



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PELÍCULAS DE  
QUITOSANO-CÍTRICO-HPMC**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**PRESENTA:**

**NICIO CRUZ ARIANA ANDREA**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: M.A.O. ROSA LUZ CORNEJO ROJAS**

**VOCAL: M.C. LUCIA HERNÁNDEZ GARCIADIEGO**

**SECRETARIO: DRA. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO**

**1er. SUPLENTE: DR. FRANCISCO RUIZ TERÁN**

**2° SUPLENTE: DR. MIQUEL GIMENO SECO**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento de Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (No. de Proyecto PICSA 11-69) y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SEP-CONACYT No. 105628).

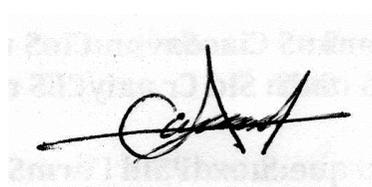
### **ASESORA DEL TEMA**



---

**DRA. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO**

### **SUSTENTANTE**



---

**ARIANA ANDREA NICIO CRUZ**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Instituto Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (No. de Proyecto PICSA 11-69) por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (SEP-CONACYT No. 105628).

Especialmente a la Dra. Keiko Shirai Matsumoto, por el gran apoyo recibido durante mi estancia en su laboratorio. Muchas gracias Dra. por haber confiado en mi, por ayudarme y por siempre darme ánimos para seguir. Me faltan las palabras para expresarle mi más profundo agradecimiento y admiración por usted. Sinceramente muchas gracias.

A la Dra. Clara Pelayo Zaldívar, por que gracias a ella gran parte de este trabajo fue posible, por su gentileza y calidad humana que la caracterizan. Nunca voy a olvidar todas las atenciones que tuvo conmigo. Muchas gracias.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco, por su ayuda para resolver mis dudas, su disponibilidad y atención otorgada. Gracias.

Al Dr. Alberto Tecante por permitirme trabajar en su laboratorio y poder realizar parte de mi trabajo. Gracias.

A Fabiola Hernández, por tu comprensión, tus consejos, tu amistad. Hay tantas cosas que te debo Fabi. Gracias a ti también fue posible la realización de este proyecto, sin tu ayuda no lo hubiera logrado. Siempre estaré eternamente agradecida por haberte conocido. Gracias.

Especialmente a todas mis amigas de la facultad de química, Ocelli, Gina, Bety, Marijo, Caro, Adla, Natalia, Licha, Selene, Anita, Lupita. A mis amigos del laboratorio de tejidos vegetales, Mayte, Mónica, Diana, Diego, Mary, Victor. A mi amiga Antonieta de la CUR. A mi amigo Miguel Zamora. Gracias por todos aquellos momentos tan agradables que hicieron mi estancia en la Universidad inolvidable. Siempre los llevaré en mi corazón.

A mis compañeros de la UAM-I, Zaizy, Alfonso, Carmen, Ulises, Alberto. En verdad todos fueron muy buenas personas conmigo. Gracias por todos los momentos divertidos, todas sus atenciones pero sobre todo, por haber hecho mi estancia muy agradable.

## DEDICATORIAS

*A mi hermoso hijo Amauri Zaid*

*Hijo te amo, eres el regalo más hermoso que Dios me pudo haber mandado. Este trabajo también es tuyo hijo ya que, desde que estabas en mi pancita hemos trabajado juntos en este proyecto y hoy gracias a Dios lo hemos terminado. Gracias hijo por estar en todos aquellos momentos que pensé que no lo lograría pero sin embargo tus risitas y tu compañía me hicieron ser más fuerte, no dejarme vencer y luchar por nuestros sueños. Hoy comenzamos una nueva etapa juntos y juntos siempre lo lograremos. Te amo.*

*A mi mamá Martha Cruz*

*Mamita muchas gracias, por que sin ti nunca hubiera podido ver este sueño realizado. Gracias por haber soportado todas aquellas noches de desvelo y todos los momentos malos que pasamos. Por tu comprensión, tu ayuda y tus consejos. Te agradezco tu dedicación, tu compañía, tu amor. Eres mi ejemplo de tenacidad. Hoy gracias a ti estoy aquí, te debo la vida mamá. Te quiero mucho.*

*A mi papá Margarito Nicio y mis hermanos Ericka e Isidro*

*Muchas gracias por su compañía y sus enseñanzas, los quiero mucho. Son parte de lo que soy. Gracias por su apoyo y comprensión.*

*A mi esposo Fernando Tovar*

*Sabes que te amo por sobre todas las cosas. Tú y mi hijo ahora son mi familia. Gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas. Espero que Dios nos permita estar mucho tiempo juntos. Te amo.*

*A todas y cada una de las personas que han sido y fueron parte de mi vida. Gracias*

