABLES RESPUESTA: PFP, Color (L, a y b), pH, SST, AT contenido de fenoles y antocianinas

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) Con prueba de Duncan para la comparación múltiple de medias ($p < 0.05$).

10.5. Bioensayo 5: Pruebas realizadas en litchi comparación entre BAL libres y Q

Tratamientos utilizados en el bioensayo con litchi:

- Control
- *Lactobacillus plantarum*; BAL
- Quitosano 5g/L; Q

FACTOR VARIABLE: Tratamiento

VARIABLES RESPUESTA: PFP, Color (L, a y b), pH, SST, AT, contenido de fenoles y antocianinas

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) Con prueba de Duncan para la comparación múltiple de medias ($p < 0.05$).

10.6. Bioensayo 6: Pruebas realizadas en litchi comparación entre BAL libres y en complejo soluble en variedades Mauritius y Brewster.

Tratamientos utilizados en el bioensayo con litchi:

- Control
- *Lactobacillus plantarum*; BAL
- QPBAL 

FACTOR VARIABLE: Tratamiento y variedad

VARIABLES RESPUESTA: PFP, Color (L, a y b), pH, SST, AT, contenido de fenoles y antocianinas

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) para evaluar los efectos significativos ($p < 0.05$). Con prueba de Duncan para la comparación de medias.

El análisis de las unidades experimentales (UE) de frutos tratados después de aplicados los recubrimientos, se realizó por triplicado en cada UE:

10.6.1. Pérdida fisiológica peso (PFP)

Se midieron los cambios de peso por triplicado de las unidades experimentales (UE) de medio y un kilogramo de fruta por tratamiento durante todo el período de almacenamiento, calculándose la pérdida de peso en porcentaje de acuerdo con la Ec. 3.

Dónde: P_i = peso inicial y P_f = peso final

10.6.2. Determinación de sólidos solubles totales (SST).

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

10.6.3. Determinación de acidez titulable (AT)

Se cuantificó el porcentaje de ácido málico, el cual está presente en mayor concentración en el jugo del litchi, mediante una titulación volumétrica ácido-base (AOAC, 2000). Se tomaron 5 mL de cada unidad experimental (UE) y se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con NaOH 0.1 N. La acidez titulable fue calculada como % de ácido málico mediante la Ec.4:

$$\% \text{ á } = \frac{(V_{\text{NaOH}} \times N) \times 100}{V} \times 0.06705$$

Dónde: V_{NaOH} = Volumen de Hidróxido de Sodio

N = Normalidad

meq = mili equivalentes de ácido málico (0.06705)

V= volumen de la muestra

10.6.4. Extracción de fenoles y antocianinas

Para esta extracción se maceraron los epicarpios de 10 frutos de cada UE de los frutos de litchi y rambután en nitrógeno líquido, posteriormente, se pesaron 3 g de estos epicarpios y se extrajeron dos veces con 45 mL de metanol: ácido clorhídrico 1N en proporción 85:15 v/v la primera por 12 h y la segunda por 4 h. Los extractos se centrifugaron a 12 000 g durante 15 min, a 5 °C. Posteriormente se secaron con nitrógeno en gas y se disolvieron en la mezcla metanol: ácido clorhídrico 1 N hasta el volumen inicial 90 mL de las dos extracciones.

10.6.5. Determinación de antocianinas totales

Esta determinación se realizó con un método espectrofotométrico de acuerdo a lo reportado por Zheng y Tian (2006). Del extracto metanólico obtenido de la UE de cada tratamientos, se tomó una alícuota (6 mL) y se diluyó con metanol: ácido clorhídrico 1N (85:15 v/v); posteriormente, se leyeron en un espectrofotómetro a tres diferentes longitudes de onda (530, 620 y 650 nm) y se utilizó la Ec. 5 para la obtención de la absorbancia total.

$$= (A_{530} - A_{620}) - 0.1(A_{650} - A_{620}) \dots \dots \dots (5)$$

10.6.6. Cuantificación de antocianinas

La determinación de antocianinas se realizó mediante HPLC de acuerdo a lo reportado por Hosseinian *et al.* (2008) para lo cual se tomó una alícuota del extracto y se inyectó en un equipo HPLC Agilent Technology Modelo 1260 Infinity equipado con una columna Agilent Eclipse XDBC18 de 5 µm y un detector UV-Visible. Se utilizó un gradiente de ácido fórmico (4.5 % v/v): metanol en los siguientes tiempos: 0´ 90:10; 30´ 75:25; 40´ 55:45; 42´ 10:90; 50´ 90:10. Para la cuantificación se utilizó un estándar Fluka 36-428 de cianidina-3-rutinósido, la principal antocianina presente en el pericarpio de litchi (Lee y Wiker,1991; Riviera-López *et al.*, 1999).

10.6.7. Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue estimado por un método espectrofotométrico y se expresó como equivalentes de catequina según lo reportado por Jaramillo-Flores *et al.* (2003) y Thililertdecha *et al.* (2008). Una alícuota (0.1 mL) previamente diluida del extracto metanólico

fue transferida a un tubo de ensayo que contenía 7.9 mL de agua destilada. Luego, se adicionaron 0.1 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 5 min, se añadieron 1.5 mL de una solución de carbonato de sodio Na_2CO_3 (200 g/L) y se dejó reaccionar durante 90 min a 25°C ., posteriormente se determinó la absorbancia a 760 nm y se comparó con una curva de calibración realizada con catequina (0-3000 mg /mL de catequina).

10.6.8. Análisis de cambios de color

Para el análisis de los cambios de color de la cáscara de los frutos de litchi y rambután se utilizó un colorímetro Minolta 200 con el cual se determinaron los parámetros cromáticos CIE: L^* , a^* , b^* y c^* y h^* se calcularon con las Ec.6 y 7. La medición de estos parámetros se realizó en 20 frutos de cada UE y en 3 zonas diferentes del fruto en las zonas del pericarpio intactas y libres de oscurecimiento.

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \dots \dots \dots () \quad h^* = \arctg (b/a) \dots \dots \dots ()$$

C^* croma la saturación del color y h^* (ángulo de hue); de la relación que existe entre los parámetros de a^* y b^* que se obtienen del colorímetro.

10.6.9. Unidades Infectadas

Para determinar las unidades infectadas se contabilizaron los frutos totales en las unidades experimentales (UE) de cada tratamiento, se sacaron los frutos contaminados por hongos cada 24 h con lo que al final de cada bioensayo se pudo obtener el porcentaje de unidades infectadas (%UI) a 10°C y una humedad relativa de 75%.

10.7. Caracterización de los recubrimientos en los frutos de litchi.

Con una microscopía electrónica de barrido y viabilidad de BAL en el epicarpio del fruto se observó el comportamiento de los recubrimientos del bioensayo 4 y 6 respectivamente en frutos de litchi.

10.7.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del pericarpio de litchi

Las características morfológicas del epicarpio de los frutos de litchi con los tratamientos aplicados fueron determinadas mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM). Para esto se procedió a cortar una muestra de la cáscara de los frutos y se colocó en glutaraldehído (5 % v/v) para fijar las muestras.

Después las muestras fueron lavadas con solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M pH 7 cada 30 min durante 10 h, y se deshidrataron con gradientes de etanol al 30, 40, 50, 70, 80, 90 % y alcohol etílico absoluto durante tres periodos de 20 min en cada solución. Una vez deshidratadas, las muestras se secaron a punto crítico y después fueron recubiertas con un baño de oro antes de su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-5900LV).

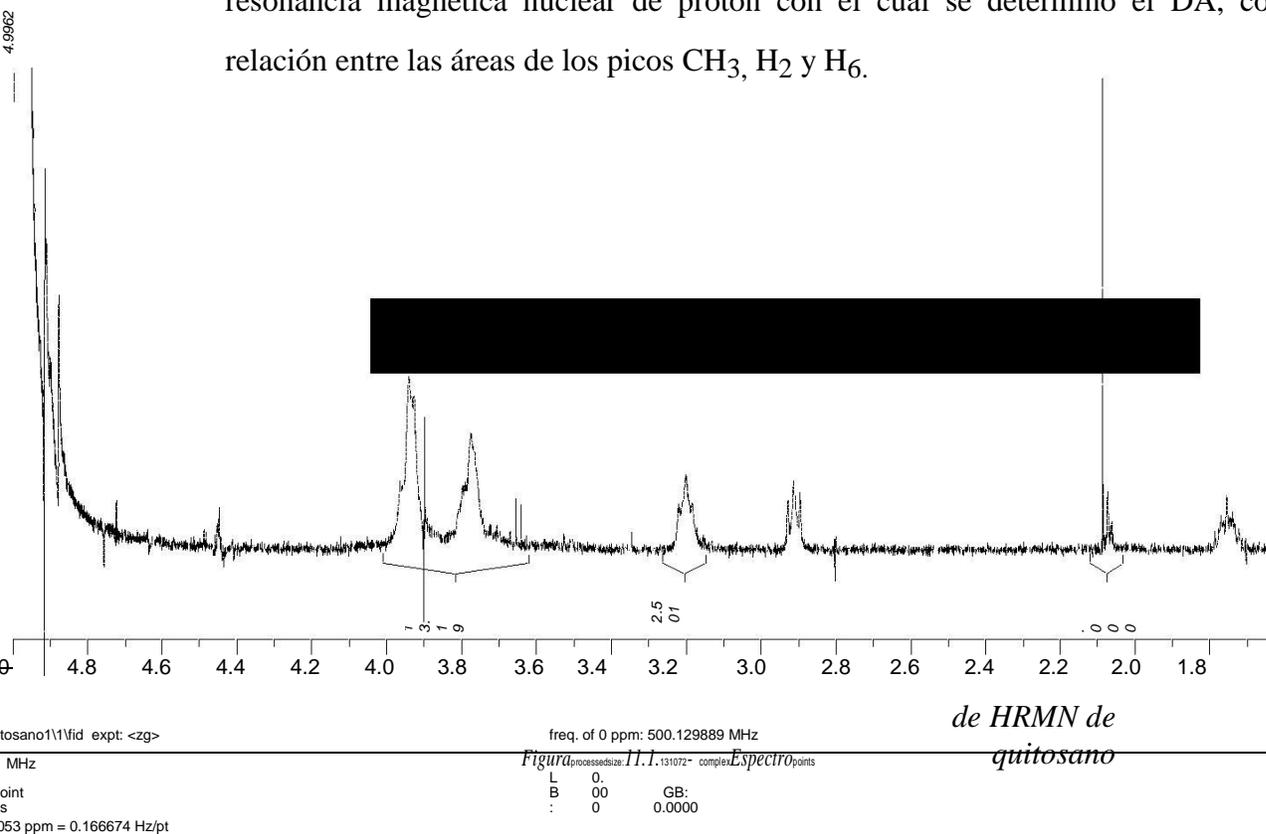
10.7.2. Determinación de viabilidad de BAL en los frutos de litchi

Para la determinación de la viabilidad de los microorganismos en los frutos de litchi, cada fruto fue lavado con 100 mL de solución salina cloruro de sodio NaCl 0.09 % (p/v) durante 1 min. Posteriormente, se tomaron alícuotas y se hicieron diluciones seriadas en placas de agar MRS incubando a 30 °C durante 24- 48 h. La cuenta de las BAL se expresó en unidades formadoras de colonia por gramo de fruto (UFC/g fruto). Las colonias de *L. plantarum* se distinguieron por su morfología de acuerdo con la metodología establecida por Martínez-Castellanos (2009).

11. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11.1. Caracterización de quitosano

El quitosano que se obtuvo por el método biológico-químico y una desacetilación heterogénea se le realizaron pruebas de caracterización como lo fueron DA(%), Peso molecular Solubles en ácido acético 0.1M(%) y potencial zeta(mV) En la Figura 11.1 se muestra el espectro de resonancia magnética nuclear de protón con el cual se determinó el DA, considerando la relación entre las áreas de los picos CH₃, H₂ y H₆.



El quitosano obtenido fue de peso molecular bajo y un alto porcentaje de solubles (Tabla 11.1.). Las propiedades de DA (%), es importante para la acción antimicrobiana del quitosano que obtuvimos (Po-Jung *et al.*, 2006), ya que se requiere la protonación de los grupos amino y esto sucede al disolverse en soluciones ácidas (Rabea *et al.* 2003).

Tabla 11.1.- Características de quitosano

Solubles en ácido Acético 0.1M (%)	Peso molecular	DA(%)	Potencial Z (mV)
99.45±0.15	278.33 kDa	12.72	20.133±1.795

11.2. Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de Quitosano y Aceite de neem de *Lactobacillus plantarum*

Se determinó el crecimiento de *L. plantarum* en los medios MRS adicionados con aceite de neem o quitosano (Tabla 11.2.), observándose que no hubo inhibición de crecimiento de los lactobacilos hasta una concentración de 15 g/L de quitosano, ésta fue mayor a la obtenida por Martínez-Castellanos (2009), reportando una CMI de 0.5g/L con quitosano biológico-químico (Q) de 224 kDa. La CMI determinada para el aceite de neem fue de 16g/L, encontrándose dentro del intervalo reportado. Las concentraciones de aceite de neem que han sido empleadas en la inhibición de hongos se encuentran en el intervalo de 10g/L a 30g/L (Yulia *et al.*, 2006; Bolívar, *et al.*, 2009; Padman y Janardhana, 2011), no hay reportes de actividad inhibitoria sobre bacterias lácticas.

Tabla 11.2.- Crecimiento de *Lactobacillus plantarum* en MRS adicionado con diferentes concentraciones de quitosano y aceite de neem

QUITOSANO (g/L)										
DIAS	CONTROL	M. ACIDO	1	2.5	5	7.5	10	15		
1	+++	++	-	-	+	-	-	-		
2	+++	+++	++	++	++	++	+	-		
3	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+		

ACEITE DE NEEM (g/L)											
DÍAS	CONTROL	1	2.5	5	7.5	10	15	16	17	20	25
1	+++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-
2	+++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
3	+++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-

Donde +++ es un crecimiento mayor, ++ crecimiento menor, + poco crecimiento y - sin crecimiento

11.3.Preparación de las emulsiones

Se realizaron mediciones de Potencial Z en las emulsiones preparadas con aceite de neem a la CMI determinada (16 g/L), quitosano funcionalizado con HPMC (Q-g-HPMC) a dos concentraciones 5 y 10 g/L (Figura 11.2.). No hay diferencias significativas entre los potenciales zeta de las emulsiones preparadas con las dos emulsiones, ambas con valores diferentes de 0 y positivo, por lo que hay repulsión de cargas en el sistema lo que favorece la estabilidad.

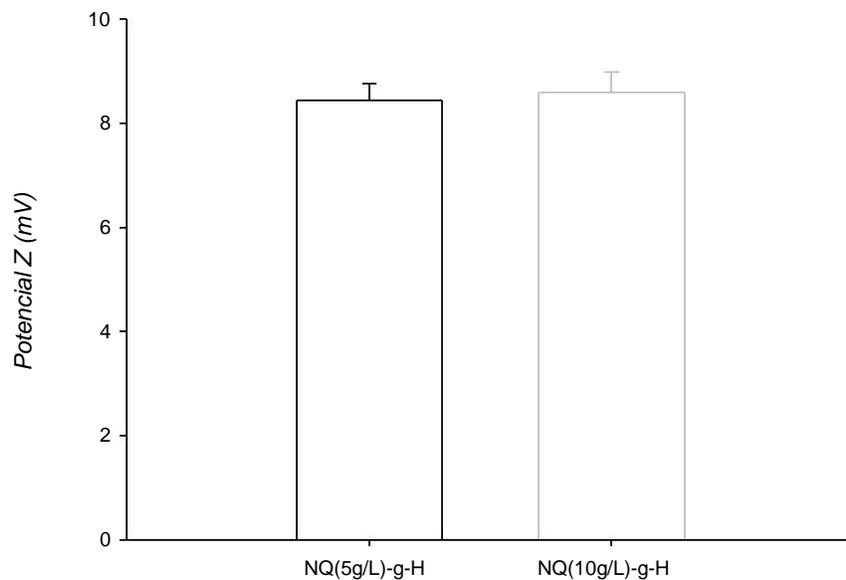


Figura 11.2.- Potencial zeta de las emulsiones con aceite de Neem, quitosano funcionalizado con HPMC (Q-g-HPMC) en dos concentraciones 5 y 10 g/L).

La Figura 11.3 muestra el diámetro volumétrico de gota ($D_{3,0}$) en las dos emulsiones preparadas, en los cuales se encontró diferencia significativa en el diámetro volumétrico. Las partículas de la emulsión NQ(10g/L)-g-H son más grandes que las de NQ(5g/L)-g-H, lo que se puede deber al proceso de funcionalización (Nicio, 2012).

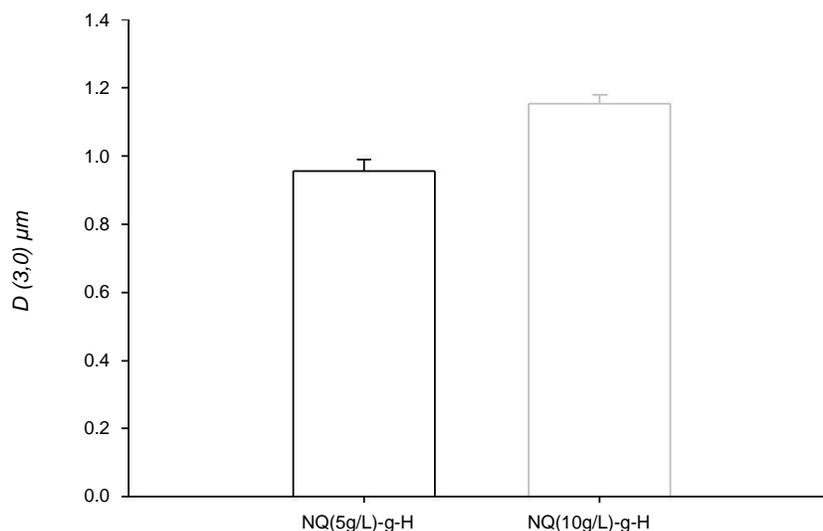


Figura 11.3.- Diámetro volumétrico de las partículas en las emulsiones con aceite de Neem, quitosano funcionalizado con HPMC (Q-g-HPMC) en dos concentraciones 5 y 10 g/L.

Ya que un sistema es más estable debido a que la emulsión fue monodispersa con valores de Span cercanos a la unidad. Esta monodispersidad puede evitar la floculación del sistema, disminuyendo la interacción de gotas de aceite se muestra la morfología de las gotas de aceite en los sistemas con quitosano funcionalizado (Q-g-HPMC) a las dos concentraciones de Q (Figura 11.3.1)

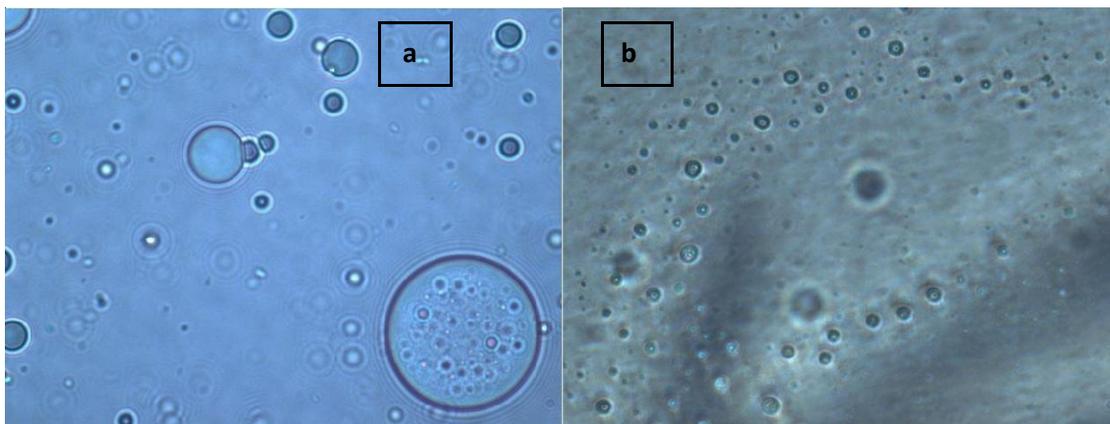


Figura 11.3.1.- Morfología de las partículas en las emulsiones con aceite de neem quitosano funcionalizado con HPMC en dos concentraciones 5(a) y 10 (b)g/L.

La polidispersidad expresada como Span presentó diferencia significativa entre las emulsiones con las dos concentraciones de Q, indicando que la de NQ (5g/L)-g-H es la que presenta las características más favorables (Figura. 11.4.).

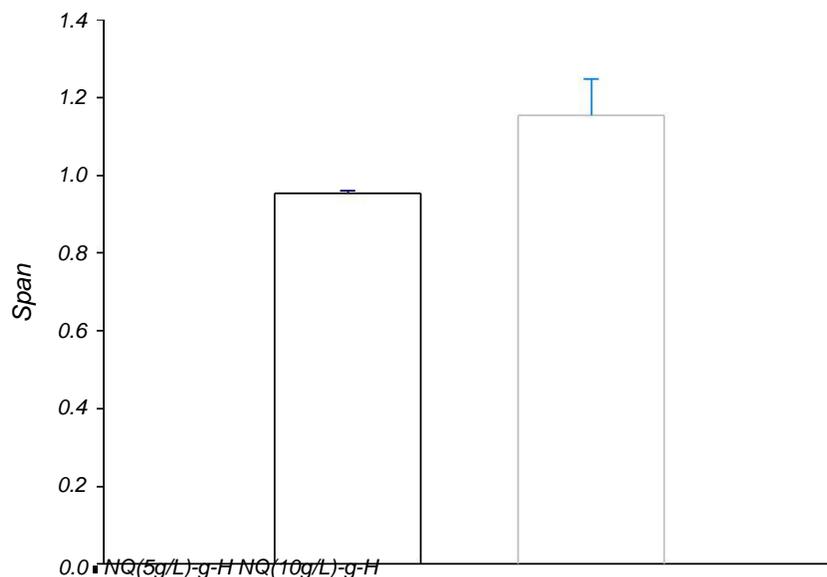


Figura 11.4.- Span de las emulsiones con aceite de Neem, quitosano funcionalizado con HPMC (Q-g-HPMC) en dos concentraciones 5 y 10 g/L.