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	iii
DEDICATORIAS .....	iv
CONTENIDO .....	v
Lista de figuras .....	1
Lista de tablas .....	6
Abreviaturas acrónimos .....	11
Resumen.....	13
Abstract .....	17
1. Introducción .....	19
2. Revisión bibliográfica .....	21
2.1. Quitina y Quitosano .....	21
2.1.1. Quitina .....	22
2.1.2. Obtención de quitina.....	22
2.1.3 Quitosano .....	23
2.1.4. Obtención de quitosano .....	24
2.1.5. Métodos de determinación de grado de acetilación de quitosano .....	25
2.1.6. Determinación del peso molecular .....	26
2.2. Películas y recubrimientos comestibles.....	26
2.2.1 Uso de polímeros para la formación de películas y recubrimientos .....	27
2.2.2. Uso de películas y recubrimientos en frutos y hortalizas .....	29
2.3. Frutos .....	30
2.3.1. Desarrollo fisiológico .....	30
2.3.2. Frutos climatéricos .....	31
2.3.3. Frutos no climatéricos .....	31
2.4. Litchi ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn) .....	31
2.4.1. Origen y distribución .....	31
2.4.2. Familia botánica .....	32
2.4.3. El fruto .....	33
2.4.4. Composición de fruto .....	34

2.4.5. Manejo poscosecha de la fruta fresca .....	34
2.4.6. Recomendaciones para el manejo poscosecha.....	35
2.4.7. Factores que afectan la calidad comercial del litchi .....	35
2.5. Antocianinas .....	37
2.5.1. Estabilidad de las antocianinas .....	38
2.6. Fenoles .....	42
2.7. Determinación del color .....	43
2.8. Grados Brix .....	45
2.9. Sólidos solubles totales (SST) .....	45
2.10. Acidez Titulable (AT) .....	46
2.11. Relación SST/Acidez.....	46
3. Antecedentes.....	48
4. Justificación .....	51
5. Objetivos .....	52
6. Hipótesis.....	53
7. Materiales y métodos .....	54
Materiales .....	55
7.1.1. Pluma de calamar gigante, <i>Dosidicus gigas</i> .....	55
7.1.2. Material biológico .....	55
7.1.3. Reactivos.....	55
7.1. Métodos .....	56
7.2.1. Extracción de $\beta$ -quitina.....	56
7.2.2. Preparación de quitosano por desacetilación homogénea.....	56
7.2.3. Caracterización de quitosano por métodos analíticos.....	57
7.2.4. Preparación de películas a base de Q-C-HPMC. ....	58
7.2.5. <i>Evaluación del efecto de entrecruzamiento entre quitosano-cítrico-HPMC</i> .....	59
7.2.6. Determinación de concentración de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ necesario para catalizar la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano, el ácido cítrico y la HPMC.....	61
7.2.7. Caracterización de las películas en cuanto a espesor, propiedades físico- mecánicas y permeabilidad al vapor de agua .....	61

7.2.8. Diseño experimental para bioensayo con frutos de litchi. ....	63
8. Resultados y discusión .....	69
8.1. Extracción de $\beta$ -quitina y quitosano .....	69
8.2. Caracterización de $\beta$ - quitina y quitosano .....	70
8.2.1. Espectrometría de infrarrojo. ....	70
8.2.2. Determinación del contenido de solubles, viscosidad intrínseca ( $M_w$ ) y grado de acetilación de quitosano. ....	71
8.3. Elaboración de películas a base de Q-C-HPMC y evaluación del efecto de entrecruzamiento por medio de HRMN e IR .....	72
8.4. Determinación de concentración de $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ necesaria para catalizar la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano, el ácido cítrico y la HPMC en base a sus propiedades físicas. Determinación de espesores, fuerza punción y fuerza tensión. ....	81
8.4.1. Efecto de la concentración de catalizador (Fosfato de sodio monobásico) en el espesor de las películas.....	81
8.4.2. Esfuerzo de fractura .....	83
8.4.3. Deformación de fractura .....	85
8.4.4. Modulo de Young .....	86
8.5. Propiedades de barrera. Evaluación de la permeabilidad al vapor de agua de la película Q-C-HPMC. ....	87
8.6. Evaluación del efecto de la formulación Q-C-HPMC y otros tratamientos en la calidad y el periodo de conservación del litchi ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn) CV Brewster. ....	88
8.6.1. Resultados de las variables o atributos de calidad medidos durante el almacenamiento de los frutos.....	89
9. Conclusiones.....	103
10. Perspectivas .....	104
11. Trabajos presentados .....	105
11.1 Participación en congresos .....	105
12. Bibliografía .....	106
13. Anexos .....	116
13.1 Espectrometría de Infrarrojo. Grupos funcionales de $\beta$ -quitina y quitosano.....	116
13.2 Determinación de peso molecular promedio por viscosidad ( $M_w$ ).....	118

13.3 Determinación del grado de acetilación por HRMN .....	120
13.4. Resonancia magnética nuclear de protón del quitosano, el ácido cítrico, la HPMC y la película Q-C-HPMC purificada. Ecuaciones de relación molar y porcentaje de incorporación. ....	122
13.5 Propiedades mecánicas de las películas. ....	125
13.5.1. Señal primaria carga-tiempo .....	125
13.5.2. Tratamiento de datos. ....	126
13.5.3. Esfuerzos de fractura, deformación de fractura y módulo de Young de películas de quitosano-cítrico-HPMC. ....	128
13.6. Tratamiento de datos. Permeabilidad al vapor de agua (WVP) .....	129
13.7. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) de tratamientos aplicados a litchi.....	130



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Estructuras químicas de la quitina y quitosano.....	24
Figura 2.- Grupo Flavilio .....	37
Figura 3.- Antocianidinas, I: Pelargonidina, II: Cianidina, III: Delfinidina y IV: Peonidina.....	38
Figura 4.- Reacciones de transformación estructural de las antocianinas en el intervalo de pH de 1 a 7. A valores de pH bajos se encuentra en forma de flavilio (I) de color rojo; a pH mayores de 5 se produce la base anhidra (II) de color púrpura. Tanto la sal de flavilio como la base anhidra pueden convertirse a la base de carbinol (III) incolora, que predomina en el intervalo de pH de 4 a 5 (Badui, 1994).....	39
Figura 5.- Curva espectrofotométrica de la degradación de las antocianinas del jugo de uva durante el almacenamiento: a) control sin calentar, b) calentado a 99 °C por 1h, c) calentado a 99 °C por 2h y d) jugo de uva comercial (Badui, 1994).....	40
Figura 6.- Reacción del bisulfito con las antocianinas (Badui, 1994).....	41
Figura 7.- Medida del color utilizando un colorímetro Hunter-Lab Color Flex ® (Hunter Lab, 2001).....	44
Figura 8.- Espacios de color Hunter L,a,b de un colorímetro Hunter-Lab Color Flex ® (Hunter Lab, 2001) .....	45
Figura 9.- Desarrollo experimental de la preparación y caracterización de los materiales con base a quitosano y HPMC.....	54
Figura.- 10 Metodología utilizada para purificar películas de Q-C-HPMC....	60
Figura 11.- Espectro de transmitancia en la región del infrarrojo medio de a) β-quitina y b) quitosano de calamar. ....	70
Figura 12.- Espectro de H-RMN de quitosano de calamar ( <i>Dosidicus gigas</i> ) .....	72



Figura 13.- Películas de Q-C-HPMC, a) Formulación 1, b) Formulación 2, c) Formulación 3, d) Formulación 4, e) Formulación 5. ....	73
Figura 14.- Estructura química de la Hidroxi propil metil celulosa donde R=H, CH <sub>3</sub> o CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> .....	73
Figura 15.- Reacción de entrecruzamiento propuesta entre el quitosano, ácido cítrico, HPMC y NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> como catalizador donde R=H, CH <sub>3</sub> o CH <sub>2</sub> CH(OH)CH <sub>3</sub> . ....	74
Figura 16.- Espectro de transmitancia en la región del infrarrojo medio de a) quitosano, quitosano con diferentes concentraciones de ácido cítrico (g/L): b) 75, c) 50, d) 25, e) 5, y f) 2.5. ....	75
Figura 17.- Zona de integración de las señales correspondientes al masivo de protones del quitosano, la HPMC y el metil del quitosano.....	77
Figura 18.- Efecto de la concentración de catalizador (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) sobre el espesor (mm) de película. ....	82
Figura 19.- a) Equipo utilizado para la prueba de esfuerzo de fractura en la punción. b) Equipo utilizado para la prueba de esfuerzo de fractura en la extensión. Máquina de pruebas SINTECH 1/S. ....	84
Figura 20.- Comparación entre el esfuerzo de fractura (Mpa) por punción y por tensión de las formulaciones 2.1 y 2.2. ....	84
Figura 21.-Comparación entre la deformación de fractura (εH) en la punción y en la tensión de las formulaciones 2.1 y 2.2.....	85
Figura 22.- Comparación entre el módulo de Young en la punción y en la tensión de las formulaciones 2.1 y 2.2. ....	86
Figura 23.- Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de película de Q-C-HPMC.....	87
Figura 24.- Pérdida de peso de litchi CV Brewster tratados con biopolímero de Q-C-HPMC frente a 2 diferentes tratamientos y 2 controles almacenados a 7°C y una humedad relativa de 75%.Datos promedio de tres observaciones. Letras	



diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD..... 89

Figura 25.- Calidad visual de frutos de litchi CV Brewster tratados con quitosano. Fotos tomadas en los días 5,12 y 14 de almacenamiento a 7°C y 75%HR..... 90

Figura 26.- Luminosidad ( $L^*$ ) en frutos de litchi tratados con quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD..... 91

Figura 27.- Parámetro cromático  $a^*$  en frutos de litchi tratados con quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD..... 92

Figura 28.- Parámetro cromático  $b^*$  en frutos de litchi tratados con diferentes tratamientos de quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD..... 93

Figura 29.- Evolución de cianidina-3-rutinósido en frutos de litchi CV Brewster tratados con biopolímero Q-C-HPMC frente a dos controles, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) para cada tratamiento en tiempo diferente de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD. .... 94

Figura 30.- Antocianinas totales medidas por absorbancia (A/g pericarpio) en frutos de litchi CV Brewster tratados con con biopolímero Q-C-HPMC frente a dos controles, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para cada tratamiento en tiempo diferente de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD..... 95