11.4. Preparación y caracterización de complejos poliméricos

La formación de los coacervados se da cuando la interacción de todos los grupos que interaccionan al solubilizar los biopolímeros de carga opuesta y combinarlos en relación másica adecuada para que estos interaccionen y se llegue a un punto de equivalencia, en el cual el potencial zeta de la mezcla es muy cercano a cero. La Figura 11.5. muestra el cambio de potencial zeta de los biopolímeros con respecto a pH. El potencial zeta del quitosano que se encontraba a un pH de 3.5 ± 0.4 fue diferente de 0 y positivo. Se decidió trabajar en un pH de 4.5 para la preparación de los coacervados, en azul ya que en estas condiciones donde hay una máxima interacción de las cargas entre los polímeros a utilizar, para así poder precipitar y que se obtengan los coacervados lográndose la microencapsulación de BAL. Por otra parte, si se mueve para la derecha o izquierda de estas condiciones, permiten la formación de complejos solubles, en donde se procura que haya una mayor concentración de cargas de alguno de los

biopolímeros para que no se llegue al punto de equivalencia y se encuentren solubles en el sistema, en este caso ya que el quitosano solo es soluble a pH ácidos se trabajaría a pH menores a 4.5.

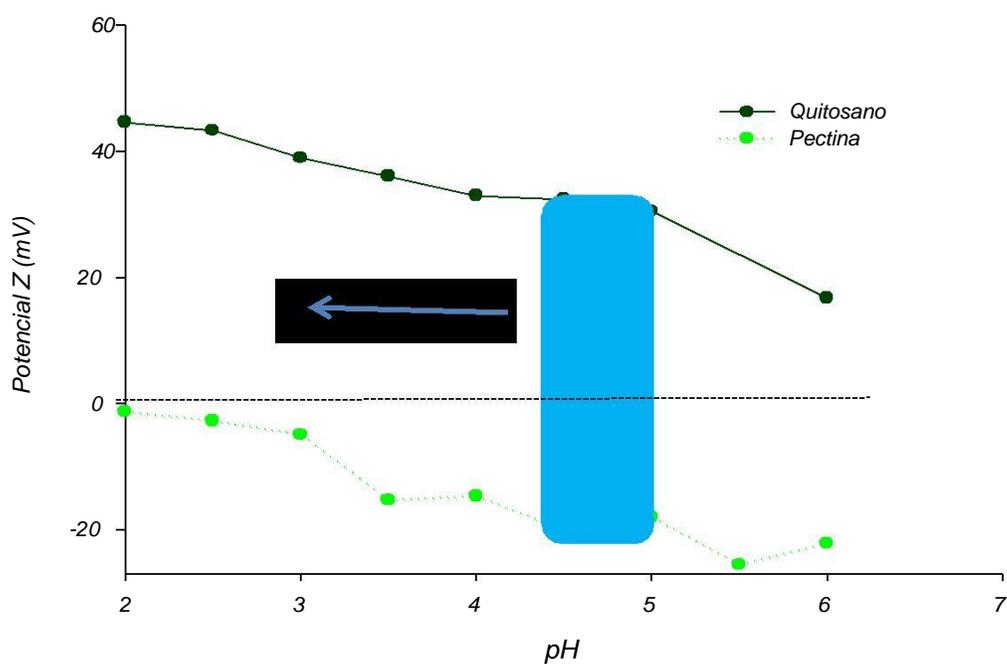


Figura 11.5.- Perfil de potencial zeta de quitosano biológico-químico (Q) y pectina a pH de 2 a 6.

Para afinar la concentración de polímeros a utilizar en la Figura 11.6. se presentan los potenciales zeta de las relaciones Q:P, Q:P con medio de cultivo MRS a pH 4.5 y 5; así como de BAL cultivada en medio MRS durante 24 h, alcanzando en este punto su crecimiento exponencial, después de ser concentradas en solución de fosfatos pH 6. El potencial zeta de los sistemas disminuyó con la concentración de pectina y la BAL, ya que ésta también poseía carga negativa lo cual influye en la formación de los coacervados.

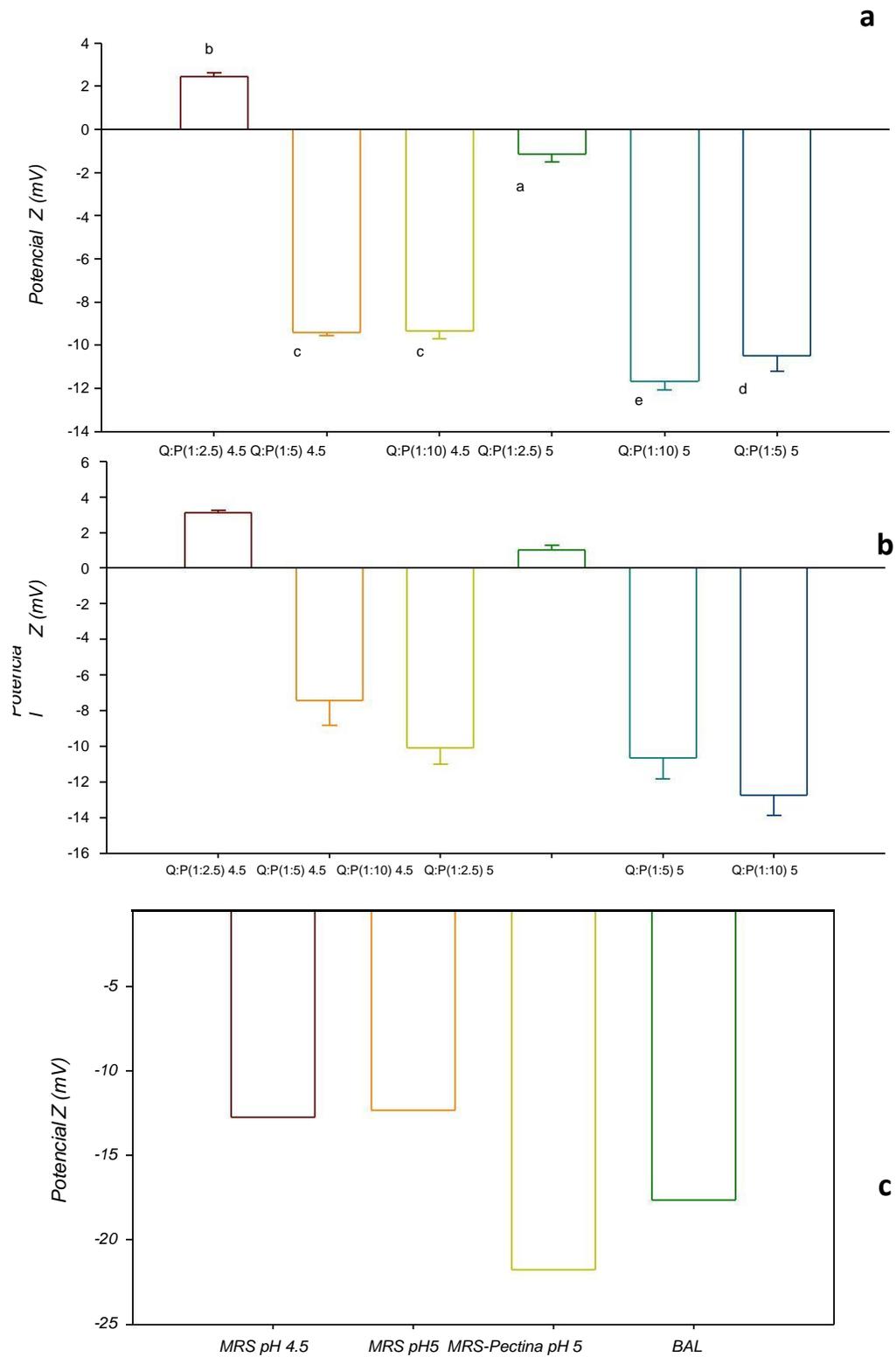


Figura 11.6.- Potencial zeta a pH 4.5 y 5 de las relaciones de Q:P en el día 2 (a) y 3 días (b) después de la preparación y a pH 5 del P+MRS, MRS y BAL (c).

Se realizó la medición del potencial zeta de los coacervados ya contenida la BAL, en la Tabla 11.3 se presentan los valores de potencial zeta los cuales nos muestran que es de cero, ya contenida la BAL en la formulación a las 48 h y 72 h, para corroborar que no hay cambios estructurales de nuestros coacervados en el almacenamiento a las mismas condiciones a las cuales serán almacenados los frutos, 10°C y HR 75% y así ver cómo afectan a los recubrimientos, ya que no hay diferencia significativa en las horas de almacenamiento en el coacervado, tenemos que no afectan estas condiciones en el sistema.

Tabla 11.3.- Potencial Z de los coacervados de Q: P con BAL

<i>Tratamiento</i>	<i>Potencial Z (mV)</i>
<i>Q:P(1:2)+BAL 48h</i>	<i>-0.92±0.67</i>
<i>Q:P(1:2)+BAL72h</i>	<i>-0.56±0.68</i>

11.5. Preparación y caracterización de complejos solubles

Otra alternativa de incorporación del aceite de Neem fue al formar los complejos de quitosano y pectina en el sistema, donde la interacción de estos polímeros constituye una protección polimérica para en aceite de neem. La pectina se varió en relaciones 1:1 y 2:1 P:Q, con Q 5(g/L) se determinó el potencial Z (Figura 11.7). Se observaron diferencias significativas entre las concentraciones de P con que se realizaron los complejos solubles y los días que se midieron. El potencial zeta para la relación de Q:P (1:1) fue el más alejado de cero por lo que es más probable que mantenga el sistema disperso que con el de Q:P(1:2). En cuanto al Span todos los sistemas fueron polidispersos (Figura 11.8). La Figura 11.8 muestra el $D_{3,0}$, con el que se encontraron diferencias significativas entre las relaciones Q:P y días después de la preparación (Figura 11.9).

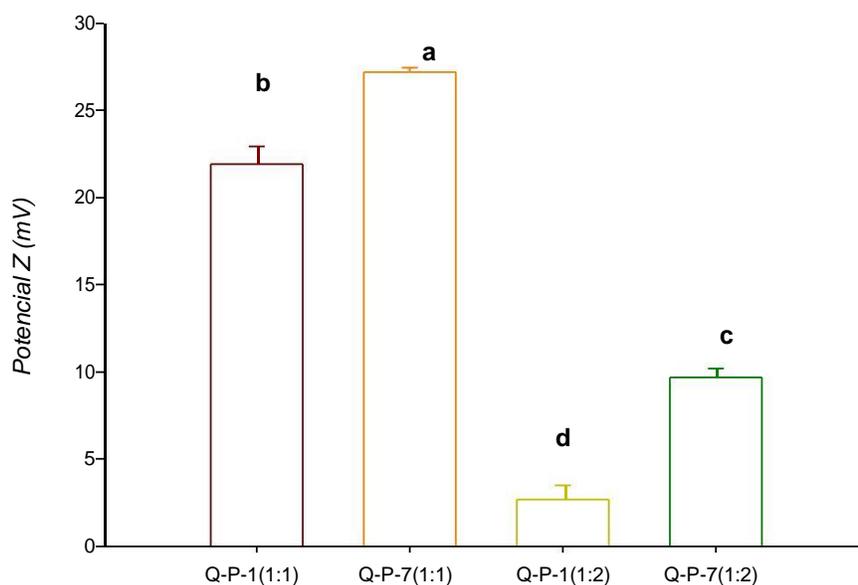


Figura 11.7.-Potencial zeta de los tratamientos a los días 1 y 7. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

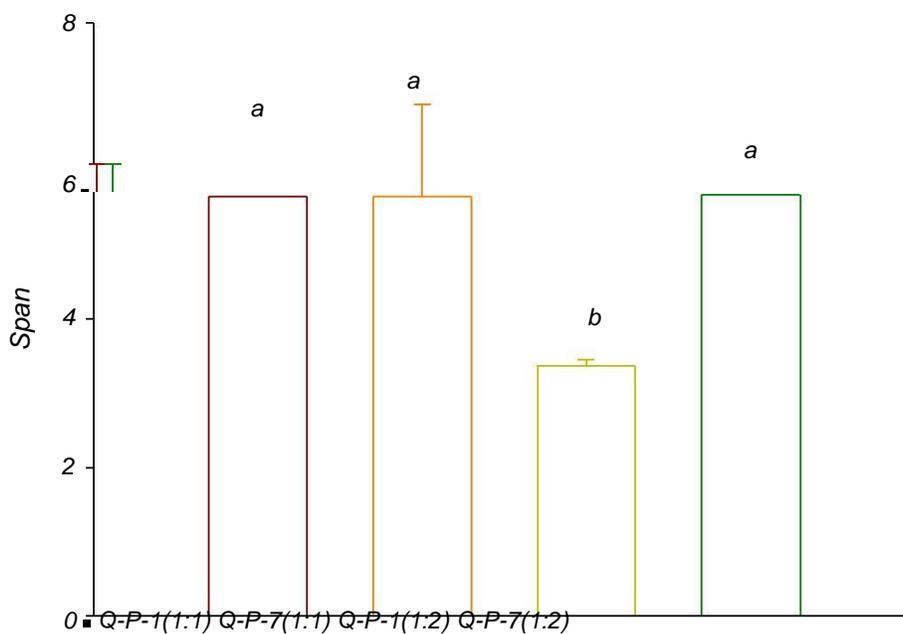


Figura 11.8.-Span tratamientos a los días 1 y 7. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

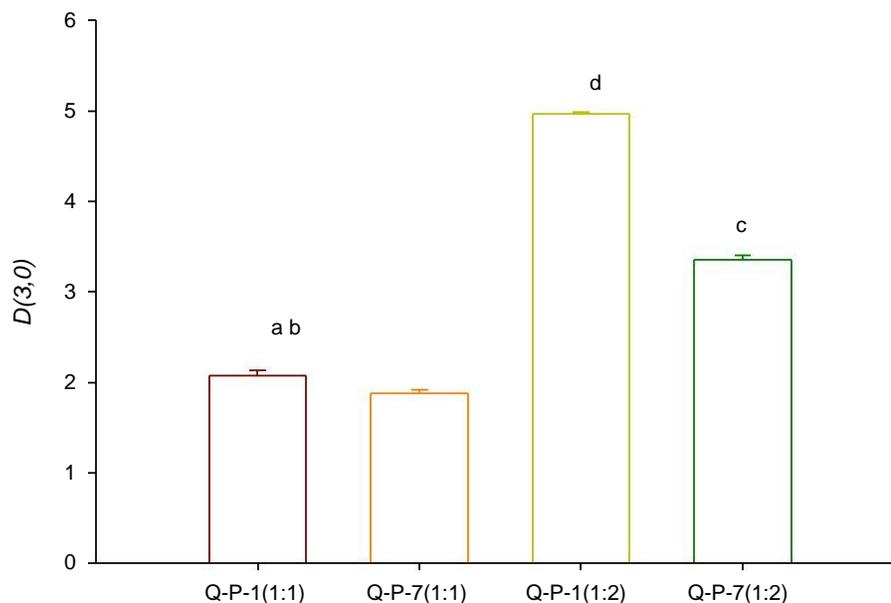


Figura 11.9.-Diámetro volumétrico a los días 1 y 7. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

Con base en los parámetros de estabilidad medidos en los complejos solubles debido a que no hubo diferencia en el día 7 con las concentraciones de pectina y que el potencial Z de la relación Q:P (1: 1) fue la más alta se decidió probar ésta para las siguientes etapas de experimentación. Además se emplearon quitosanos B-Q y C., utilizando las mismas condiciones de preparación obtenidas para el QB-Q aplicadas al QC, debido a que se han reportado diferencias estructurales como el porcentaje de desacetilación (Pacheco et al., 2011).

11.6. Pruebas in vivo de los recubrimientos

Los recubrimientos fueron aplicados en frutos de litchi y rambután, ya que al ser frutos de temporada su producción se limita a ciertos meses del año para el litchi es en los meses de mayo y principios de junio (Maldonado *et. al.*, 2012), mientras que para rambután de junio a agosto (Martínez *et. al.*, 2006).

11.6.1. Bioensayo 1

Este bioensayo corrido en fruto de litchi en mayo 2013 se compararon las concentraciones (5 y 10g/L), funcionalización (Q Y Q-g-HPMC) de quitosano biológico-químico y emulsiones (contienen aceite de neem)

La PFP de los frutos en este bioensayo fue de 10% (Figura 11.10), ésta es menor a la reportada por Martínez- Castellanos et al., (2011) de PFP de 12% y de la determinada por Nicio (2012), PFP 13%, a temperatura de 7°C. Las emulsiones fueron los tratamientos que mantuvieron más baja la PFP en los frutos que se podría deber a que esta formulación contiene los aceites los cuales modifican la permeabilidad de agua del fruto al medio. No obstante, los frutos tratados con las emulsiones presentaron contaminación microbiana después de los 16 días de almacenamiento.

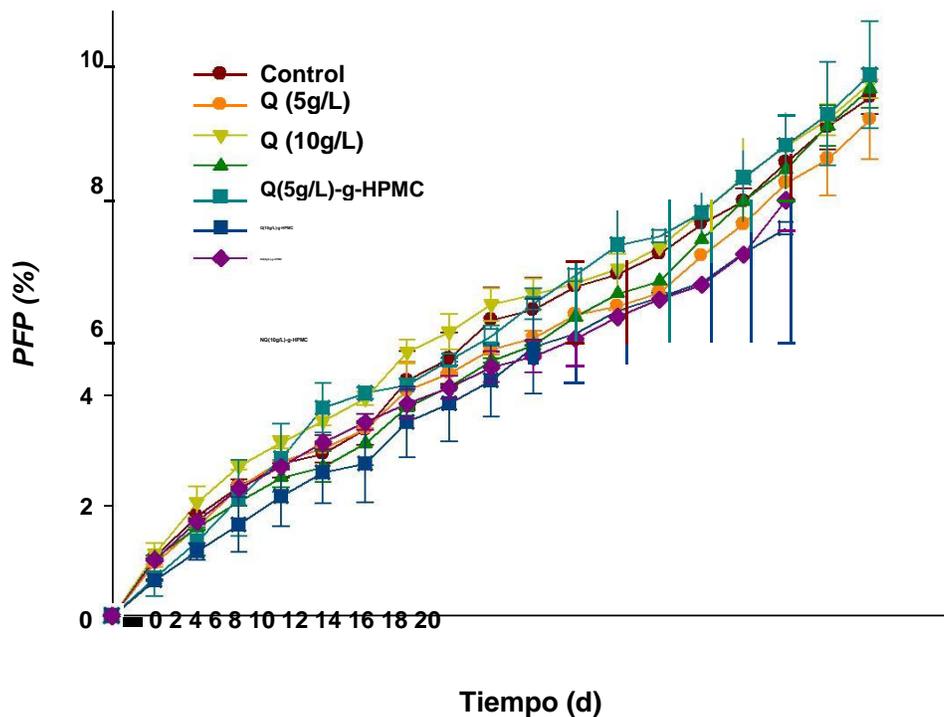


Figura 11.10.- PFP determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

La concentración de fenoles expresados como mg de catequina en los epicarpios de los frutos presentaron un decremento probablemente debido a la degradación de los compuestos fenólicos por las enzimas PPO y PO debido a los procesos bioquímicos que sufre el fruto después de la cosecha, siendo el control el que al final del bioensayo tiene la mayor concentración de catequinas (Figura 11.11).

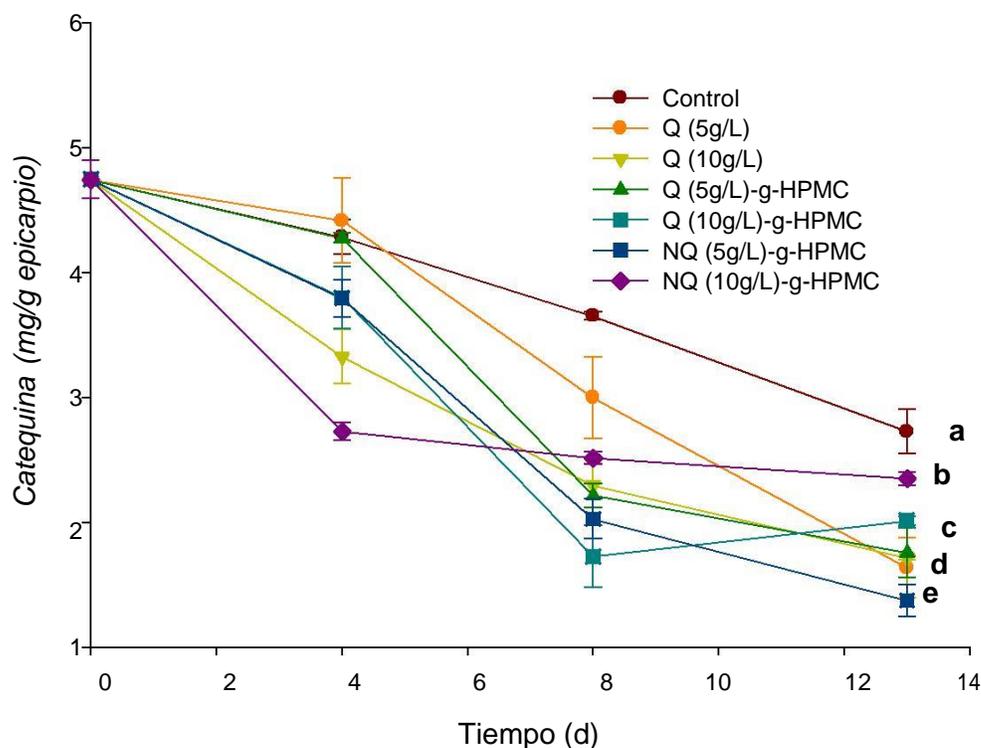


Figura 11.11.-Concentración de fenoles determinada en los epicarpios de litchi almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

Existen reportes de formación de complejos entre los compuestos fenólicos como catequinas y las antocianinas de los frutos, dando estabilidad a estos pigmentos (Zhang, 2001), por lo que en los puntos posteriores a la aplicación del recubrimiento se ve en aumento en la concentración de antocianinas (Figura 11.12), mientras que la disponibilidad de catequinas va disminuyendo (Figura 11.11). En la determinación de antocianinas totales el mejor tratamiento fue Q (5g/L) y el peor tratamiento fue el Q 10(g/L)-g-HPMC.