Figura 31.- Concentración de fenoles (mg catequina/g pericarpio) en frutos de litchi CV Brewster tratados con biopolímero Q-C-HPMC frente a dos controles,



almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) para cada tratamiento en tiempo diferente de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD. .... 96

Figura 32.- pH de la cáscara en frutos de litchi tratados con biopolímero Q-C-HPMC frente a dos controles, almacenados a 7°C y 75% HR. .... 97

Figura 33.- Litchi inicial antes de aplicar algún tipo de tratamiento..... 98

Figura 34.- Índice de daño en frutos de litchi tratados con quitosano durante el almacenamiento a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) en cada tiempo de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD. .... 99

Figura 35.- Sólidos solubles totales de litchi CV Brewster tratados con diferentes formulaciones de quitosano y almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para cada tiempo de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD..... 100

Figura 36.-Porcentaje de acidez titulable reportado en %ácido málico en frutos de litchi CV Brewster tratados con diferentes tratamientos de quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD..... 101

Figura 37.- Cociente SST/AT de litchi CV Brewster tratados con diferentes tratamientos de quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al LSD. El cociente SST/AT que representa calidad aceptable se encuentra marcada con la línea. .... 102

Figura 38.- Estructura de  $\beta$ -quitina ..... 116

Figura 39.-Estructura de quitosano..... 117

Figura 40.- Viscosidad reducida e inherente con respecto a la concentración de quitosano..... 119



---

Figura 41.- Espectro de quitosano. HRMN .....	120
Figura 42.- Espectro de resonancia magnética de quitosano de calamar ( <i>Dosidicus gigas</i> ) .....	122
Figura 43.- Espectro de resonancia magnética del ácido cítrico.....	123
Figura 44.- Espectro de resonancia magnética de la HPMC .....	123
Figura 45.- Espectro de resonancia magnética del quitosano purificado de la formulación 1.....	124
Figura 46.- Señal típica carga-tiempo durante la fuerza de fractura en la punción y en la extensión de una película (Orendain, 2008).....	125



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.- Propiedades generales de la quitina y quitosano .....	21
Tabla 2.- Características deseables en la fruta de litchi.....	36
Tabla 3.- Características deseables en la cáscara de la fruta de litchi .....	36
Tabla 4.- Formulaciones con diferentes concentraciones de ácido cítrico..	58
Tabla 5.-Variación de concentración de fosfato de sodio monobásico con la formulación 2.....	61
Tabla 6.- Rendimiento de quitina y quitosano en base seca después de los tratamientos (ácido/álcali/desacetilación) con respecto a la materia inicial. ....	69
Tabla 7.- Contenido de Solubles, viscosidad intrínseca y grado de acetilación de quitosano de calamar. ....	71
Tabla 8.- Características cualitativas de películas de prueba de formulaciones iniciales. ....	73
Tabla 9.- Grupos funcionales presentes en el polímero formado por la reacción de entrecruzamiento. ....	76
Tabla 10.- Calculo de relación molar y porcentaje de incorporación de la HMPC para cada formulación realizada. ....	80
Tabla 11.- Calculo de relación molar y porcentaje de incorporación de ácido cítrico para cada formulación realizada.....	80
Tabla 12.- Características cualitativas de películas de prueba. Variación de concentración de fosfato de sodio monobásico.....	81
Tabla 13.- Relaciones molares probadas para 3 distintas formulaciones donde la cantidad de ácido cítrico se mantiene constante. ....	82
Tabla 14.- Tratamientos aplicados a frutos de litchi ( <i>Litchi chinensis</i> Sonn) CV Brewster. ....	88
Tabla 15.- Grupos funcionales del espectro de $\beta$ -quitina.....	116



Tabla 16.- Grupos funcionales del espectro de quitosano de calamar. ....	117
Tabla 17.- Tiempo que tardan en recorrer dentro de un viscosímetro de Ostwald soluciones de quitosano 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 4 g/L en ácido acético 0.35 M/ acetato de sodio 0.2 M a 25°C. ....	118
Tabla 18.- Cálculo de la viscosidad relativa, específica, reducida e inherente de soluciones de quitosano a diferente concentración. ....	118
Tabla 19.- Esfuerzo de ruptura $\sigma_v$ (MPa), deformación de fractura $\epsilon_H$ y módulo de Young (MPa) en la punción. ....	128
Tabla 20.- Esfuerzo de ruptura $\sigma_v$ (MPa), deformación de fractura $\epsilon_H$ y módulo de Young (MPa) en la tensión. ....	128
Tabla 21.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos $\alpha=0.05$ . ....	130
Tabla 22.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos $\alpha=0.05$ . ....	131
Tabla 23.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos $\alpha=0.05$ . ....	131
Tabla 24.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos $\alpha=0.05$ . ....	132
Tabla 25.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.:	



Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 132

Tabla 26.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 133

Tabla 27.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 133

Tabla 28.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 134

Tabla 29.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 134

Tabla 30.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 135

Tabla 31.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 135

Tabla 32.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.:



Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 136

Tabla 33.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 136

Tabla 34.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 137

Tabla 35.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 137

Tabla 36.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ ..... 137

Tabla 37.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha\leq 0.05$ ..... 138

Tabla 38.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha\leq 0.05$ ..... 138

Tabla 39.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.:



Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007)  
con efectos significativos  $\alpha \leq 0.05$ ..... 139



## ABREVIATURAS ACRÓNIMOS

ANOVA= Análisis de varianza

AT= Acidez titulable

$a_w$ = Actividad del agua

CCT= Control lavado con tensoactivos aniónicos y anfotéricos

CIE= Commission International d'Eclairage

CQC= Control Quitosano/ ácido cítrico

CST= Control

CV= Cultivar

DA= Grado de acetilación

$D_{deac}$ = Grado de desacetilación

DM= Desmineralización

DMac= Dimetil acetamida

DP= Desproteínización

HPLC= Cromatografía líquida de alta resolución.

HPMC= Hidroxi propil metil celulosa

HR= Humedad relativa

H-RMN = Resonancia magnética nuclear protón.

IR= Espectroscopía de infrarrojo

*Lb.* = Lactobacillus



LSD= Mínima diferencia significativa

MC= Diclorometano (por sus siglas en inglés)

$M_w$ = Peso molecular

Peg-600= polietilenglicol 600 diácido

PPO= Polifenol oxidasa

POD= Peroxidasa

PF= Película formada

Q-C-AOX = Mezcla de quitosano , ácido cítrico y antioxidantes L-cisteína y eritorbato de sodio

Q-C-HPMC= Quitosano entrecruzado con ácido cítrico e hidroxipropil metil celulosa

Q-co-C = Copolímero de quitosano entrecruzado con ácido cítrico

SBF= Solución buffer de fosfatos

SST= Sólidos solubles totales

TCA = Acido tricloroacético

UV= Ultra violeta

VTVA= Velocidad de transmisión de vapor de agua

WVP= Permeabilidad al vapor de agua (por sus siglas en inglés)



## RESUMEN

En la preparación de películas a base de biopolímeros con actividad antibacteriana y propiedades de barrera a la humedad, la eficiencia antibacteriana del quitosano ha llevado a que muchos investigadores estudien variaciones en la formulación de películas y recubrimientos así como la modificación de los métodos de preparación y el uso de aditivos como lo son los plastificantes.

En el presente proyecto de tesis de licenciatura se prepararon y caracterizaron películas de quitosano funcionalizadas con HPMC y entrecruzadas con ácido cítrico mediante un catalizador grado alimenticio. Este trabajo muestra una alternativa más en la elaboración de nuevos materiales donde, las propiedades biológicas y biodegradables de dichos polímeros son explotadas aplicándolas a un producto vegetal como lo es el litchi (*Litchi chinensis Sonn*).

En la primera etapa del experimento se realizó la extracción y caracterización de  $\beta$ -quitina a partir de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*), mientras que en la segunda parte se obtuvo quitosano a partir de la  $\beta$ -quitina extraída en la etapa anterior. En la tercera y cuarta etapa se elaboraron las películas de quitosano y HPMC para su posterior caracterización. En la 5 y 6 etapa se determinó la cantidad de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  como catalizador de la reacción de entrecruzamiento y su correspondiente caracterización. En la última etapa se hizo un estudio sobre el efecto en la conservación y calidad poscosecha de *Litchi chinensis Sonn* del polímero Q-C-HPMC y otros tratamientos con quitosano.

En la extracción de  $\beta$ -quitina y quitosano, se realizaron dos repeticiones para posteriormente hacer un promedio y determinar el porcentaje extraído de ambos productos. Los resultados muestran un rendimiento de  $\beta$ -quitina de  $30.2 \pm 0.4\%$  mientras que para el quitosano un rendimiento de  $78.06 \pm 4.8\%$  respecto a la  $\beta$ -quitina inicial.

Se realizó análisis de IR para la  $\beta$ -quitina y quitosano extraídos. Los grupos funcionales que se observaron para la quitina fueron amida secundaria y alcohol a  $3278 \text{ cm}^{-1}$ , doblete característico del grupo amida en  $1629$  y  $1548 \text{ cm}^{-1}$  así como la



torsión del grupo NH en  $1373\text{cm}^{-1}$ . El grupo éter alifático se aprecia en  $1026\text{ cm}^{-1}$ . En cuanto al quitosano se observó la desaparición de las bandas características del grupo amida y la aparición de un doblete a  $1590\text{ cm}^{-1}$  característico de una amina secundaria, comportamiento debido a la desacetilación de la quitina. A un número de onda de  $3356\text{ cm}^{-1}$  se observó la presencia de un grupo alcohol y amina secundaria, mientras que la banda del éter alifático a  $1019\text{ cm}^{-1}$  se conservó. En la determinación de contenido de solubles en quitosano se encontró un alto porcentaje de solubles de  $93.02\pm 0.81\%$  en ácido acético  $0.1\text{M}$ . Así mismo se determinó un peso molecular ( $M_w$ ) de  $461.3\text{ kDa}$  correspondiente a un quitosano de peso molecular medio. El DA fue determinado por medio de  $^1\text{H-NMR}$  mostrando un DA de  $13.24\pm 0.61\%$ , considerado de alta calidad.