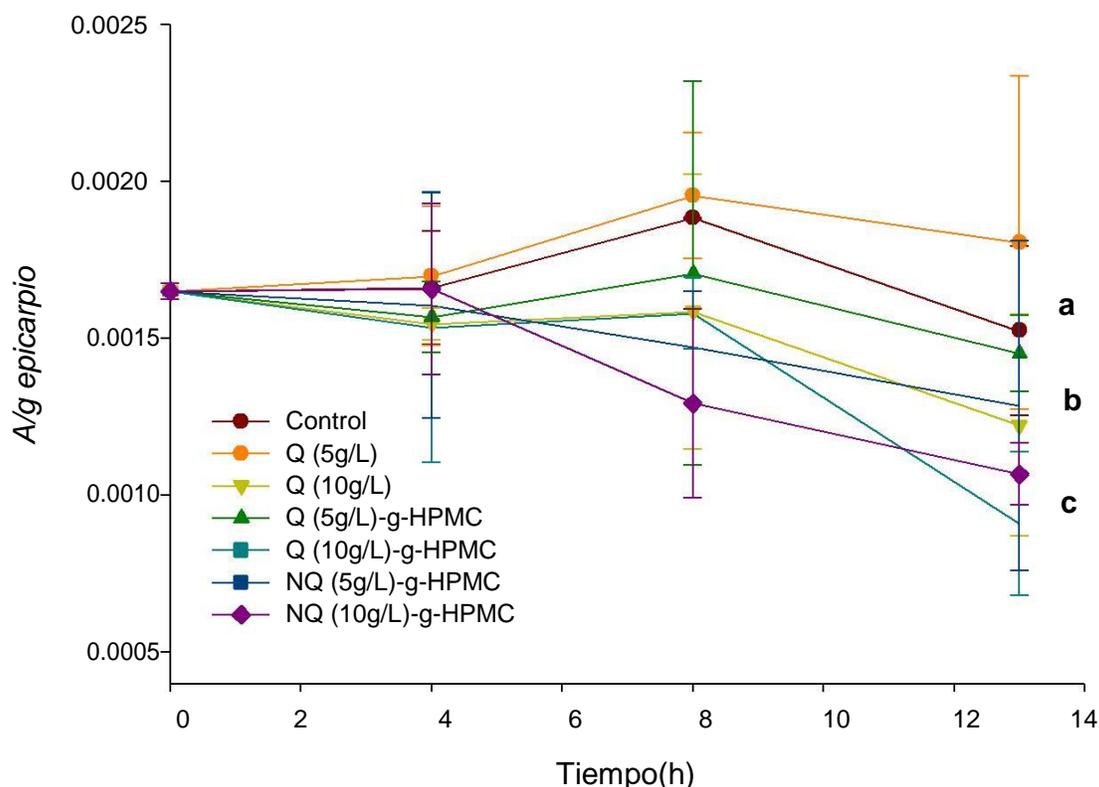


Figura 11.12.- Antocianinas totales determinadas mediante absorbancias por gramo de epicarpios de litchi almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

El cambio de color en los epicarpios de los frutos mediante la determinación de los parámetros L^* , a^* , b^* se muestran en la Figura. 11.13. Se observa como al inicio del ensayo los frutos presentaron mayor luminosidad (L^* 38.5), si esta es mayor nos dice que el fruto se va oscureciendo, para posteriormente al final del experimento disminuir según el tratamiento desde L^* 27 hasta 35.5. En cuanto C^* los valores en todos los tratamientos y el control disminuyeron de C^* 40 a 20 lo que visualmente se observó como una pérdida de viveza tornándose más opacos, mientras que el matiz o color h^* también presentó una disminución. Estos valores de color se encuentran en el intervalo reportado por Martínez-Castellanos (2009), sólo que a diferencia de este autor las determinaciones se realizaron en forma aleatoria y no únicamente en las zonas que permanecían rojas.

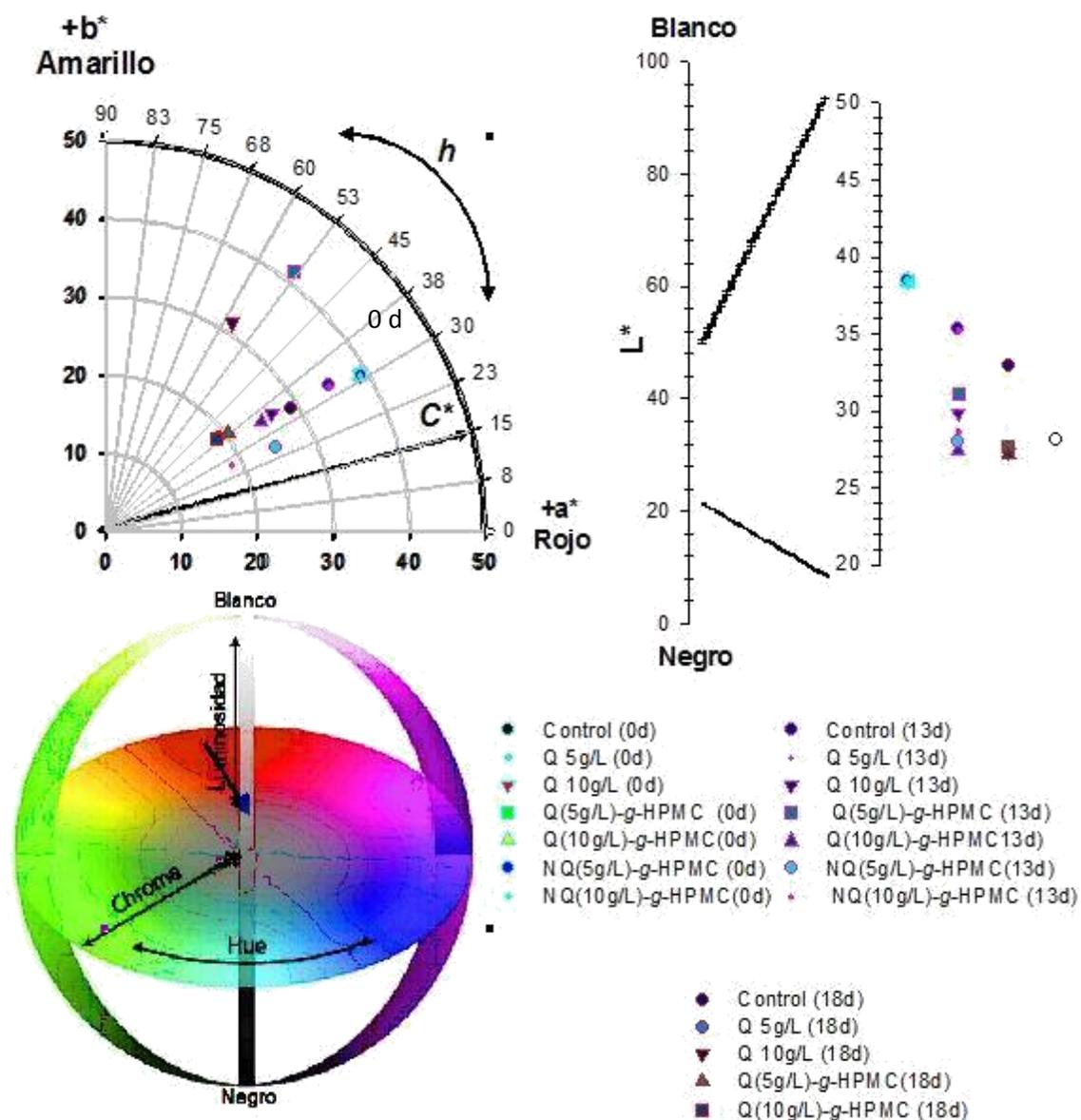


Figura 11.13.-Cambio de color en los epicarpios de litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

La Tabla 11.4 se comparan los resultados de las concentraciones, si los recubrimientos eran emulsiones y si era quitosano nativo o funcionalizado con HPMC. Los mejores tratamientos para prolongar el color de los frutos, fueron aquellos cuya concentración de quitosano era de 5g/L, que no se encontraban en emulsión y el Q que no estaba funcionalizado. No obstante se decidió continuar estudiando las emulsiones ya que disminuyeron significativamente la PFP.

Tabla 11.4.- Resumen de las principales variables de respuesta de los recubrimientos aplicados en epicarpios de litchi y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

Concentración	PFP (%)	Fenoles (mg/g)	Antocianinas Totales (Abs)	Antocianinas HPLC(mg/g)	Color h*
0	3.79 b	3.86 a	0.015	0.24	31.16
5(g/L)	3.37 a	3.1 b	0.015	0.28	30.96
10(g/L)	3.78 b	3.06 b	0.015	0.3	32.28
Emulsion					
Con Emulsión	3.28 a	3.03 b	0.014	0.25 b	28.57 b
Sin Emulsión	3.74 b	3.26 a	0.015	0.28 a	32.73 a
Nativo o funcionalizado					
Nativo	3.69 b	3.36 a	0.013 a	0.028 a	32.02 a
Funcionalizado	3.48 a	3.14 b	0.014 a	0.026 b	30.63 b

11.6.3. Bioensayo 2

Este bioensayo corrido en fruto de litchi en junio 2013 se compararon las concentraciones (5 y 10g/L), funcionalización (Q y Q-g-HPMC) de quitosano, emulsiones (contienen neem) y BAL libres y en combinación con Q.

En este bioensayo se probaron nuevamente las dos concentraciones de quitosano, quitosanos nativo y funcionalizado, en solución y emulsión con aceite de Neem que se compararon con tratamientos de BAL libre y en mezcla con Q (5g/L). Se corroboró que las emulsiones (NQ-g-HPMC a 5 y 10g/L) fueron los mejores tratamientos en mantener las PFPs más bajas, mientras que el tratamiento de Q 10g/L fue el tratamiento que tuvo mayor PFP (Figura 11.14). No se observó un efecto benéfico en el tratamiento de BAL con Q (5g/L) en PFP. Este bioensayo duró 18 días, 3 más que los reportados por Martínez-Castellanos et al (2011) y 1 día más que Nicio (2012).

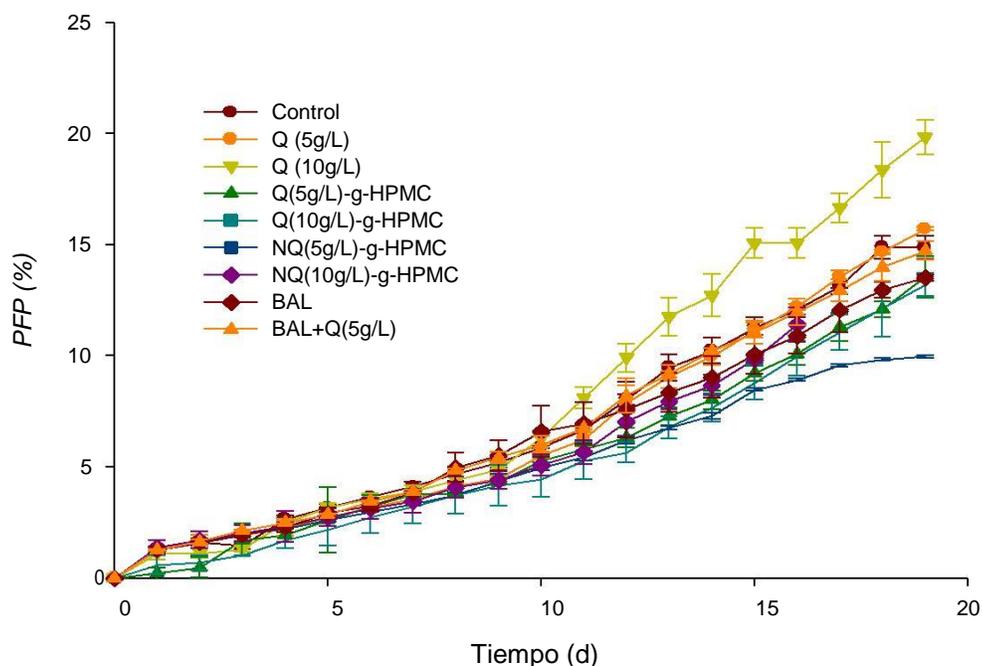


Figura 11.14.- PFP determinada en litchi tratados con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

En la Figura 11.15. se presentan las concentraciones de antocianinas totales determinadas en los frutos. La BAL fue el mejor tratamiento, lo que concuerda con lo reportado por Martínez-Castellanos et al en el (2011); Rodríguez en el (2011).

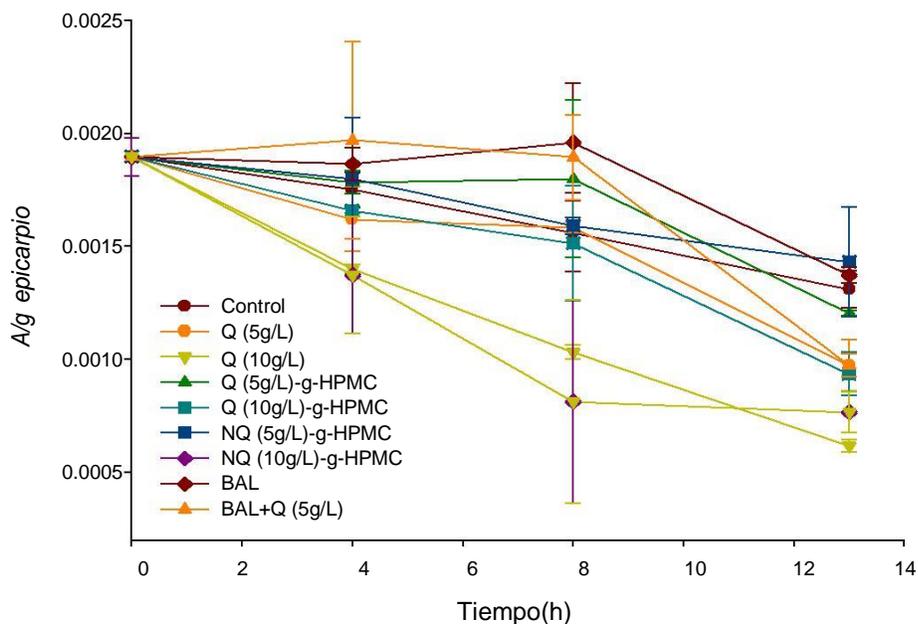


Figura 11.15.- Antocianinas totales determinadas mediante absorbancias por gramo de epicarpio de litchi almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

La concentración de cianidina 3-rutinósido determinada en este bioensayo no presento diferencias significativas entre los tratamientos al final del experimento, sin embargo a los 8 días se observa que la BAL es el mejor tratamiento (Figura 11.16) Este comportamiento se atribuye a la concentración de ácido láctico producido por las bacterias, lo cual favorece la interacción de estos pigmentos con compuestos fenólicos manteniendo la concentración de los mismos, otro tratamiento con el que se determinó una concentración de cianidina-3-rutinósido alta fue Q (5g/L)-g-HPMC.

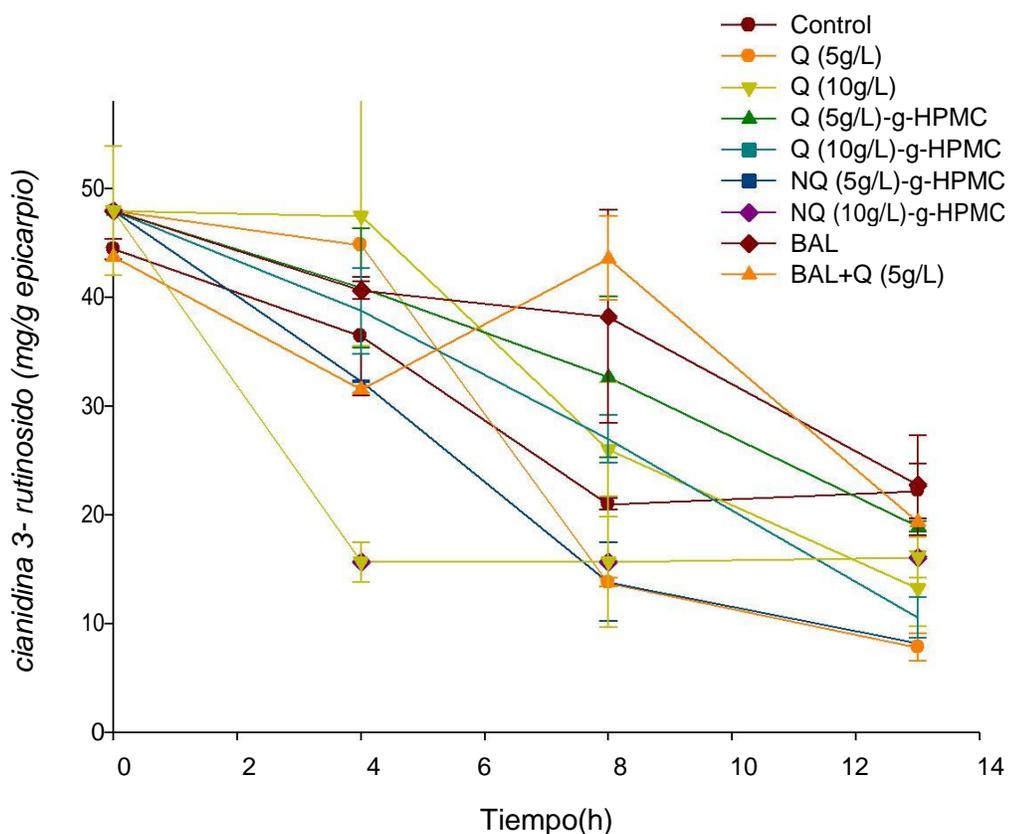


Figura 11.16.-Concentración de antocianinas por HPLC calculada con un estándar de cianidina 3-rutinosido durante 13 días.

Los tratamientos con BAL conservaron mayores concentraciones de catequina en los epicarpios de los frutos, mientras que el peor tratamiento fue otra vez el de Q 10g/L, emulsiones con Q 10g/L (Figura 11.17). La disminución de los compuestos fenólicos nos indica una degradación por acción de las enzimas PPO y PO inducidas por los cambios fisicoquímicos que sufre el fruto.

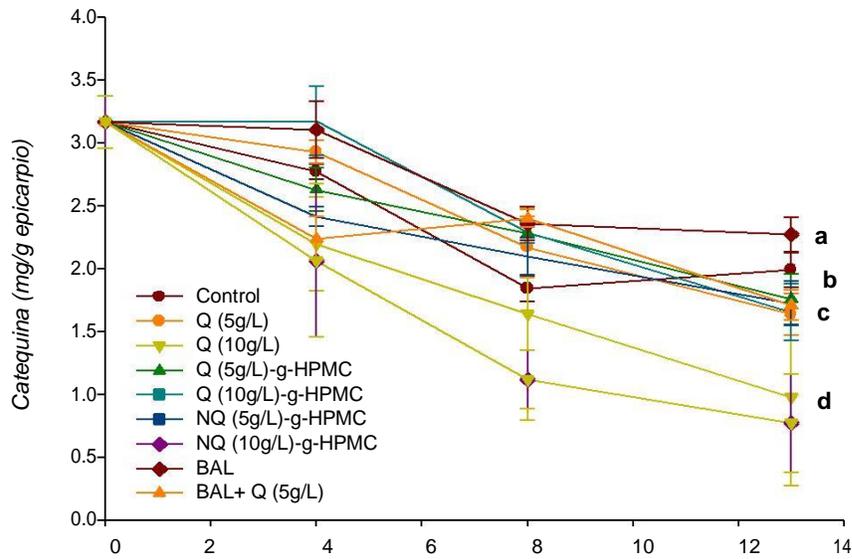


Figura 11.17.- Concentración de fenoles determinada en los epicarpios de litchi almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

Las emulsiones cumplen con la función de mantener el peso del fruto disminuyendo la pérdida de agua, sin embargo para el parámetro de color (rojo), el cual es de los más importantes por ser un parámetro visual de gran impacto en el consumidor, no se obtuvieron los resultados que se esperaban ya que al probar las emulsiones en los frutos, éstos se oscurecían más que con los otros tratamientos. Esto puede ser atribuido a la oxidación del aceite de girasol empleado para la preparación de la emulsión como se puede observar en el oscurecimiento de los frutos a los cuales se les aplico las emulsiones que contenían aceite de neem + aceite de girasol representados en la Figura 11.18.

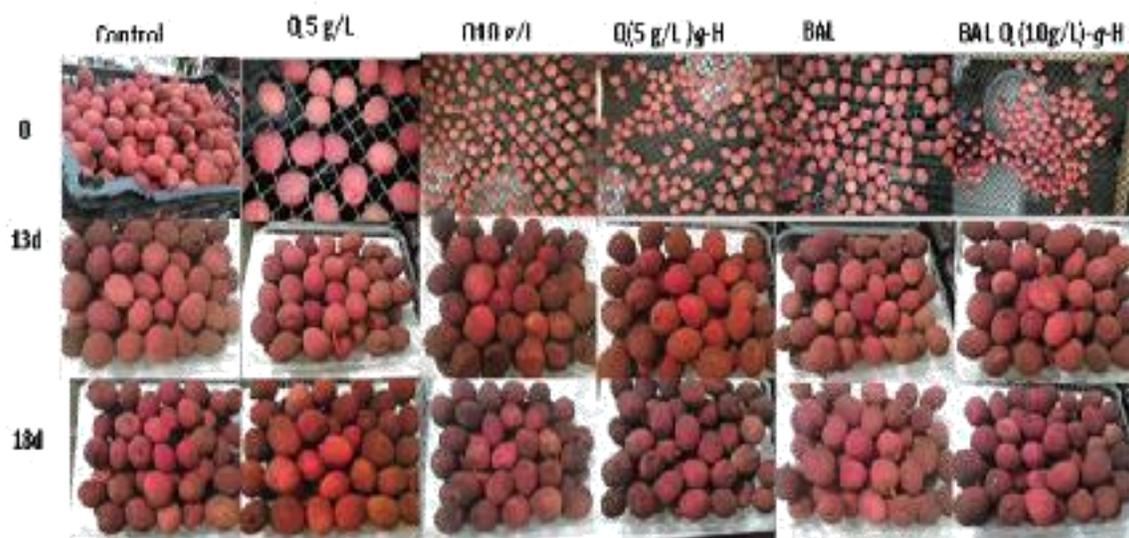


Figura 11.18- Cambio de color en los frutos con los tratamientos aplicados durante 18 días.