Se prepararon 5 diferentes formulaciones a base de quitosano, ácido cítrico y HPMC donde, se purificó el quitosano producto de la reacción de entrecruzamiento de los polímeros. El espectro IR obtenido de cada precipitado mostró que conforme se disminuyó la concentración de ácido cítrico disminuyó de igual forma la formación del enlace éster, representado principalmente por las vibraciones presentes a  $1750\text{ cm}^{-1}$ , mostrando que las formulaciones 1 y 2 presentaron mayor intensidad de esta banda. Por medio de un análisis de HRMN se determinó la relación molar y el porcentaje de incorporación de HPMC y del ácido cítrico al polímero final formado. Las películas con mejores características se obtuvieron de la formulación 1 y 2. La formulación 2 mostró ser la mejor en cuanto a rendimiento e incorporación de ácido cítrico. Se observó que a medida que se disminuye la concentración de cítrico aparece un exceso de catalizador ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) por lo que fue necesario ajustar su concentración. Así mismo, se observó que el efecto de la concentración del catalizador con respecto al grosor de las películas está descrito por una relación proporcional inversa, efecto que podría estar relacionado con la cantidad de ácido cítrico incorporado a la molécula.

En general, se determinó que el esfuerzo requerido para fracturar los materiales empleados fue mayor en la tensión que en la punción, así como la deformación de fractura requerida fue mayor en la punción que en la tensión. La



que mostro el mayor esfuerzo de fractura tanto en la punción como en la tensión fue la formulación 2.2 (19.19 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ). Se determinó que la formulación 2.2 es un material que requirió de un mayor esfuerzo para ser deformado. Con base a las pruebas anteriores se eligió a esta formulación como única para su evaluación de WVP así como su aplicación *in-vivo* a litchi. A esta formulación se le denominó Q-C-HPMC (Quitosano-Cítrico-HPMC). La mayor permeabilidad de la película Q-C-HPMC fue observada a una temperatura de  $13^\circ\text{C}$  y un gradiente de HR de 0-75%, mientras que la menor permeabilidad fue a  $13^\circ\text{C}$  con un gradiente de HR de 75-95%. A una HR de 44% y una temperatura de  $26^\circ\text{C}$  se observó una permeabilidad intermedia entre las dos HR anteriores. En la evaluación del efecto de la formulación Q-C-HPMC en la calidad y conservación del litchi (*Litchi chinensis Sonn*) CV Brewster, se formaron unidades experimentales y se almacenaron en una cámara de refrigeración a  $7^\circ\text{C}$  y una humedad relativa de 75%. La pérdida de peso fue elevada siendo ésta entre 2.38 a 12.85% observándose la menor pérdida de peso en los frutos que no fueron sometidos a ningún tipo de tratamiento (CST) mientras que la mayor pérdida de peso se observó en Q-C-AOX. Con respecto a la pérdida de color del pericarpio se determinaron 3 parámetros cromáticos, el parámetro  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . Los frutos más oscuros y con un rojo significativamente mayor fueron los pertenecientes al tratamiento a base del biopolímero de Q-C-HPMC. Por lo que en este sentido, la funcionalización entre el quitosano, el ácido cítrico y la HPMC permite obtener recubrimientos que estabilizan las antocianinas presentes en la cáscara de los frutos de litchi. Con respecto al contenido de Cianidina-3-rutinósido la cual, es la antocianina más abundante ( $\geq 75\%$ ) en frutos de litchi CV Brewster, se observó que la aplicación del tratamiento Q-C-HPMC disminuyó significativamente la degradación de estas antocianinas durante los primeros 3 días de almacenamiento y aunque en el décimo día esta diferencia no fue significativa si lo fue en el décimo séptimo ( $\alpha < 0.05$ ). La medida de la absorbancia por espectrofotometría ( $A/g$  pericarpio) también mostró una disminución significativa ( $\alpha < 0.05$ ) durante los primeros tres días de almacenamiento de las antocianinas totales en el pericarpio de los frutos, resultado congruente que se correlacionó bien con la concentración de cianidina-