En la Figura 11.19 se observa el cambio de color entre el inicio y final del experimento (19 días), se confirma que los tratamientos con BAL son los que presentan un menor oscurecimiento (L^*) mientras que las emulsiones y los quitosanos funcionalizados por el contrario se encuentran entre los tratamientos con menor luminosidad.

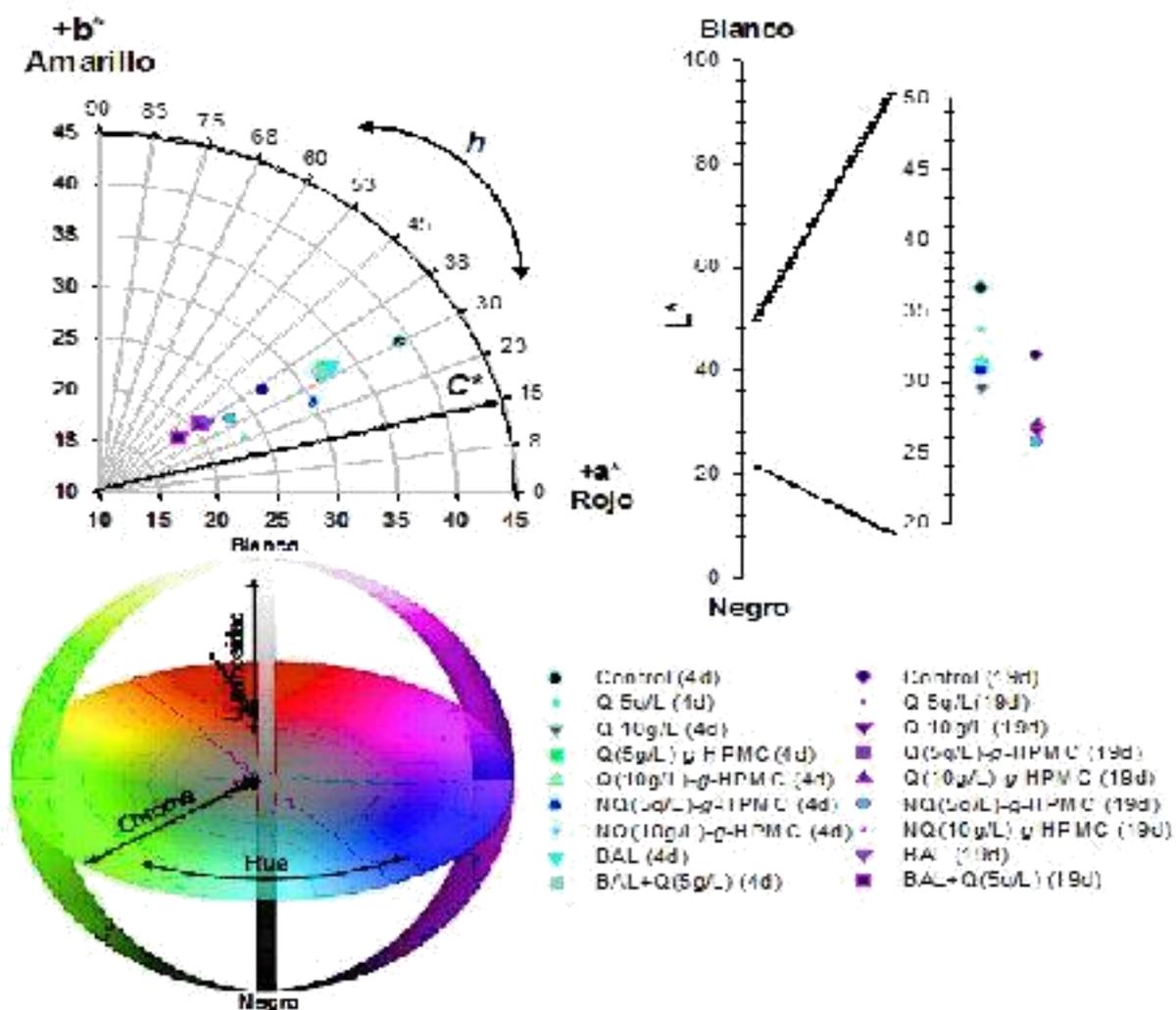


Figura 11.19- Cambio de color en los epicarpios de litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

Con los resultados que se obtuvieron en estos dos bioensayos realizados en litchi se determinó que los mejores tratamientos aplicados fueron el de Q 5(g/L) y de BAL (Tabla 11.5), se descartan los tratamientos en emulsión y se seguirá trabajando con el quitosano que no se encuentra funcionalizado.

Tabla 11.5.- Resumen de las principales variables respuesta de los recubrimientos aplicados en epicarpios de litchi a 10°C y una humedad relativa de 75 %.

Concentración	PFP (%)	Fenoles (mg/g)	Antocianinas Totales (Abs)	Antocianinas HPLC(mg/g)	Color h*
0	4.18 e	2.36 c	0.014 c	0.33 a	30.59 b
5(g/L)	3.73 b	2.22 d	0.015 b	0.21 c	31.58 b
10(g/L)	3.50 a	2.26 d	0.016 b	0.22 c	30.18 c
BAL	4.08 c	2.63 a	0.017 a	0.28 b	31.65 b
BAL+Q	4.15 d	2.39 b	0.016 b	0.27 b	32.10 a
Emulsion					
Con Emulsión	3.57 a	2.02 b	0.014 a	0.17 a	26.08 b
Sin Emulsión	3.85 b	2.38 a	0.015 a	0.26 a	32.6 a
Nativo o funcionalizado					
Nativo	3.89 b	2.38 a	0.016 a	0.027 a	30.72 a
Funcionalizado	3.68 a	2.17 b	0.015 a	0.022 b	29.34 b

Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

A pesar de que los resultados obtenidos con las emulsiones en cuanto al cambio de color, fueron nuevamente las que disminuyeron de forma significativa la PFP, ésta se vio en los bioensayos anteriores al ser el aceite un común en los tratamientos los cuales aceleraban el oscurecimiento de los epicarpios de los frutos. Por lo que para el siguiente experimento se modificó la formulación integrando P pectina (P) que permitirá la preparación de complejos solubles que atrapen el aceite de neem o BAL empleando Q 5(g/L).

11.6.2. Bioensayo 3

Este bioensayo corrido en fruto de rambután en agosto 2013 se comparó los recubrimientos de quitosano y complejos solubles con aceite de neem (NQP), elaborados tanto con quitosano biológico-químico Q y quitosano comercial QC

Los recubrimientos fueron aplicados en rambután debido a que no coincidió con la temporada de producción de litchi. La PFP determinada en los frutos almacenados a 10±5°C a una HR de 75±5% fue de 10%, nuevamente menor a la reportada por Martínez-Castellanos en el (2009) donde a los 15 días hay una PFP del 18%. En la Figura 11.20, se determinaron dos grupos con

diferencia significativa, en donde los tratamientos que tuvieron una menor PFP fueron Q, el complejo soluble elaborado con quitosano B-Q (NPQ) y QC.

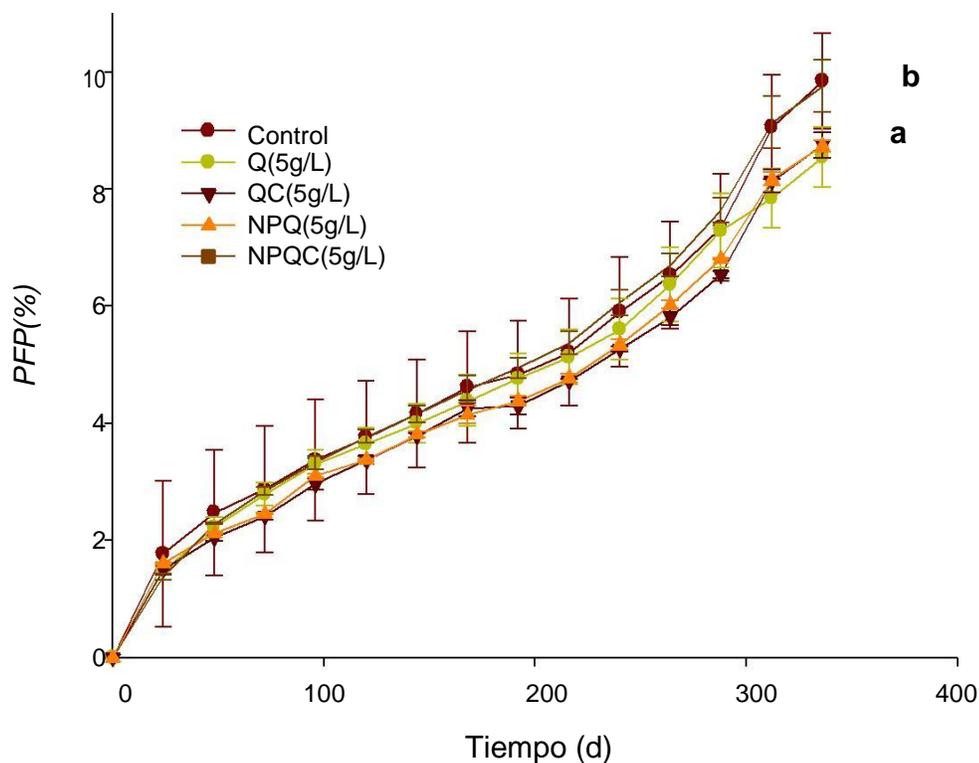


Figura 11.20.- PFP determinada en rambután tratados con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

La concentración de antocianinas totales presentó un aumento en el día 3 después de aplicados los tratamientos, el mejor tratamiento aplicado en rambután fue el complejo soluble a base de quitosano (NPQ) seguido del Q 5g/L, lo cual nos indica que el quitosano biológico-químico, mantuvo menor pérdida de agua ya que ayudó a disminuir la permeabilidad del epicarpio, limitando la deshidratación del fruto lo que hace que este mantenga sus propiedades y por lo tanto retarde la senescencia (Figura 11.21).

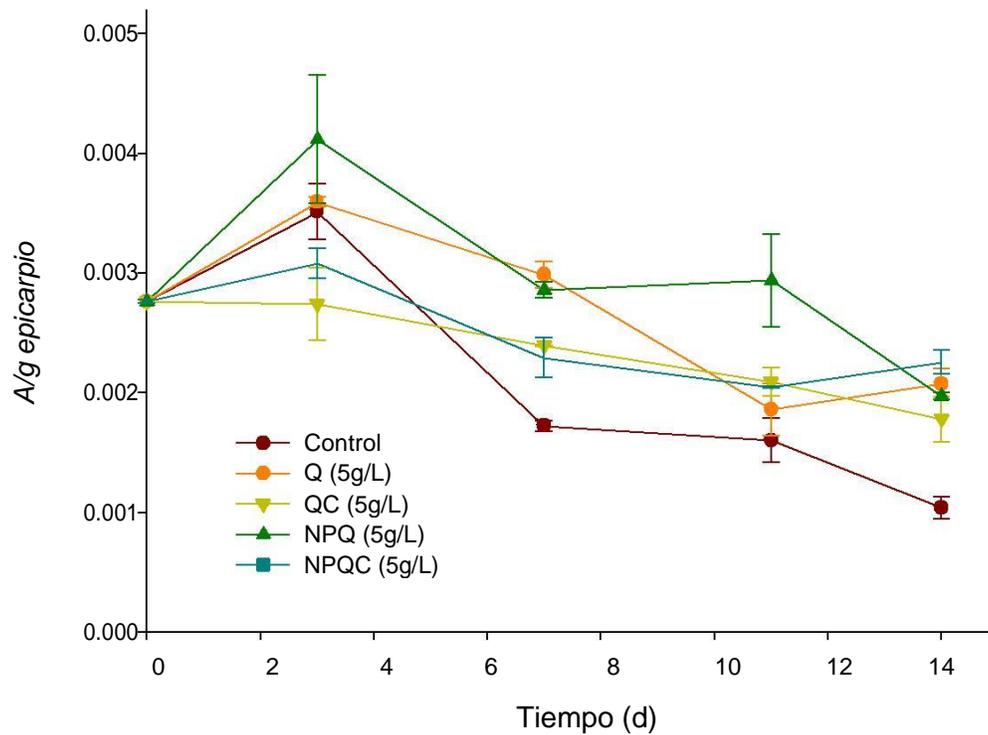


Figura 11.21.- Antocianinas totales determinadas mediante absorbancias por gramo de epicarpios de rambután almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

La concentración de antocianinas determinadas por HPLC fue mayor con los tratamientos de NPQC, seguido del elaborado con Quitosano B-Q NPQ y Q mejores que control y QC. Los complejos solubles fueron los mejores tratamientos sin diferencia significativa entre los quitosanos estudiados (Figura 11.22.). Como se muestra en la Figura 11.23 los fenoles sufren un decremento en su concentración, lo cual indica que hay una degradación o menor disponibilidad de estos compuestos.

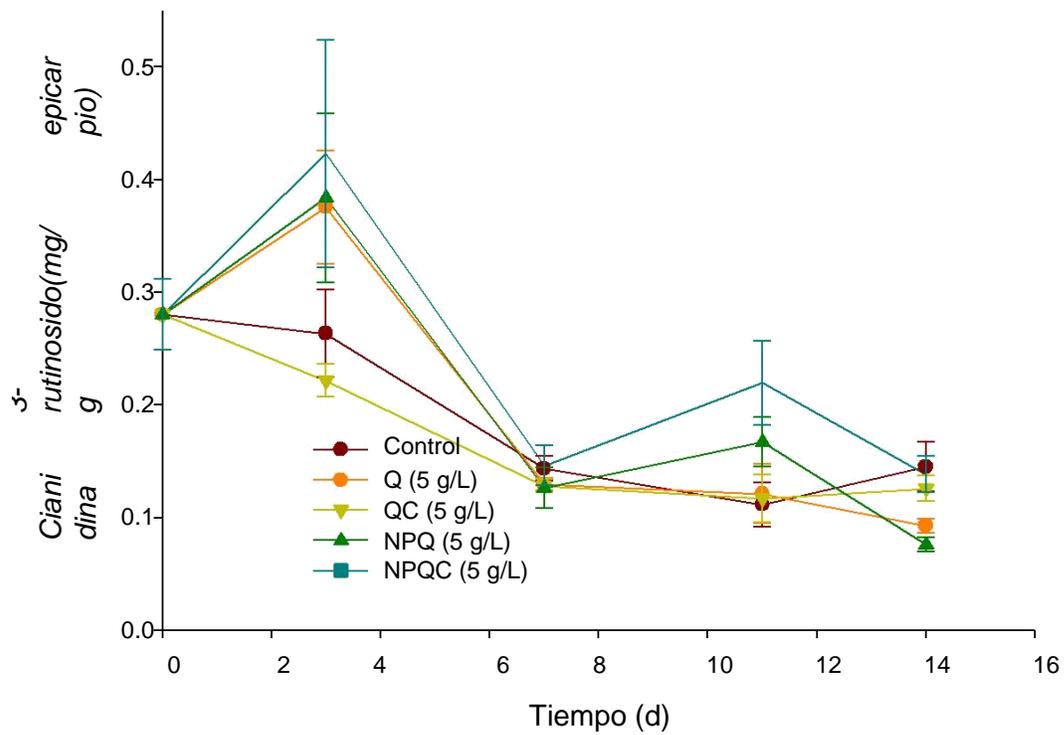


Figura 11.22.- Concentración de cianidin-3-rutinósido determinada en los epicarpios de rambután almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

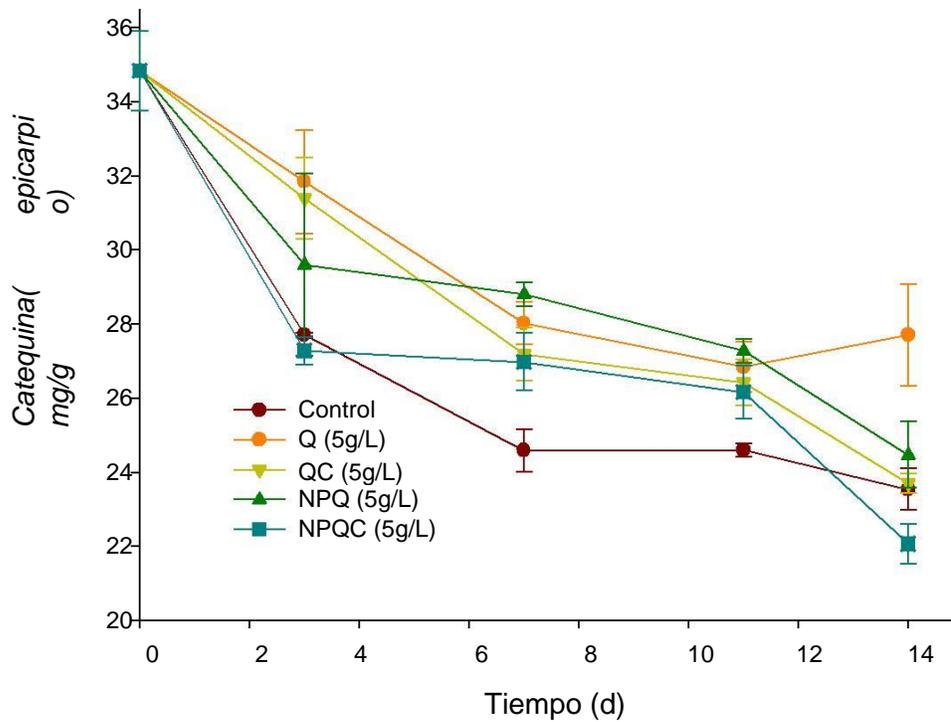


Figura 11.23.- Concentración de fenoles determinada en los epicarpios de rambután almacenado a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

Las Unidades Infectadas (UI) (Tabla 11.6) en el bioensayo de rambután en donde todos los tratamientos fueron mejor al control, el Q B-Q fue el tratamiento con menor unidades infectadas en los 12 días de almacenamiento de los frutos debido a las características anti fúngicas del quitosano, sin embargo se ve que la incorporación del aceite de neem, otro compuesto de carácter antimicrobiano a la formulación no favorece a la disminución de estas UI. También los recubrimientos a base de quitosano comercial (QC) presentaron una mayor contaminación que los hechos a partir de quitosano B-Q esto ya que la naturaleza y características como % DA que presentan este tipo de quitosanos, lo hace menos biocompatible y por lo tanto tiene una menor acción en los microorganismos.

Tabla 11.6.-Unidades infectadas en porcentaje al finalizar los 12 días de almacenamiento a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

Tratamiento	Unidades infectadas (%)
<i>Control</i>	<i>31.8 d</i>
<i>Q (5g/L)</i>	<i>0.0 a</i>
<i>QC (5g/L)</i>	<i>7.3 b</i>
<i>NPQ (5g/L)</i>	<i>7.5 b</i>
<i>NPQC (5g/L)</i>	<i>11.9 c</i>

Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

El color inicial y final de los frutos de rambután se muestra en la Figura 11.24 es evidente la pérdida del color en este fruto la diferencia en los tiempos para los parámetros de color, como se ve en las gráficas se va oscureciendo el fruto al disminuir el parámetro L* , y h* se acerca al punto acromático.

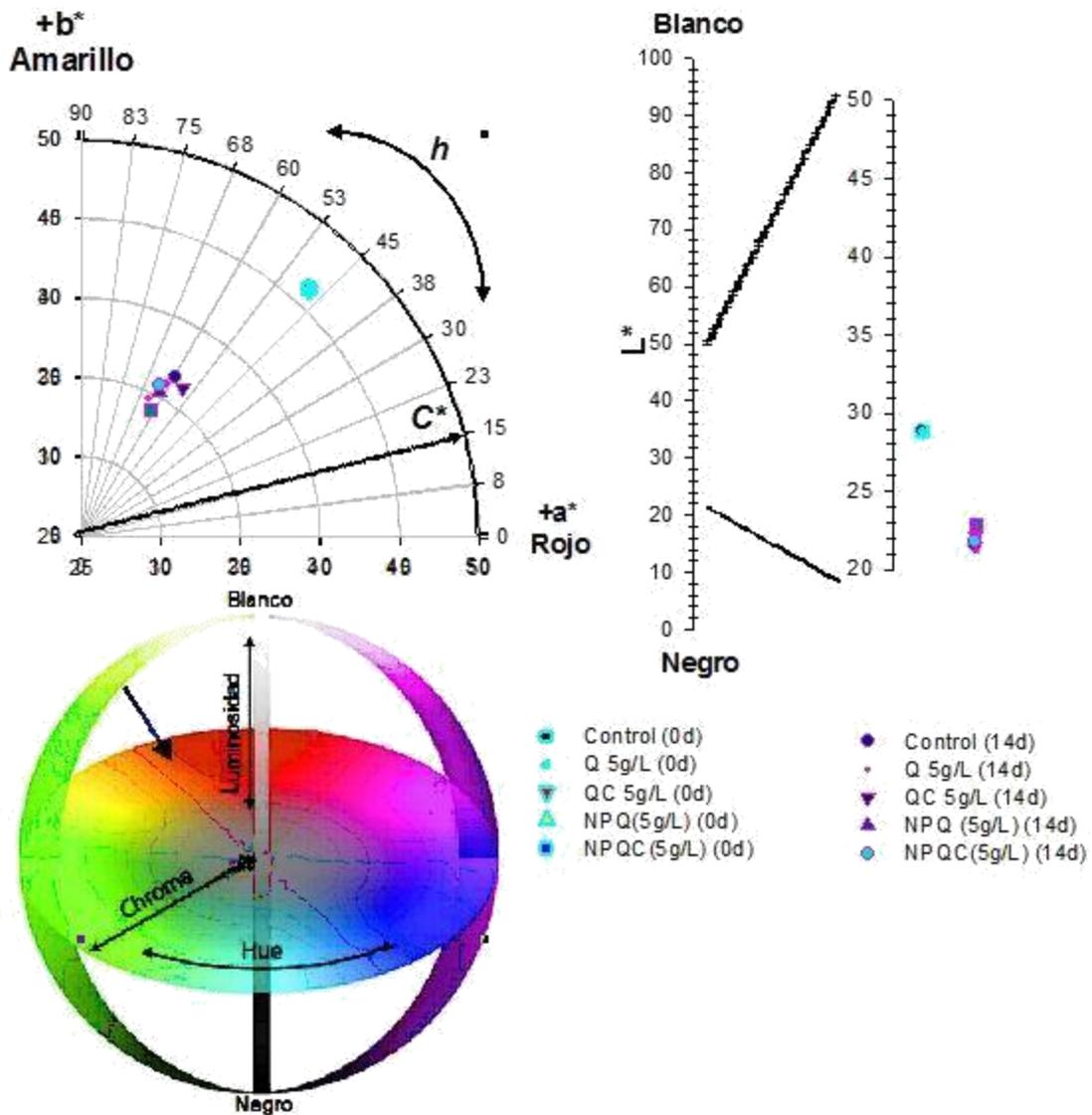


Figura 11.24.-Cambio de color en los epicarpios de rambután tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

Con los resultados obtenidos (Tabla 11.7) se confirmó que se descartaría el uso de aceite de Neem ya que no se vieron efectos sinérgicos con el quitosano en el porcentaje de unidades infectadas (Tabla 11.6). Los mejores tratamientos fueron los que contenían BAL, por lo que en los siguientes experimentos se prepararon coacervados y complejos solubles con BAL.

Tabla 11.7.- Resumen de las principales variables de respuesta de los recubrimientos aplicados en epicarpios de rambután a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

Tratamiento	%PFP	%UI	L*	C*	h*	Cianidin-3-rutinósido HPLC (mg/g)x10 ⁻¹	Antocianinas totales (A x10 ⁻³)	Fenoles (mg/g)
Control	9.84+0.81 b	31.8 d	25.29 c	30.1 c	32.79 d	1.89 c	2.18 c	27.057 e
Q (5g/L)	8.54+0.5 a	0 a	26.08 b	30.63 a	30.5 a	1.99 b	2.68 a	29.68 a
QC (5g/L)	8.75+0.21 a	7.3 b	25.37 c	30.98 b	29.2 a	1.72 d	2.35 c	28.71 b
NPQ(5g/L)	8.73+0.09 a	7.5 b	25.63 c	28.89 d	31.09 c	2.05 b	2.93 a	29 b
NPQC(5g/L)	9.75+0.44 b	11.9 c	25.94 a	28.29 e	30.04 b	2.4 a	2.48 b	27.46 d

Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

11.7. Aplicación en campo de los recubrimientos

Los cultivares o variedades de litchi más abundantes en la Región de Papaloapan en el estado de Oaxaca son Mauritius (Racimo rojo) y Brewster (Ralo rojo), esta fue el área de aplicación en campo de los recubrimientos en las fincas de los productores cooperantes. Mauritius o conocido también como "Kwai mi" o "Kuei Wei" se caracteriza por ser más pequeño acorazonado con cáscara rugosa roja con tintes verdes en los hombros. La semilla es pequeña y la pulpa muy dulce y aromática. Las ramas del árbol se curvan hacia arriba en las puntas y los volantes se enrollan hacia adentro de la nervadura central. Brewster o "Chen-Tze" son frutos grandes, cónicos o en forma de cuña, rojos, con una pulpa suave, más ácida que la del Mauritius y las semillas son muy a menudo completamente formadas y grandes. Los volantes son planos, con márgenes ligeramente encorvados y terminando en un punto afilado (Figura 11.25).

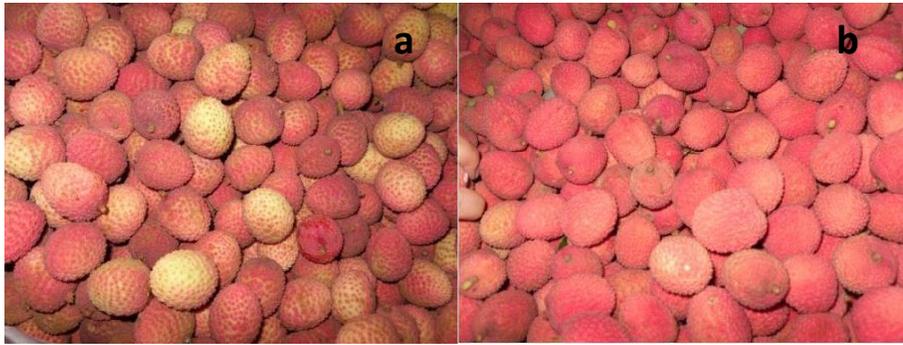


Figura 11.25.- Cultivares de litchi: a) Mauritius (Racimo rojo) y b) Brewster (Ralo rojo).

En este bioensayo se emplearon frutos de las Fincas de Boca de Perro de Santa María Jacatepec, el Refugio de San José Chiltepec y la Empacadora de María Lombardo de Caso en la Región del Papaloapan en Oaxaca (Figura 11.26) se compararon la BAL libre, encapsulada en coacervados y complejos solubles, elaborados con pectina y quitosano (CoBAL y QPBAL) y en combinación con quitosano en las dos variedades de litchi.

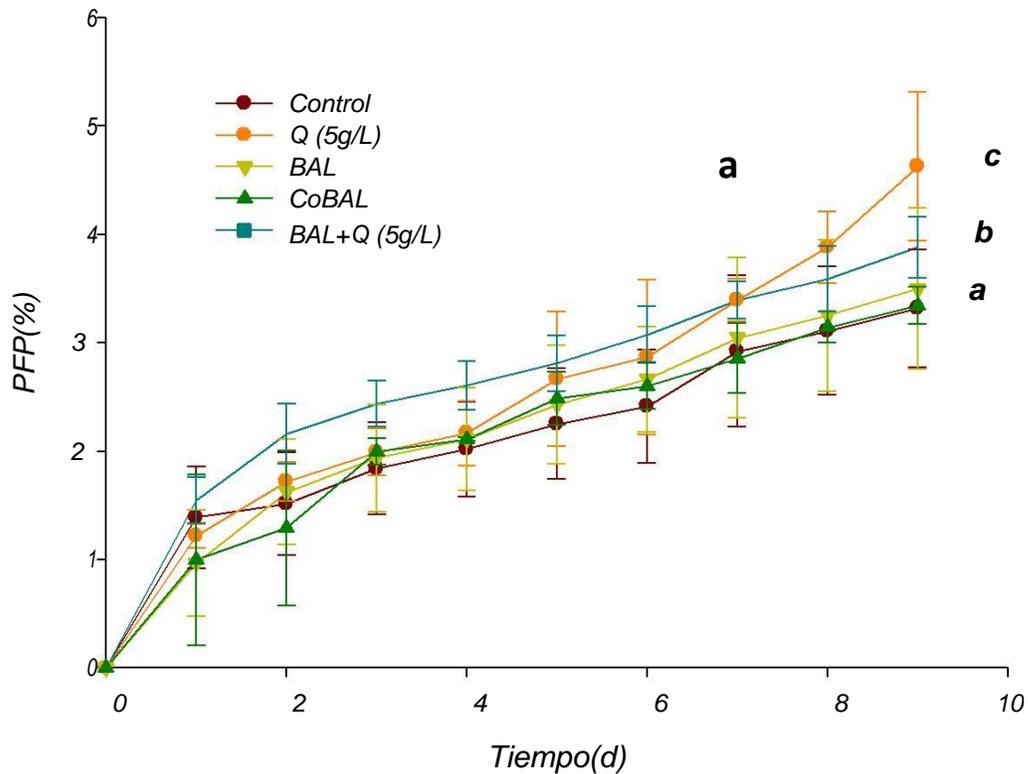


Figura 11.26.- Mapa de localización de la Región de Papaloapan en Oaxaca (cuadro punteado) en los municipios de Santa María Jacatepec, San José Chiltepec y María Lombardo de Caso.

11.7.1. Bioensayo 4

Aplicación de coacervados (CoBAL) en litchi. Este bioensayo corrido con fruto de litchi en mayo-julio 2014 se compraron tratamientos de BAL libres y en coacervados en dos variedades de fruto Mauritius y Brewster.

Para racimo rojo no se encontraron diferencias significativas en la PFP entre el control y los tratamientos de BAL y CoBAL, mientras que para Brewster el mejor tratamiento para reducir la PFP fue Q no habiendo diferencias significativas entre el control, BAL CoBAL y la combinación de BAL con Q5g/L (Figura 11.27)



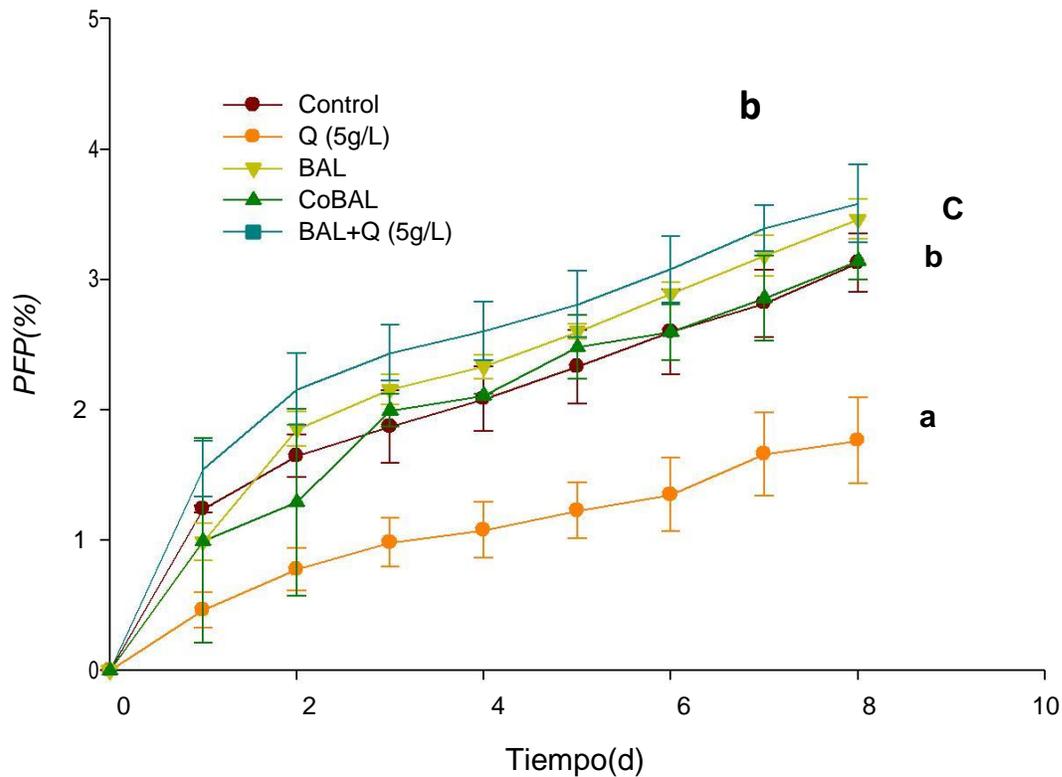


Figura 11.27.- PFP determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. a) Mauritius b) Brewster. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

Se muestra en la Tabla 11.8 el pH de los tratamientos sube, pero en los tratamientos de Quitosano, BAL y CoBAL no hay diferencia significativa con el control lo que para BAL +Q 5g/L si la hay, así mismo para la acidez titulable (AT) a pesar de que hubo una disminución del porcentaje de ácido málico para los tiempos finales no hubo diferencia entre los tratamientos. Esto concuerda con lo reportado por el INIFAP en el (2004) donde nos dice que racimo rojo contiene más azúcares mientras que Brewster es más ácido.

El contenido de azúcares (SST) es un parámetro importante de calidad, en este caso para que se encuentre dentro de los parámetros debe de estar entre 18 y 20 °Brix para el litchi, lo cual se cumple y no se observan diferencias significativas entre los tratamientos, para la relación

SST/AT tampoco hay diferencia entre los tratamientos pero entra dentro del aceptado para la comercialización de frutos 40-100 (Castillo-Animas y Pelayo-Zaldívar, 2006).

Los cocientes SST/AT de los tratamientos tendieron a aumentar conforme el tiempo de almacenamiento transcurrió, presentando diferencia significativa solo el coacervado para racimo rojo y para Brewster Q 5g/L, CoBAL, Q 5g/L + BAL fueron los mejores tratamientos dicho comportamiento se debe a la disminución en la AT (expresada como por ciento de ácido málico) ya que los ácidos orgánicos son consumidos como sustrato respiratorio y los SST se mantienen; éste comportamiento ha sido referenciado en diferentes trabajos sobre litchi (Sivakumar *et al.*, 2007; Jacuinde, 2007; Martínez- Castellanos *et al.*, 2009).

Tabla 11.8.- Análisis de medias para los resultados de pH, SST, AT y relación SST/AT en litchi de los cultivares Mauritius y Brewster tratados con los recubrimientos durante los 7 días de almacenamiento.

Tratamiento/ variedad	pH		SST		AT		SST/AT	
	Mauritius	Brewster	Mauritius	Brewster	Mauritius	Brewster	Mauritius	Brewster
Control	4.64 b	4.06 c	20.74 a	19.53 a	0.29 b	1.489 b	79.72 a	40.28 b
Q 5g/L	4.52 a	3.88 a	20.59 a	19.60 a	0.29 b	0.44 a	79.60 a	45.32 a
BAL	4.71 c	3.87 a	20.38 a	19.75 a	0.30 b	0.498 b	78.73 a	39.88 b
Coacervado	4.59 b	3.96 b	19.28 b	18.95 a	0.32 a	0.406 a	62.65 b	48.73 a
Q 5g/L + BAL	4.87 d	3.93 b	19.59 b	19.41 a	0.29 b	0.431 a	77.84 a	46.07 a

Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

La concentración de antocianinas totales en racimo rojo fue mayor con el coacervado, el cual incremento al final del bioensayo al aumentar la absorbancia, esto puede ser por que el quitosano es un estimulador en la producción de fenilalanina amonio liasa, enzima clave en la producción de catequinas reportado por Srisornkompon *et al.* (2013) que aplicado en las hojas de té verde estas presentan una mayor concentración de estos compuestos fenólicos, lo que ayuda a la formación de complejos estables entre antocianinas y catequinas, que por consiguiente también se ve en el aumento en la concentración de antocianinas por HPLC (Figura 11.29) y de fenoles(catequinas) en la Figura 11.28 donde los mejores resultados se obtuvieron tanto para Q 5g/L, en combinación con BAL y el coacervado, sin embargo en la variedad Brewster no se ve el mismo comportamiento aunque en la concentración de fenoles si hay un aumento lo que concuerda con lo obtenido en la variedad de Mauritius.

Para los tratamientos aplicados en frutos de litchi variedad Brewster (Figura 11.28) los resultados que se obtuvieron fueron muy diferentes a los de racimo rojo, el control fue el mejor tratamiento, y ya que no se pudieron conservar más que un punto, no se pudo observar si este comportamiento seguiría viéndose de la misma manera, sin embargo los demás tratamientos se mantuvieron sin haber una diferencia significativa del tiempo inicial al final, lo cual no fue un mal resultado ya que los pigmentos se mantuvieron.

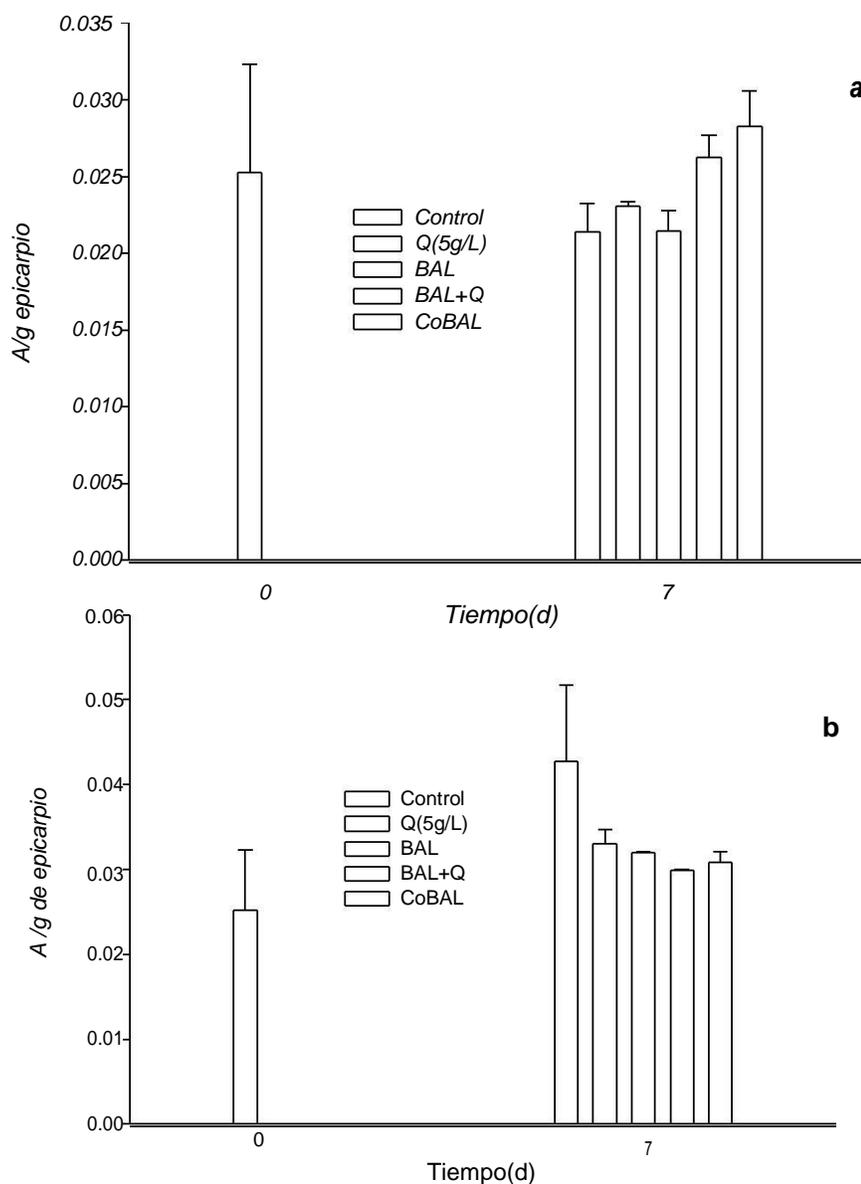


Figura 11.28.- Absorbancia total determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. a) Mauritius b) Brewster

En cuanto a las Antocianinas determinadas por HPLC (Figura 11.29) para la variedad Mauritius, el mejor tratamiento fue el coacervado de BAL, que concuerda con los resultados obtenidos en los resultados de Antocianinas totales, siendo estas diferentes al control. Los recubrimientos de BAL fueron los que disminuyeron más en cuanto a la concentración de antocianinas, esto no concuerda con los resultados obtenidos anteriormente con los recubrimientos de litchi por Martínez-Castellanos *et al.*, (2011) y el bioensayo 2 de este trabajo. Para las antocianinas determinadas por HPLC en Brewster el mejor tratamiento fue el control con diferencia significativa de Q 5g/L, CoBAL y BAL+Q pero sin haber diferencia en la concentración de cianidina 3 –rutinosido en el epicarpio de los frutos.

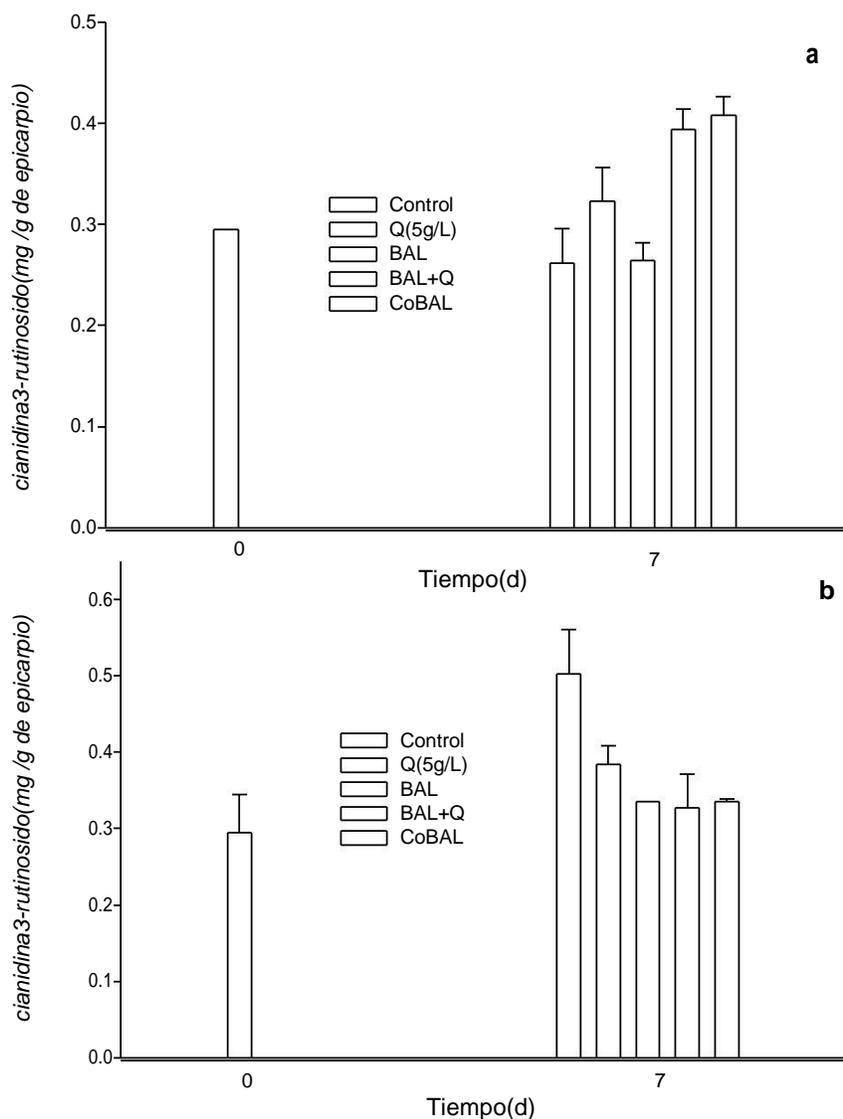


Figura 11.29.- Antocianinas HPLC determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. a) Mauritius b) Brewster

La concentración de catequina (fenoles) en los epicarpios determinada en frutos de litchi para Mauritius (Figura 11.30 a) no presentó una diferencia significativa con el control en los tratamientos aplicados en estos frutos a pesar del incremento en la concentración al día 7, para la variedad de Brewster (Figura 11.30 b) al igual que los bioensayos anteriores los mejores tratamientos fueron BAL y BAL+Q los tratamientos que se mantuvieron fue Qitosano.