3-rutinósido obtenida por HPLC. El pH inicial del tratamiento Q-C-HPMC fue de 2.48 y el pH inicial de los frutos control CST fue de 4.35. Cuando este tratamiento es aplicado a los frutos, prácticamente se mantuvieron en el mismo pH, aumentando ligeramente en el día 10 y finalmente un ligero descenso en el día 17, por lo que de acuerdo a las observaciones, el tratamiento Q-C-HPMC mantiene a los frutos en pH ácido. Con respecto a los niveles de fenoles totales (mg de catequina/g pericarpio), se observó que hubo una mayor concentración de fenoles en los frutos tratados con el tratamiento Q-C-HPMC que con los otros tratamientos y controles. El índice de daño (ID) fue evaluado con una escala hedónica de 0 (= ausencia de oscurecimiento) a 6 ( $\geq 50\%$  de oscurecimiento). En general, los frutos de los cuales inicialmente se partió se encontraron en un grado superior a 4 dentro de la escala hedónica de 6 grados. Al décimo día prácticamente todos los frutos alcanzaron el máximo en la escala hedónica a excepción del tratamiento Q-C-HPMC, sin embargo, el análisis estadístico (ANOVA,  $\alpha < 0.05$ ) señala que no hay diferencia significativa entre tratamientos. Los análisis de concentración de sólidos solubles totales (SST) no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $\alpha < 0.05$ ), solo al día 10 se observó la formación de dos grupos donde el control CCT fue el que presentó una cantidad significativamente menor de SST, en este tiempo, el porcentaje de SST fluctúa entre 19-20%. La acidez titulable (AT) disminuyó durante todo el almacenamiento, observándose un porcentaje mayor de AT en los frutos de CQC. El análisis estadístico ANOVA señala que existe diferencia significativa entre tratamientos y tiempos. Esta disminución de acidez titulable observable sugiere que los ácidos orgánicos son el sustrato empleado en la respiración del fruto. El cociente SST/AT ( $^{\circ}\text{Brix}/\%$  ácido málico) alcanzó valores desde 87 hasta aproximadamente 145 en el día 10 (CCT). Al décimo séptimo día de almacenamiento, tanto el tratamiento Q-C-HPMC como CQC y CST alcanzan un máximo aproximado de SST/AT de 126. Aparentemente la calidad gustativa solo se conserva durante los primeros 3 días de almacenamiento sin embargo, esto pudo deberse al avanzado estado de madurez en los que se encontraban los frutos.



## ABSTRACT

Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) is a highly perishable and non-climacteric fruit commercially valued for its exotic flavor. The main postharvest problems of litchi fruits are loss of red color owing to high dehydration rates and rind browning. The application of chitosan solution in dilute acids on pericarps of litchi, longan and rambutan has been reported as a method to control browning by reducing pH and preventing losses of anthocyanins, flavonoids and total phenolic compounds (Jiang, et al, 2000; Ducamp-Collin, et al, 2008; Martínez-Castellanos, et al, 2009). Nevertheless, the cost is a constraint in the development of chitosan (C) based films. Moller et al have reported its crosslinking with hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) for reduced costs and improvement of material properties. The goals of this project were the synthesis, characterization and application of chitosan crosslinked with HPMC using citric acid (CA).

Chitosan was obtained from deacetylation of giant squid pen (*Dosidicus gigas*)  $\beta$ -chitin. The concentrations of CA and catalyzer for the synthesis of C-CA-HPMC were determined by varying the molar ratio. Subsequently, the materials were purified by precipitation in an anti-solvent and characterized. The best formulation was selected according to the percentage of CA and HPMC incorporated to chitosan determined by  $^1\text{H-NMR}$  and ATR-FTIR. In addition, determination of mechanical properties and water vapor permeability (WVP) were carried out. The application of C-CA-HPMC and chitosan dissolved in CA (Control 2) was carried out by fruit immersion. Color ( $L^*, a^*, b^*$ ), anthocyanins total (C3R), phenolic compounds (catechin) and pericarp browning (hedonic scale; absence of browning=0 and  $\geq 51\% = 6$ ) were evaluated on treated litchi fruits.  $\beta$ -Chitin and chitosan yields were  $30.2 \pm 0.4\%$  and  $78.06 \pm 4.8\%$ , respectively. The chitosan produced was highly soluble in 0.1M acetic acid ( $93.02 \pm 0.81\%$ ) with a molecular weight (Mw) of 461.3 kDa and degree of acetylation of  $13.24 \pm 0.61\%$ . The selected formulation to be applied showed the best mechanical properties such the highest elasticity. Its WVP analyses at  $13^\circ\text{C}$  showed higher permeability of the film with RH within 0-75% than that within 75- 95%.



The weight losses of litchis had no significant differences between controls and C-CA-HPMC. The fruits treated with C-CA-HPMC were significantly redder than those in controls. The content of C3R in C-CA-HPMC treated fruits was significantly higher than that determined in controls after 10 days of storage. The measurement of total anthocyanins were also significant ( $\alpha < 0.05$ ) during the first three days of storage in the pericarp of the fruit. Furthermore, high concentration of phenolic compounds was observed. The fruits, which started at a high degree of browning  $>4$  (31-40% obscuration), kept this scale of 4 by the third day fruits when treated with C-CA-HPMC. Therefore, coating based on C-CA-HPMC delayed the browning of pericarp of litchis in despite of their high initial degree of browning.



## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe un incremento en la demanda de alimentos que proporcionen seguridad, alta calidad microbiológica y una larga vida de anaquel, constantemente son investigadas y desarrolladas nuevas estrategias que permitan la conservación de estos (Sebti y col., 2007).

Debido a que la contaminación de la mayoría de los alimentos ocurre principalmente en la superficie se han tratado de desarrollar sistemas antimicrobianos que puedan actuar directamente al contacto o que puedan tener una migración positiva desde la estructura del empaque hacia los alimentos y así lograr un incremento en la inhibición de la contaminación (Lagaron y col., 2007).