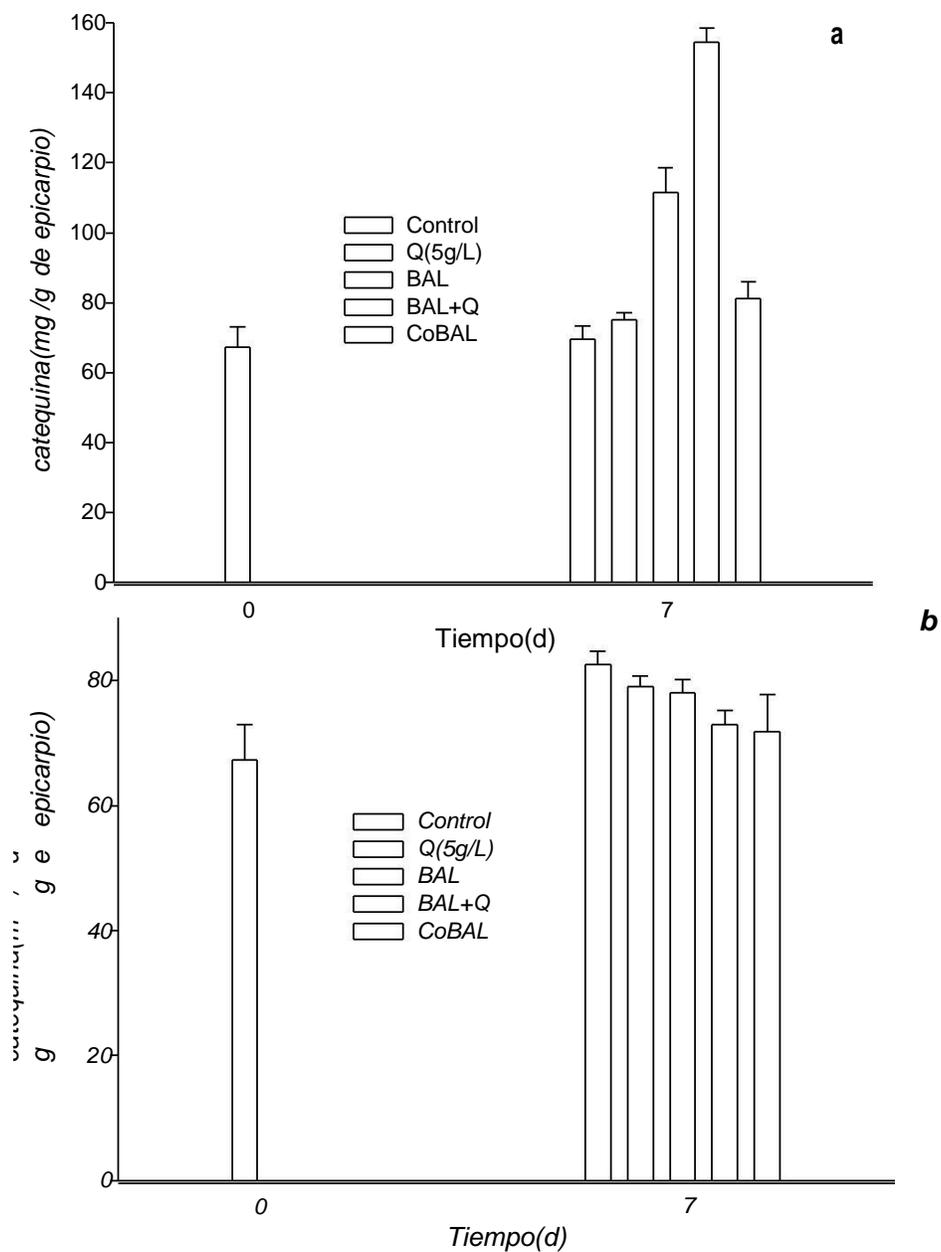


Figura 11.30.- Fenoles determinados en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. a) Mauritius b) Brewster

Las gráficas de color (Figura 11.31) muestran que los parámetros a^* y b^* en variedad Mauritius, cuyas relaciones permiten calcular h^* y C^* durante el almacenamiento se van acercando al centro, ya que el fruto va cambiando su color rojo característico a uno más opaco perdiendo luminosidad como se confirma en la gráfica de L^* en variedad Mauritius.

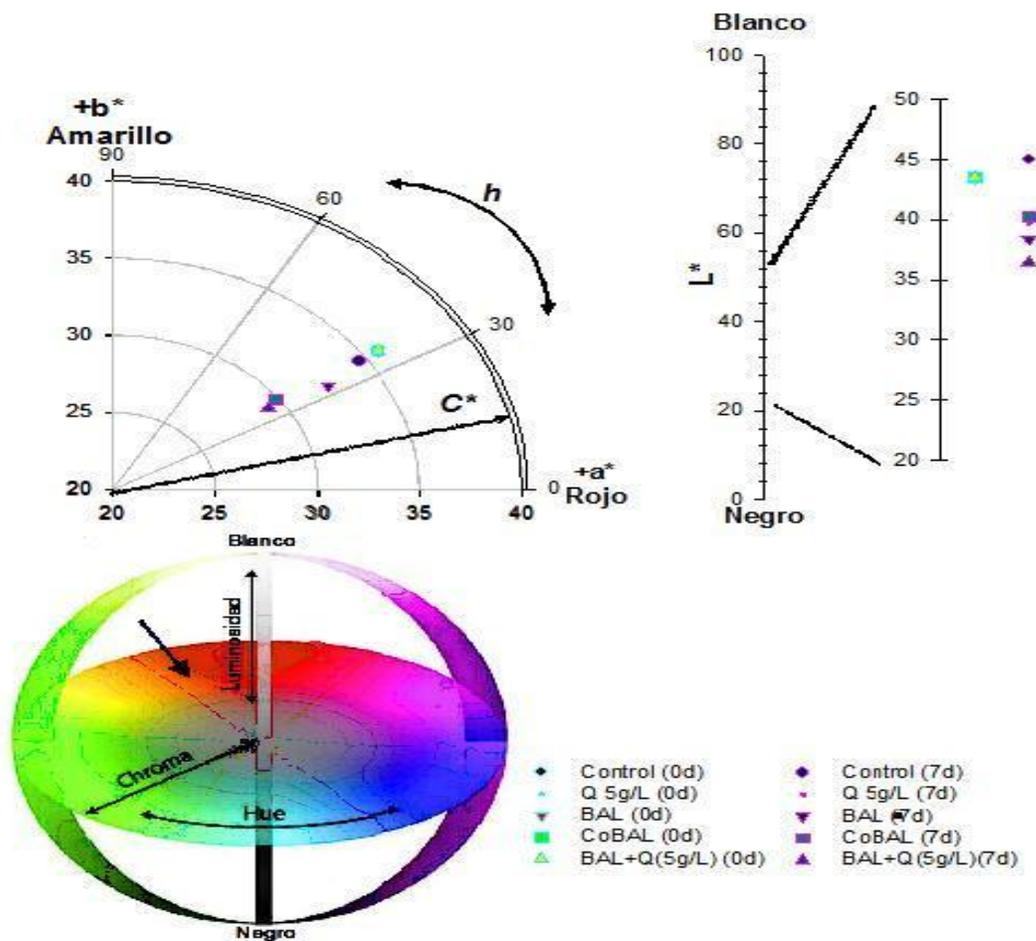


Figura 11.31.-Determinación de color a los 0 y 7 días del bioensayo con variedad Mauritius determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

Para la variedad de Brewster Figura 11.32., algunos de los tratamientos aplicados en litchi mejoraron las características después de la aplicación como lo son BAL, BAL+Q5g/L sin embargo el control sigue siendo el que presenta los mejores resultados en este caso y BAL fue el que mostro un menor oscurecimiento. Por lo que en este bioensayo se confirma que

tampoco existe un efecto sinérgico de BAL y Q5g/L., esto se puede deber al efecto antimicrobiano que presenta el quitosano que afecta a la BAL no dejándola actuar de la misma manera que si se encuentra sola en el epicarpio de los frutos.

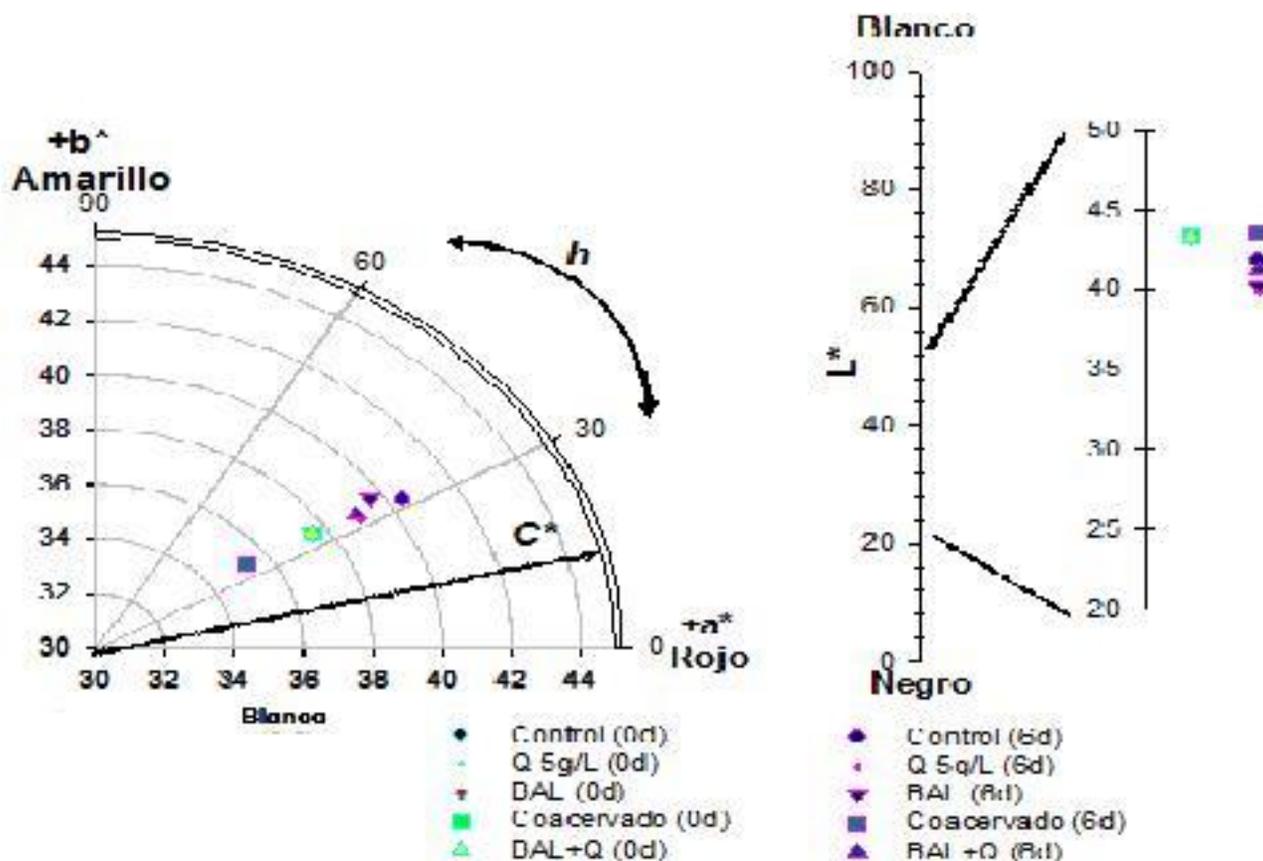


Figura 11.32.- Determinación de color a los 0 y 7 días del bioensayo con variedad Brewster determinada en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

11.7.2. Bioensayo 5

Aplicación de BAL libres y Q con fruto de litchi de mayo –julio 2014 en frutos de variedad Brewster

Los resultados de PFP (Figura 11.33) que se obtuvieron en este bioensayo fue menor a los resultados obtenidos por Martínez-Castellanos *et al.* (2011). El mejor tratamiento fue nuevamente BAL hasta los 19 días que duró el experimento.

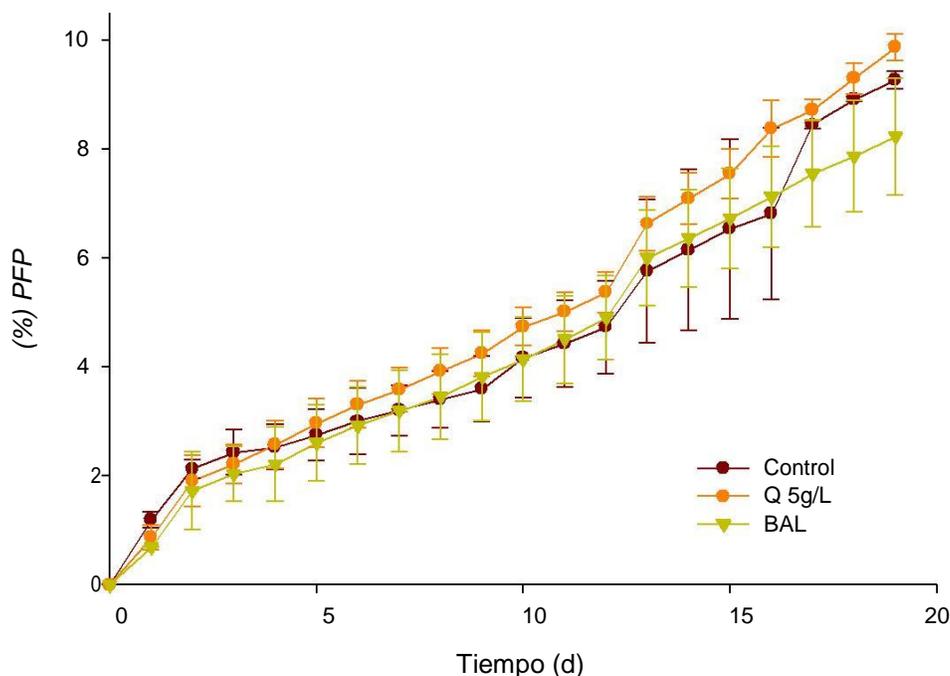


Figura 11.33.- PFP en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Brewster

Los valores de los parámetros de calidad Tabla 11.9 de pH, AT Y SST/AT no tuvieron diferencia significativa entre los tratamientos. La relación de SST/AT concuerda con lo aceptado para su comercialización de 40-100 reportado por Castillo-Animas y Pelayo-Zaldívar (2006), en este bioensayo también se vio el aumento en el segundo punto después de aplicados los recubrimientos tanto en antocianinas totales (Figura 11.34), por HPLC (Figura 11.35) y fenoles (Figura 11.36).

Tabla 11.9.-pH, SST, AT y su relación en el jugo extraído de los litchi tratado con los recubrimientos

Tratamiento	pH	SST	AT	SST/AT
Control	4.33 a	17.63 c	0.278 a	84.26 a
Q 5g/L	4.38 a	18.47 a	0.276a	73.76 a
BAL	4.60 a	18.47 a	0.304 a	72.78 a

Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

Al analizar los resultados de antocianinas totales (Figura 11.34), observamos que no hubo diferencia significativa entre el control y Q5g/L los cuales mostraron tener una mayor concentración de antocianinas totales en comparación con los tratados solo con BAL libres.

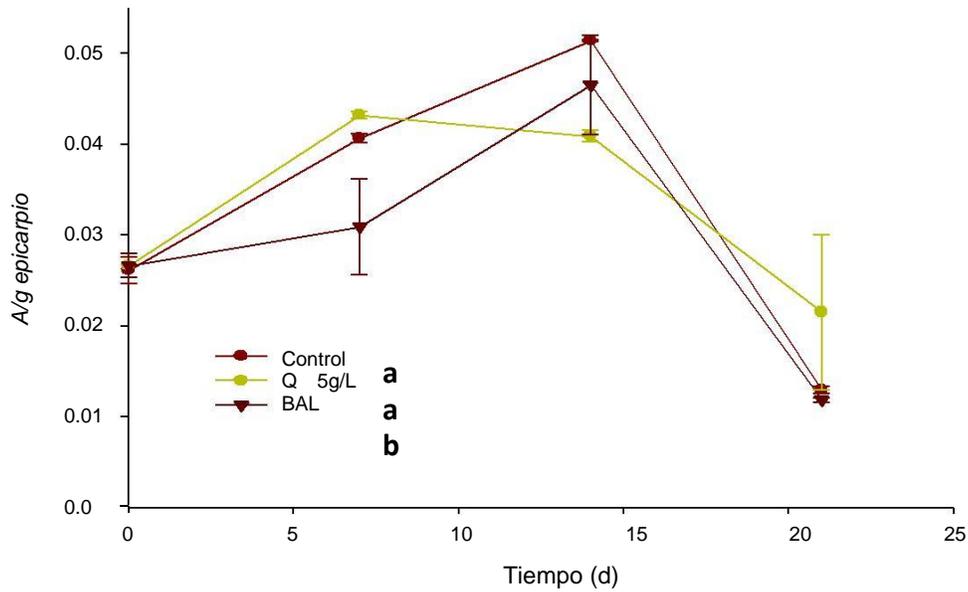


Figura 11.34.- Absorbancia total en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

Los resultados de cianidina-3-rutinósido se presentan en la Figura 11.35, la mayor concentración fue determinada con el tratamiento de BAL comparando con los tratamientos control y Q, lo cual concuerda con los bioensayos anteriores corridos con BAL libre.

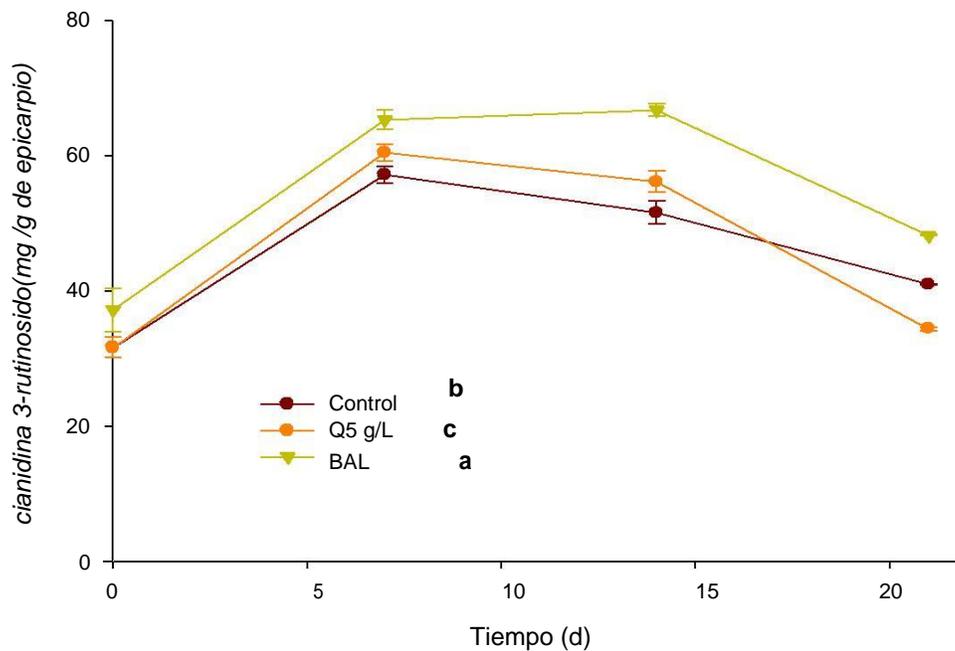


Figura 11.35.- Antocianinas determinadas por HPLC en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

Mientras que en las determinaciones de catequina los tratamientos de BAL y Control no tuvieron diferencia significativa siendo estos los mejores tratamientos (Figura 11.36).

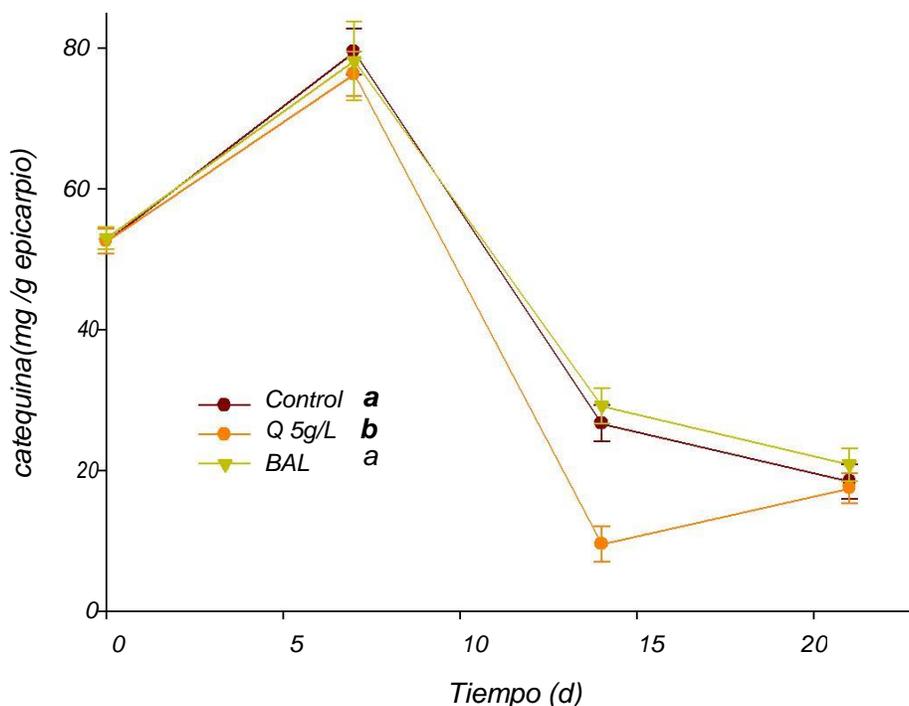


Figura 11.36.- Fenoles determinados en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

Las gráficas de color que se presenta en la Figura 11.37 los valores de a^* y b^* , los cuales mostraron en este bioensayo, como los frutos fueron presentando el oscureciendo en el epicarpio conforme pasa el tiempo, no obstante el tratamientos aplicados de la BAL libre mejoraron las características en los frutos de litchi.

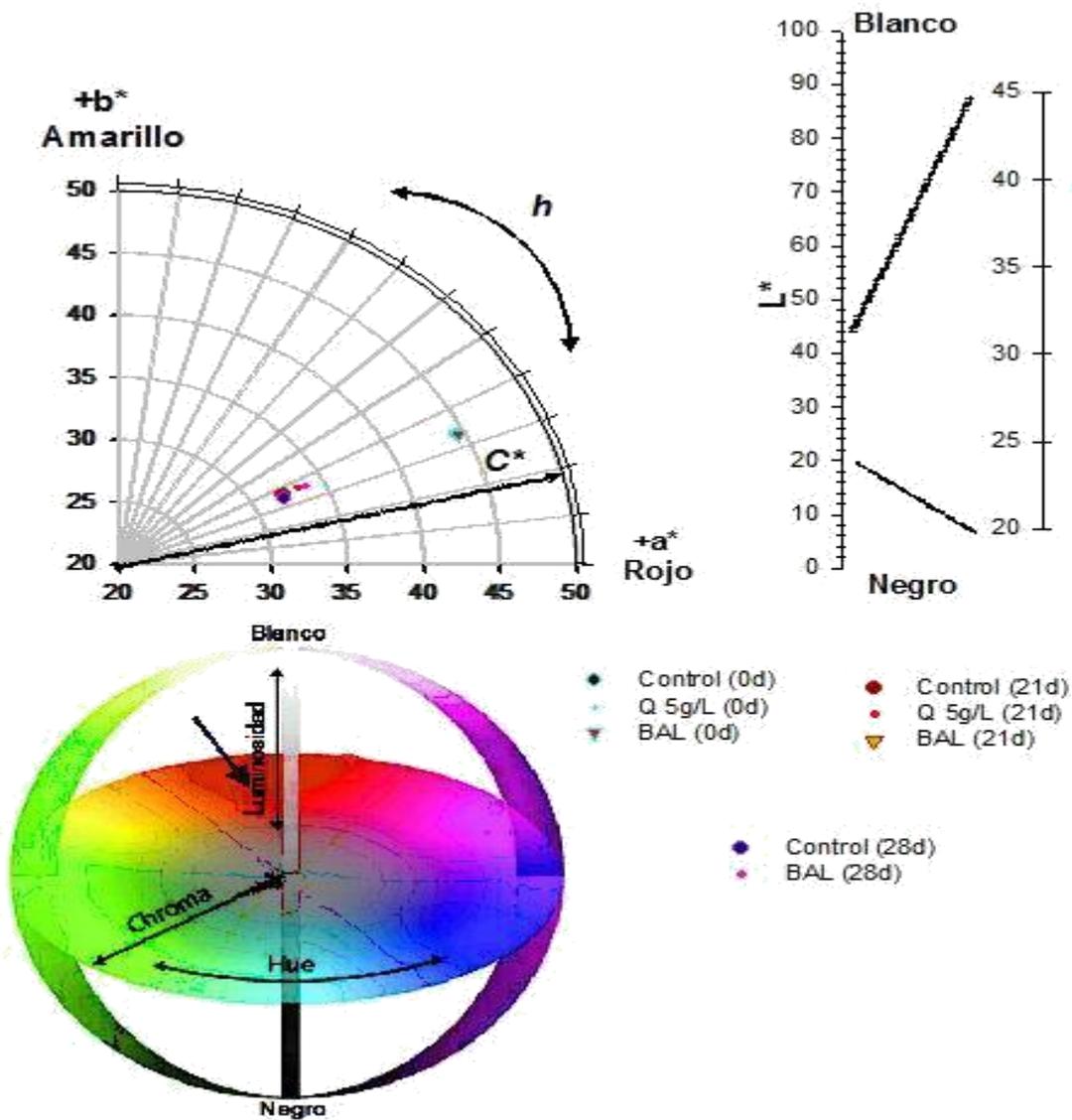
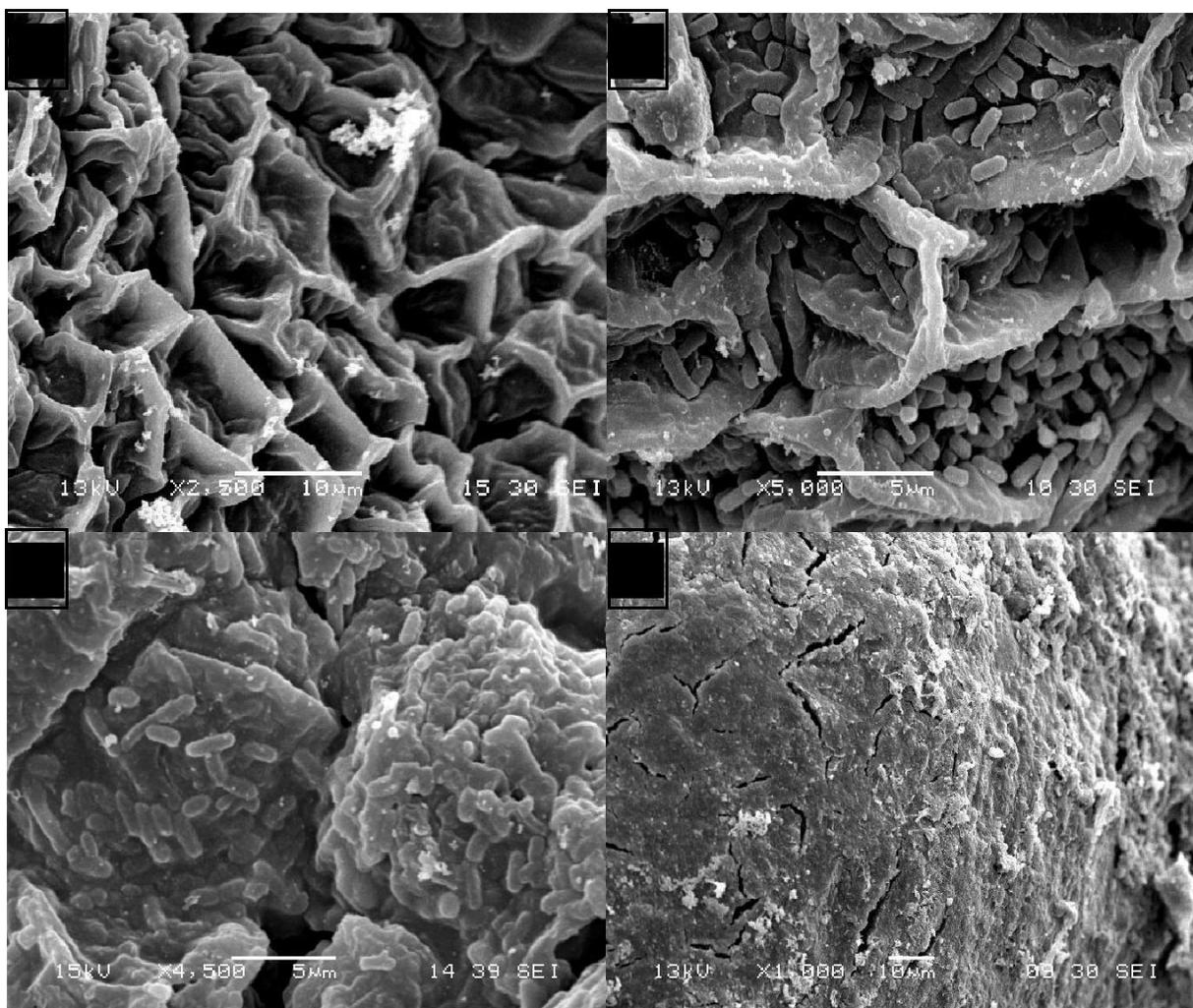


Figura 11.37.- Determinación de color a los 0, 21 y 28 días en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

Los recubrimientos aplicados en los frutos de litchi fueron vistas en el microscopio electrónico de barrido, las micrografías electrónicas en la Figura 11.38, en donde se aprecia la estructura del epicarpio de litchi presentada como el control (Figura 11.38a), en la SEM (Figura 11.38b) se muestra el desarrollo *Lactobacillus plantarum* sobre el epicarpio del fruto formando una

biopelículas formada por las BAL, la formación de biopelículas de bacterias lácticas sobre el epicarpio de los frutos ha sido reportado por Martínez -Castellanos *et al.* (2011).

En la Figura 11.38 c se observan las bacterias cubiertas por película de quitosano, el biopolímero protege a las bacterias del ambiente creándoles una atmosfera modificada tanto al fruto como a las BAL, sin embargo pierden viabilidad y con ello eficacia en la conservación de color en estos frutos. En la Figura 11.38e fue evidente la formación de aglomerados de Q y BAL, los cuales se forman por la coacervación de las biopolímeros encapsulando las bacterias, pero también se observan BAL las cuales actúan directamente sobre el epicarpio del fruto, lo cual se atribuye a la liberación de estas BAL de las micropartículas formadas por el quitosano y la pectina, también para posteriores estudios se podría analizar la eficiencia de encapsulación de las BAL para así confirmar esto.



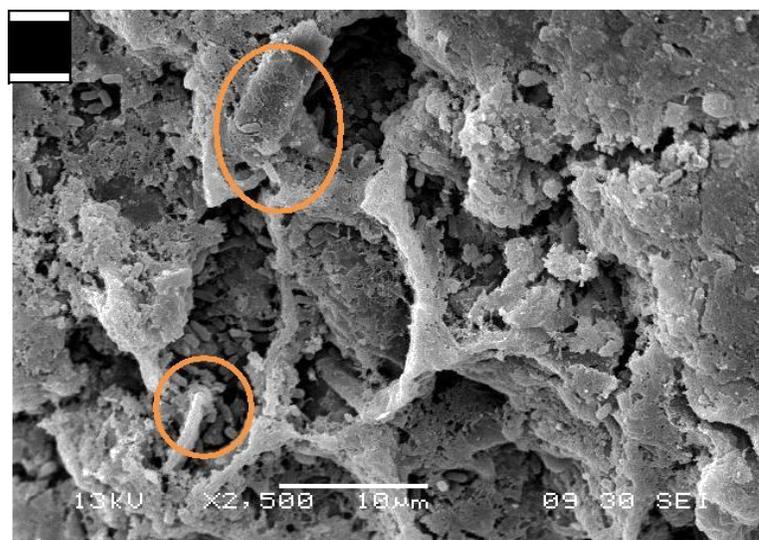


Figura 11.38.-SEM de epicarpio de litchi control (a) y con tratamientos: BAL(b), BAL+Q5g/L (c), Q5g/L(d) y CoBAL (e).

11.7.3. Bioensayo 6

Aplicación de BAL libres y QPBAL con fruto de litchi de mayo –julio 2014 en frutos de variedad Brewster

La PFP de QPBAL fue la más baja seguida de la BAL y por último el control, es relevante el mencionar que se supera la eficacia de los recubrimientos reportados por Martínez-Castellanos *et al.* (2011) sin embargo puede deberse a la variedad o época de cosecha, del fruto (Figura 11.39).

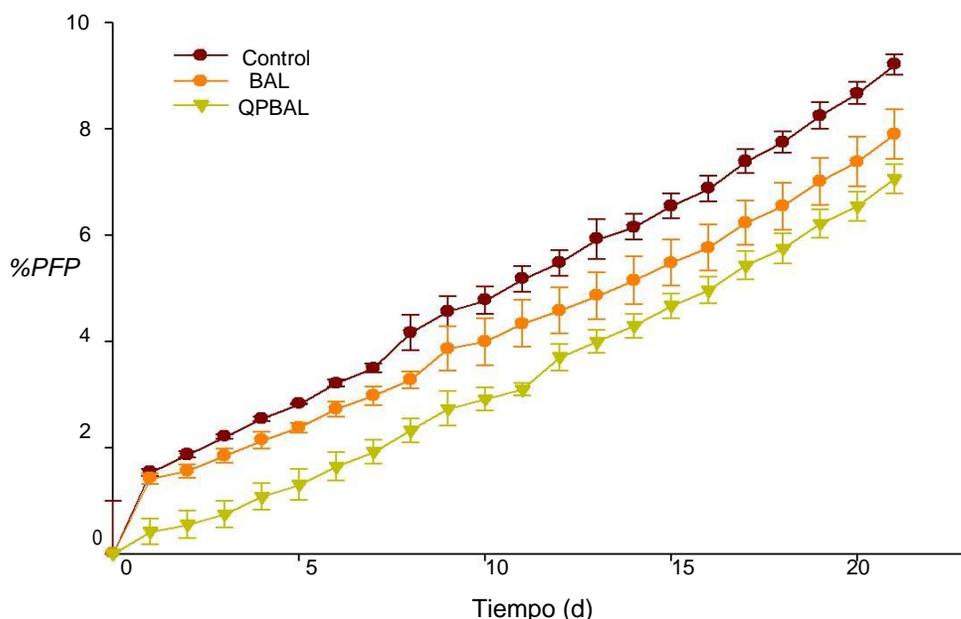


Figura 11.39.- PFP en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

Los resultados de pH, STT, AT y SST/AT se resumen en la Tabla 11.10, se observa una disminución en la AT (expresada como porcentaje de ácido málico), ya que los ácidos orgánicos son consumidos como sustrato y los SST se mantienen de ahí que la relación STT/AT aumente, aunque en este caso no se detectaron diferencias significativas. Éste comportamiento ha sido reportado en diferentes trabajos sobre litchi (Sivakumar *et al.*, 2007; Jacuinde, 2007; Martínez- Castellanos *et al.*, 2009).

Tabla 11.10.- pH Sólidos solubles totales acidez total titulable del jugo extraído de los litchi tratado con los recubrimientos

Tratamiento	pH	STT	AT	STT/ATT
Control	4.93 a	15.72 a	0.201 a	94.02 a
BAL	5.00 a	16.42 a	0.161b	105.64 a
QPBAL	5.07 a	15.81 a	0.171 b	98.67 a

Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

En antocianinas totales (Figura 11.40) no se encontraron diferencias significativas como tampoco en Antocianinas HPLC (Figura 11.41), y contenido de fenoles (Figura 11.42) entre los tratamientos aplicados en este bioensayo presentaron valores más bajos que lo reportado por Martínez-Castellanos *et al.* (2011).

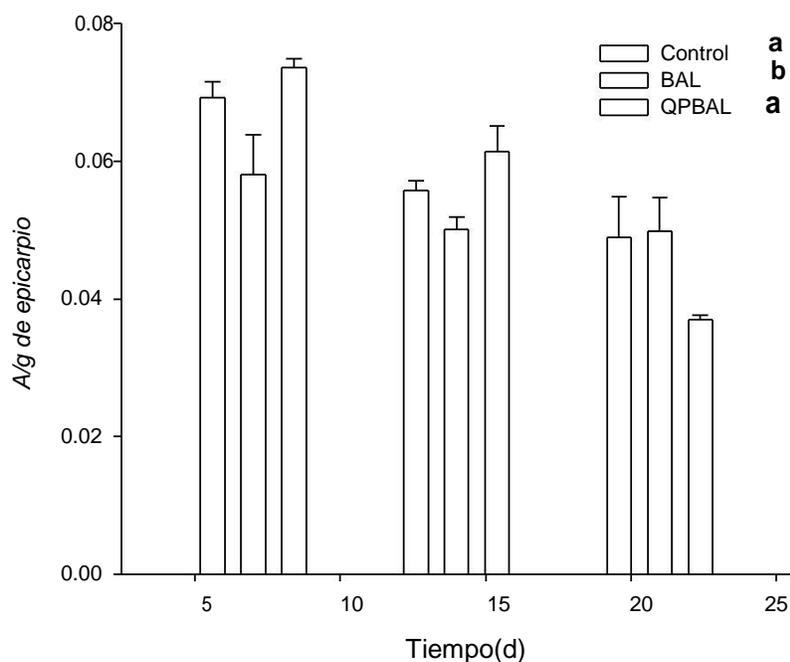


Figura 11.40.- Antocianinas totales durante 7, 14 y 21 días en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

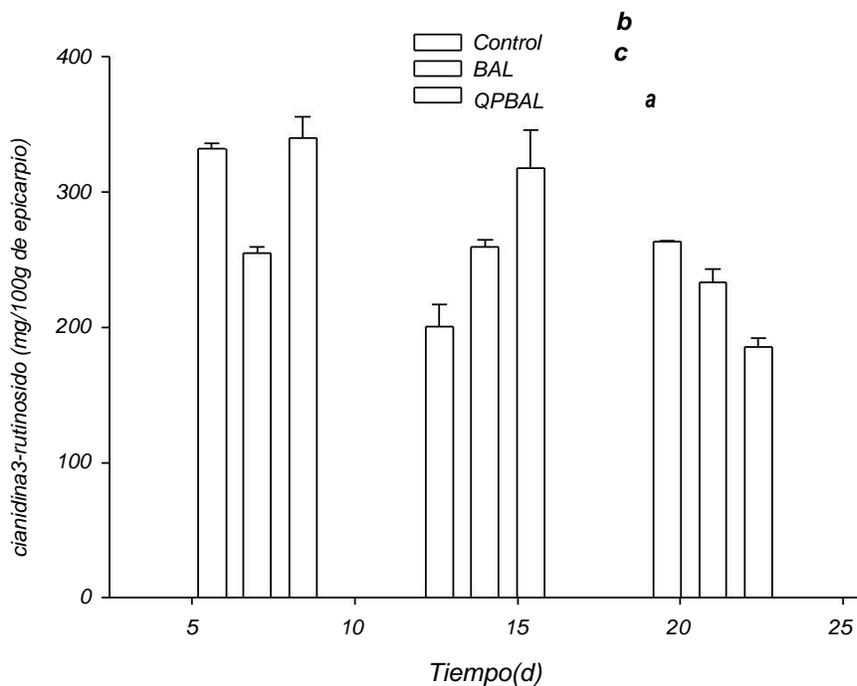


Figura 11.41.- Antocianinas determinados por HPLC durante 7, 14 y 21 días en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

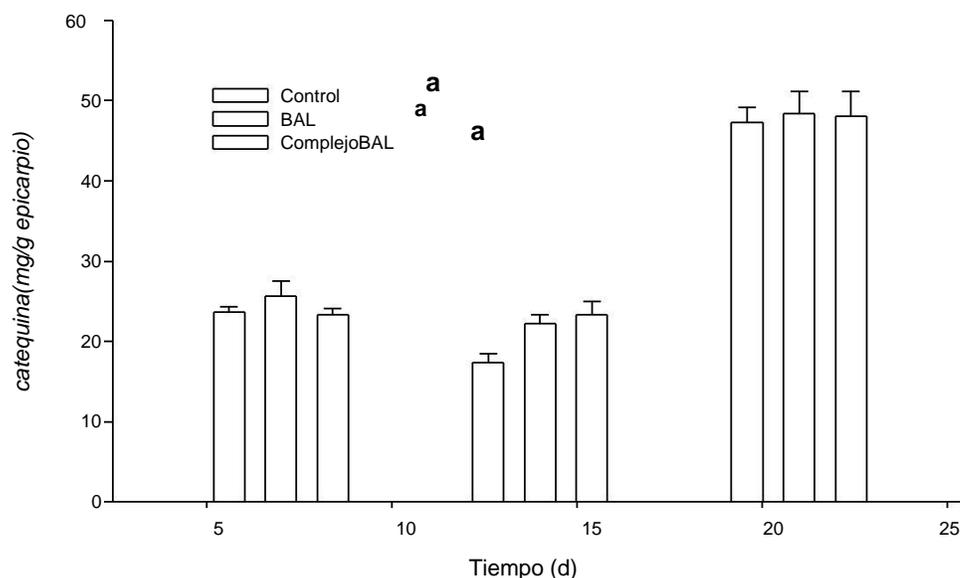


Figura 11.42.- Fenoles determinados durante 7, 14 y 21 días en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %. Letras diferentes indican diferencia significativa ($\alpha \leq 0.005$).

La viabilidad de las BAL en los frutos de litchi a lo largo del bioensayo se determinó por cuenta en placa y como se esperaba debido a la naturaleza antimicrobiana del quitosano y los resultados con las CMI que se obtuvieron para BAL, el complejo soluble fue el que presentó menor cuenta de viables (Figura 11.43). No obstante esta disminución el tratamiento fue eficaz manteniendo las características de calidad.

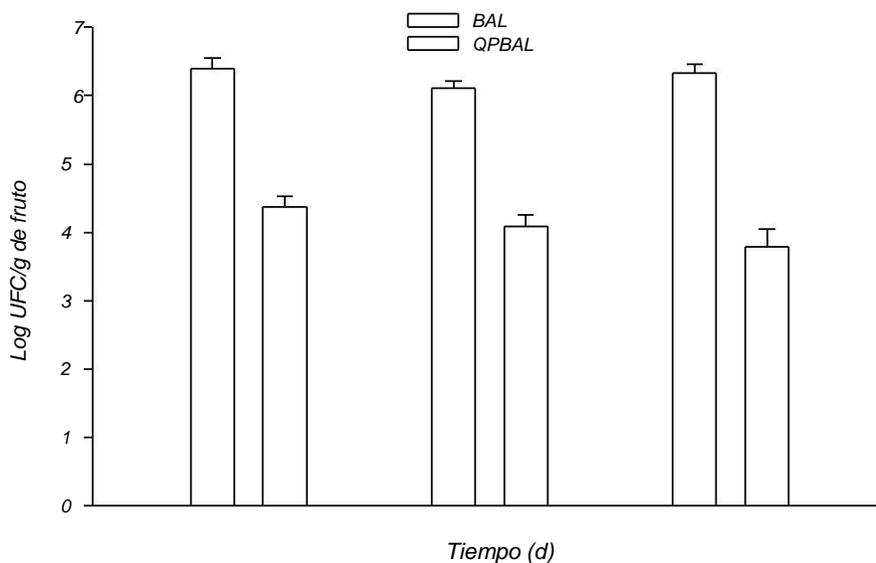


Figura 11.43.- Viabilidad de BAL en fruto de litchi 7, 14 y 21 días del bioensayo en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

El mejor resultado en los análisis estadísticos de color (Figura 11.44) fue el QPBAL ya que mantiene el color característico rojo en el epicarpio del fruto, el control y BAL fueron tratamientos que analizando gráficamente, donde la variable L^* obtenida del complejo es el que se ve menos afectado por la degradación de los pigmentos. Aunque no se obtuvieron diferencias significativa en los tratamientos tanto en concentración de antocianinas por HPLC, totales y fenoles entre los tiempos de almacenamiento.

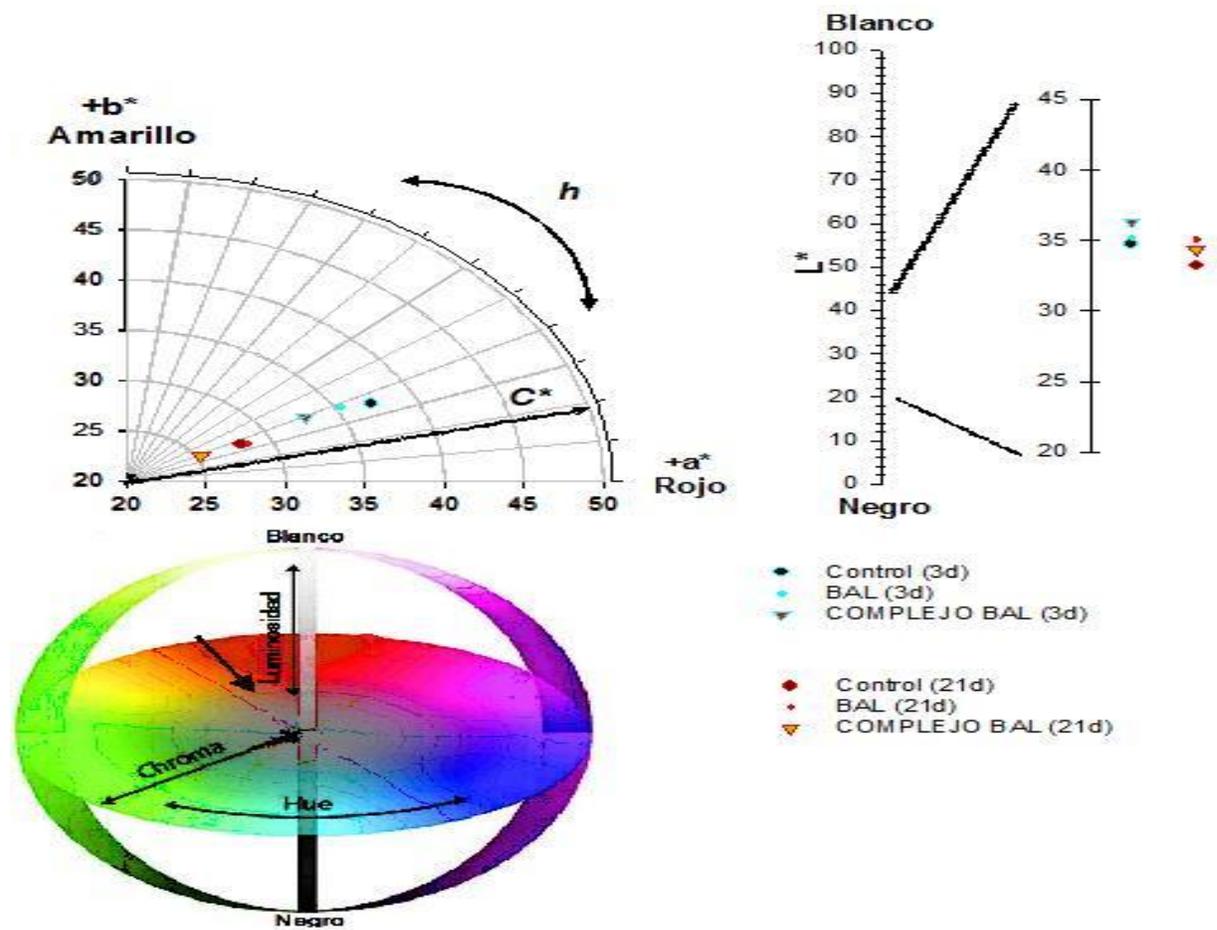


Figura 11.44- Determinación de parámetros de color a los 3 y 21 días del bioensayo en litchi tratado con los recubrimientos y almacenados a 10°C a una humedad relativa de 75 %.

12. CONCLUSIONES

A pesar de los resultados favorables que se obtuvieron en la PFP (%) de los frutos que se trataron con las emulsiones, las demás variables de calidad medidas como las concentraciones de antocianinas totales, cianidina-3-rutinosido y catequina fueron bajas, lo cual pudo deberse a la oxidación del aceite vegetal utilizado en la preparación de las emulsiones.

Se compararon los quitosanos obtenidos por métodos químico (QC) y biológico-químico (Q), siendo este último el que presentó mejores resultados en la conservación de la calidad poscosecha de los frutos a pesar de estos resultados el tratamiento que en todos los bioensayos logro perdurar las características de color fue el que se formuló por *Lactobacillus plantarum* libre seguida tanto como coacervados y complejos solubles.

Los complejos solubles y coacervados obtuvieron buenos resultados en comparación al control pero en algunos bioensayos no hubo diferencias entre estos y el de BAL libre, por lo que no se logró un mayor efecto con los tratamientos de CoBAL y QPBAL que buscaban un efecto sinérgico entre el quitosano y la BAL lográndose extender la vida poscosecha mas de los 21 días que se mantuvieron con BAL libre.

13. TRABAJO RELACIONADO

En relación al presente proyecto se realizó un estudio de prefactibilidad de los recubrimientos con base en la validación de la tecnología en campo, en donde la aplicación de los tratamientos de Q 5g/L y BAL fueron rentables con una recuperación de la inversión (TIR) de 1 y 2 años, respectivamente. Este estudio se realizó tomando en consideración la infraestructura que tienen los productores de litchi en la región del Papaloapan del Estado de Oaxaca (Barrera & Shirai 2014).

14. TRABAJOS PRESENTADOS

EFECTO DE LOS RECUBRIMIENTOS DE QUITOSANO Y BACTERIAS EN LA CONSERVACIÓN POSCOSECHA DE LITCHI. Oral presentado en el congreso XXXV Encuentro de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ). Puerto Vallarta, México. Mayo 2014.

*EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y QUITOSANO OBTENIDO POR MÉTODO BIOLÓGICO-QUÍMICO Y QUÍMICO EN RECUBRIMIENTOS DE RAMBUTÁN (*Nephelium lappaceum* L).* Cartel presentado en el congreso XXXV Encuentro de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ). Puerto Vallarta, México. Mayo 2014.

15. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. (1988), Plant Pathology. Third Edition. Academic Press. New York. pp. 803.
- Ahmadi, A. & Ahmadi, A. (2007). Preparation and characterization of chemical structure composition of polyurethane's microcapsules pesticides. *Asian Journal of Chemistry*, 19(1);187-194.
- Akamine, E.K.. (1960). Preventing the darkening of fresh litchi prepared for export. *Tech. Progr. Rep. Hawaii Agric. Exp. Stat.* 127, 1–17.
- Ali A., Muda Muhammad M.T., Sijam K., Siddiqui Y.,(2010). Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya, *International Journal OF Food Science & Technology*. pp. 2134-2140
- Alonso D., Gimeno M., Sepulveda-Sánchez J. D., Shirai K., (2010). Chitosan-based microcapsules containing grapefruit seed extract grafted extract grafted onto cellulose fibers by a non-toxic procedure. *Carbohydrate Research* 345(6):854-859.
- Alonso S. D. (2009). Estudio de la funcionalización de textil de celulosa mediante entrecruzamiento con quitosano, quito oligosacáridos y microcápsulas de quitosano y evaluación de las propiedades antimicrobianas. (Tesis de Maestría)
- Anjali CH, Sharma Y, Mukherjee A, Chandrasekaran N. (2011) Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsion a potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Society of Chemical Industry*, 68; 158-163
- Ansel, H.C., Allen, L.V. y Popovich, N.G. (2004) *Ansel's Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 8ª Edition. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Bahri, Z. & Tavedert, J.L. (2007). Elaboration and characterization of microparticles loaded by pesticide model. *Powder Technol.*172; 30-40.

Bahri, Z. & Taverdet, J.L. (2005). Optimization of an herbicide release from ethylcellulose Microspheres. *Polymer Bulletin*. 54; (97-103).

Barrera G. J., Shirai K. (2014), Validación de métodos para conservar la calidad del litchi y prolongar la vida de anaquel en la región del Papaloapan; Estudio de prefactibilidad., Fundación Produce Oaxaca, A.C. /SAGARPA/SEDAFPA/Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Iztapalapa.

Bin Hussein, M.Z.; Hashim, N.; Yahaya, A.H. & Zainal, Z. (2009). Controlled Release Formulation of Agrochemical Pesticide Based on 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyrate Nanohybrid. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 9(3); 2140-2147.

Bolivar K.,Sanabria M.E., Rodriguez D.,Ulacio D., Camacaro M., Cumana L.J.,Crescente O.,(2009) Post harvest quality of mango fruits (*Mangifera indica* L.) inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides* and treated with plant extracts

Boonsongrit, Y., Mueller, B. W., Mitrevej, A. (2007). Characterization of doug-chitosan interaction by H NMR, FTIR and isothermas titration calorimetry. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 69; 388-395

Buta J. C., Spaulding, D. W. (1997), Endogenous levels of phenolics in tomato fruit during growth and maturation. *J Plant Growth Regul.*, 16; 43-46.

Castillo-Animas D., Pelayo-Zaldívar, C. (2006). Índice de cosecha para litchi (*Litchi sinensis* Sonn) CV Brewster. Documento técnico elaborado para el Consejo Nacional de Productores y Exportadores de Litchi A. C. (CONPELAC).

Chang-E, Ng Frency Sau-Fun, Wat Elaine, Zhang Vanilla Xin, Chan Chung-Lap, Lau Clara Bik-San, Leung Ping-Chung. (2012). Preparation and characterization of chitosan microcapsules loaded with Cortex Mountan., 1;27-28.

Chávarri M., Marañón I., Ares R., Ibáñez F. C., Marzo F., Villarán M. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions.

Chi-Leung H. P., Wen-Yi W., Chi-Wai K.,* , Chang-E Z., Sau-Fun F. N., Wat E., Zhang V.X., Chung-Lap C., Bik-San C.L., Ping-Chung L. (2012) Preparation and characterization of chitosan microcapsules loaded with Cortex Moutan, *International Journal of Biological Macromolecules*. chitosan nanoparticles, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 163-171

Cho, J., Heuzel, M-C., Carreau, P.J., 2006. Viscoelastic properties of chitosan solutions: effect of concentration and ionic strength. *J.Food L'ng*. 74; 500-515.

Cira L. 2000. Escalamiento de un proceso para la recuperación de quitina a partir de desechos de camarón. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa.

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.

Contreras-Esquivel J.C., Espinoza-Pérez J.D., Montañez-Saenz J.C., Charles-Rodríguez A.V., Renovato J., Aguilar C.N., Rodríguez-Herrera R. and Wicker L, (2006). “Extraction and characterization of pectin from novel sources”. *Advances in Biopolymers*. ACS Symposium Series. Vol. 935, chapter 14, pp. 215-229.

Coulter T.P., *Food: The chemistry of its components*. Burlington House, London: The Royal Society of Chemistry. 1984. p. 113.

Domínguez-Delgado C.L., Rodríguez-Cruz I. M., Escobar-Chávez J. J., Calderón-Lojero I. O., Quintanar-Guerrero D., Ganem A.(2011), Preparation and characterization of triclosan nanoparticles intended to be used for the treatment of acne, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 102-107.

Dong Z.Yong M., Khizar H., Chengsheng J.,Shuquin X., Xiaoming Z., (2011), Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation, *Journal of Food Engineering*, 104; 455-460.

Durst R, Wrolstad R. E. (2001) Separation and Characterization of Anthocyanins by HPLC. In: *Handbook of Food Analytical Chemistry*. New Jersey: John Wiley & Sonn. 33-45.

Esquivel Chávez A.(2013). Desarrollo y caracterización de nanopartículas a base de zeína estabilizadas con pectina y β -lactoglobulina. *Tesis de maestría Universidad Autónoma de Querétaro*.

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

Goycoolea F. M., Remuñán-López C., Alonso M. J. (2011). Nanopartículas a base de polisacáridos: quitosano.

Grillo, R.; Melo, N.F.S.; Lima, R.; Lourenço, R.; Rosa, A.H. & Fraceto, L.F. (2010). Characterization of atrazine-loaded biodegradable poly(hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate) microspheres. *J Polym Environ*. 18; 26-32.

Herrero, M.; B. Mayo; B. Gonzáles & J. E. Suárez. (1996). Evaluation of technologically important traits in lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 81: 565-570.

Hirech, K.; Payan, S.; Carnelle, G.; Brujes, L. & Legrand, J. (2003). Microencapsulation of an insecticide by interfacial polymerization. *Powder Technol.*130;324-330.

Holt, J. G.; N. R. Krieg; P. H. A. Sneath; J. T. Staley & S. T. Williams. (1998). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (9th edition). 528- 566.

Hutchings J. B., (1999), *Food color and appearance.*, 2nd ed. Gaithersburg, Md.:Aspen Publishers.

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

Jacuinde Guzmán¹, Janeth K. , Itzel Villegas Rangel¹, Samuel Ramírez Juárez, Fernando Rivera Cabrera¹, Fernando Díaz de León Sánchez¹, Guillermo Calderón Zavala, Humberto Vaquera Huerta, Clara Pelayo Zaldívar y Laura J. Pérez Flores. (2009)Antocianinas totales, color y capacidad antioxidante en frutos de litchi almacenados en dos diferentes empaques a 7 °C. *International Journal of Food Microbiology*. 185–189

Jerobin J.,Sureshkumar R.S., Anjali C.H., Mukherjee A., Chandrasekaran N. (2012). Biodegradable polymer based encapsulation of neem oil nanoemulsion for controlled release of Aza-A. *Carbohydrate Polymers* 90; 1750– 1756.

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

Juárez C. M. C. (2010). Estudio del uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicios de camarón.

Kjoniksen, A, L., Nystrom Bo., Iversen, C., Nakken, T., Palmgren, O., Tande, T., (1997). Viscosity of Dilute Aqueous Solutions of Hydrophobically Modified Chitosan and Its Unmodified Analogue at Conditions of Salt and Surfactant Concentrations. 13; 4948 – 4952.

Koubala B.B., Kansci G., Mbome L.I., Crépeau M.J., Thibault J.F. and Ralet M.C.(2008) “Effect of extraction conditions on some physicochemical characteristics of pectins from “Améliorée” and “Mango” mango peels”. *Food Hydrocolloids*. 22; 1345-1351.

Krasaekoopt, Wunwisa; Bhandari, Bhesh and Deeth, Hilton. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 13(1);3-13.

Krasaekoopt, Wunwisa; Bhandari, Bhesh and Deeth, Hilton.(2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. 14(8):737-743.

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

Lee, H. A., & Wicker, L. (1991). Anthocyanin pigments in the skin of lychee fruit. *Journal of Food Science*. 56;466–468, 483.

Leyva D.E (2009), Determinación de antocianinas, fenoles totales y actividad antioxidante y fruto de mora, *Tesis de licenciatura Universidad tecnológica de la mixteca, Oaxaca México*

Li, X. (1996). The use of chitosan to increase the stability of calcium alginate beads with entrapped yeast cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 23;269–271.

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

Lobo, F.A.; Aguirre C.L.; Silva, M.S.; Grillo, R.; Melo, N.F.S.; Oliveira, L.K.; Morais, L.C.; Campos, V.; Rosa, A.H. & Fraceto, L.F.; (2011). Poly(hydroxybutyrate-cohydroxyvalerate) microspheres loaded with atrazine herbicide: screening of conditions for preparation, physico-chemical characterization and *in vitro* release studies. *Polym. Bull*. Vol.67, pp. 479–495. México. pp 223.

López Martínez N. J., J. Sañudo Barajas A., Contreras Esquivel A., J. C. (2011). Pectina de mango: perspectivas para su extracción, *Ciencia cierta* No 27

Maldonado P. R., Trinidad S.A. Téliz O. D., Velasco V.V. y VolkeHaller H. (2012). V. Respuesta del litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) a la fertilización con npk en el norte de Oaxaca, México., *Rev. Fitotec. Mex*. 35 (3): 251-258.

Martinez B. L, Castillo A. M., Ramon L.V. (2006). Diagnostico del sistema de producción de rambutan (*Nephellum lappaceum* L.) en la región soconusco, Chiapas. Universidad Autonoma Chapingo.

Martínez-Castellanos G. (2009). Uso de bacterias lácticas en recubrimientos de quitosano para la conservación poscosecha de litchi y rambután. Tesis de doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.

Martínez-Castellanos G., Shirai K, Pelayo-Zaldívar C., Pérez Flores Laura J., Sepúlveda-Sánchez José. (2009). Effect of *Lactobacillus plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Food Microbiology* 26; 444-449.

Martínez-Castellanos G., Pelayo-Zaldívar, C., Pérez-Flores L., López-Luna, A., Gimeno, M., Bárzana, E., Shirai ,K. (2011). Postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) quality preservation by *Lactobacillus plantarum*. *Postharvest Biology and Technology* 59: 172-178.

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

Muzzarelli, R.A.A, Rochetti, R. (1985). Determination of the degree of acetylation of chitosans by first derivative ultraviolet spectrophotometry. *Carbohydrate, Polymers*. 5(6); 461-472.

Nicio C. A. A., (2012), Síntesis y caracterización de películas de quitosano-cítrico-HPMC., Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma México., México D.F.

Orozco S. F. y Rodríguez M. M., (2007). Cell suspension culture of *Azadirachta indica* for production of a bioinsecticide

Pacheco, N.; Garnica-Gonzalez, M.; 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.

Padman M. y Janardhana G.R.,(2011) Inhibitory effect of essential oils on the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. the causal organism of leaf spot disease of *Murraya koenigii* L.

Pereyra P.J., Rossini G.B., Darrigran G.,(2012) Toxicity of Neem's oil, a Potential Biocide against the Invasive Mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker 1857), *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. 1065-1071.

Pérez Q. J., Coll G.Y., Curiel H., Peniche C.C. (2010). Microspheres of chitosan for controlled delivery of brassinosteroids with biological activity as agrochemicals.

Rodríguez V. L., (2011), *Uso de trealosa y Lactobacillus plantarum para la conservación poscosecha de litchi (Litchi chinensis Sonn.var Brewster)*” Tesis de doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.

Royal Botanic Gardens. (2006). *Neem. Plant Cultures, exploring plant and people*. Royal Garden Botanic, Kew. Disponible en internet: http://www.plantcultures.org.uk/plants/neem_landing.html.

Sánchez R., Damas R., Domínguez P., Cerezo P., Salcedo I., Aguzzi C., Viseras C., (2010) *Uso de la HidroxiPropilMetilCelulosa (H) en liberación modificada de fármacos*.

Sánchez Fiorentini S. A., Untiveros Bermúdez G., (2004), *Determinación de la actividad floculante de la pectina en soluciones de hierro (III) y cromo (III)*, *Rev. Soc. Química*. 70(4);201-208.

Santander Ortega M.J., Peula Garcia J.M., Goycoolea F.M. Ortega Vinuesa J.I., (2011) *Chitosan nanocapsules: Effect of chitosan molecular weight and acetylation degree on electrokinetic behaviour and colloidal stability*, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*. 571-580.

Saxena, R. C. (2002). *Management of insect pestswith neem: Global perspective*. In: 2002 *NeemProceedings. Neem Foundation, India*.

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.

Schols H. A., Visser R. G. F. and Voragen A. G. J. (2009.)Pectins and pectinases. *Netherlands. Wageningen Academic Publishers.*

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

SIAP SAGARPA. 2013. *Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Consultado en línea: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>*

Silva, P. S.; J. B. Menezes, O. F. Oliveira e P. I. B. Silva.(2003). Distribuição do teor de sólidos solúveis totais no melão. *Hortic. Bras.* 21 (1); 31-33.

Singh, B.; Sharma, D.K. & Gupta, A. J. (2008). In vitro release dynamics of thiram fungicide from starch and poly(methacrylic acid)-based hydrogels. *Hazardous Materials.* 154; 278-286.

Singh, B.; Sharma, D.K.; Kumar, R. & Gupta, A. J. (2010). Development of a new controlled pesticide delivery system based on neem leaf powder. *Hazardous Materials.* 177; 290–299.

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

Sivakumar, D., Wijeratnam, W., Wijesundera, R.L.C., Marikar F.M.T y Abeyesekere M. (2000). Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Phytoparasitica.* 28;1-8.

Sopeña F.; Maqueda, C. & Morillo E. (2009). Controlled release formulations of herbicides based on micro- encapsulation. *Cien. Inv. Agr.* 35 (1); 27-42.

Srisornkompon, P., Pichyangura, R., Chadchawan, S., (2013) Chitin and Chitosan Research. 19 (2);130.

Waldir, E., Rynchtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., Egoavil, E.(2007). Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Revista Peruana de Biología*, 14; 271-275.

Yáñez-Mendizábal V., Viñas I., Usall J., Torres R., Solsona C., Teixidó N., (2012), Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *Biological Control*. 60 (3), 280–289

Yulia E., Shipton W.A., Coventry R.J. (2006). Activity of some plant oils and extracts against *Colletotrichum gloeosporioides*, *Plant Pathology Journal* 5 (2); 253-257

Zhang, D., Quantick P. C. (1997). Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit. *Food Research Centre* 195-202.