El litchi (*Litchi chinensis Sonn*) es una fruta ovoide tropical y subtropical originaria de China y el norte de Vietnam comúnmente exportada debido a su atractivo color y exótico sabor. El color del pericarpio cambia durante la maduración de verde a rosado o rojo brillante debido a la disminución del contenido de clorofila y al incremento de antocianinas (Sivakumar y col., 2007; Orta-López, 2010). Un gran número de cultivares se siembran en todo el mundo, en México se siembra en los estados de Oaxaca, Michoacán, Veracruz, Puebla, Nayarit, Sinaloa y San Luis Potosí, con época de cosecha de mayo a julio. La variedad comercial más importante es Brewster (Convenio COVIA-UAMI, 2009; Orta-López, 2010).

El oscurecimiento del pericarpio, la decadencia poscosecha y las microfisuras son identificadas comercialmente como los mayores contribuyentes que afectan la calidad comercial del litchi durante su almacenamiento, transporte o vida de anaquel, actuando las microfisuras del pericarpio como puertos de entrada para la invasión poscosecha de patógenos. El oscurecimiento y la decadencia poscosecha son actualmente controladas por medio de una fumigación con dióxido de azufre en muchos países exportadores, sin embargo este tipo de fumigación deja residuos indeseables, alteraciones en el sabor del fruto y riesgo para la salud de los consumidores. Todos estos efectos indeseables han arrojado



la necesidad de desarrollar una alternativa en el tratamiento poscosecha del fruto y mantener su calidad. (Sivakumar y col.,2007).

Aunada a la problemática de la pérdida de color, el fruto es susceptible al ataque por insectos y microorganismos, como *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. y otros hongos saprófitos (Coates y col., 1994; Orta-López, 2010).

En ese sentido la quitina y su derivado el quitosano son polímeros naturales, producidos por insectos, crustáceos, e inclusive por algunos hongos (Alonso, 2009). Las ventajas del uso de la quitina y su derivado, el quitosano, es que son polímeros naturales, no tóxicos y biodegradables (Shirai, y col., 1996) contrariamente a los polímeros sintéticos.

De acuerdo con Moller y col. (2004), los biopolímeros como la quitina y su derivado desacetilado quitosano tienen un interés particular en la elaboración de empaques para alimentos debido a que éste posee carga positiva a pH ácido comportándose como un polielectrólito e interactuando con las cargas negativas de las paredes celulares de las células microbianas, compitiendo con los iones  $Ca^{2+}$  por los sitios electronegativos de la membrana, lo que compromete la integridad de ésta y en consecuencia hay pérdidas del material intracelular, lo que conlleva a la muerte celular.

Los mayores obstáculos en la elaboración de empaques basados en quitosano son la tendencia a la formación de estructuras cristalinas y el costo. Su asociación con derivados de celulosa como el HPMC (hidroxipropil metil celulosa) conducen a la reducción de costo. Así mismo la adición de un agente de entrecruzamiento como el ácido cítrico mejora la barrera contra el vapor de agua (Moller y col., 2004). La rigidez de los materiales subsecuentes puede ser controlada utilizando plastificantes como el glicerol o el empleo de sorbitol (Hosokawa y col.,1990).

Para otras aplicaciones se han preparado diferentes formas físicas de la quitina y el quitosano tales como hidrogeles, películas, nanofibras, soportes, micro/nanopartículas, andamios textiles y esponjas (Jayakumar y col.,2006,



Alonso y col.,2009;2010; Flores y col., 2006) para diversas aplicaciones biomédicas, liberación controlada de fármacos, genes, apósitos e ingeniería de tejidos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Quitina y Quitosano

Los polímeros de quitina y quitosano son aminopolisacaridos naturales con estructuras únicas, propiedades multidimensionales, funciones altamente sofisticadas lo que les confiere un amplio rango de aplicaciones en biomedicina y otras áreas de la industria, debido a sus atributos como biocompatibilidad, biodegradabilidad con seguridad ecológica, baja toxicidad, actividad antimicrobiana y baja inmunogenicidad, así mismo inmensas posibilidades estructurales para la modificación química y mecánica generando novedosos materiales con diversas propiedades, funciones y aplicaciones (Pillai, 2009).

Como en todas las estructuras poliméricas, el peso molecular ( $M_w$ ) y la distribución del mismo son parámetros que afectan las propiedades de la quitina y el quitosano en solución, que aunado al grado de acetilación (DA), juegan un papel importante en sus aplicaciones. La tabla 1 muestra intervalos de  $M_w$ , DA, viscosidad y principales disolventes de la quitina y el quitosano (Pacheco, 2010).

Tabla 1.- Propiedades generales de la quitina y quitosano

Propiedad	Quitina	Quitosano
$M_w$ (g.mol <sup>-1</sup> )	1x10 <sup>6</sup> a 2.5x10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup> a 5x10 <sup>3</sup>
DA	>40	0 a 40
Viscosidad (Cps) 1% disuelto en 1% ácido acético	No soluble	200-2000
Humedad (%p/p)	8-10	6-7
Solubilidad	DMac-LiCl/TCA-MC	Ácidos diluidos



### 2.1.1. Quitina

La quitina es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza después de la celulosa, con características estructurales y químicas similares, es uno de los componentes estructurales mayoritarios del exoesqueleto de insectos, crustáceos, artrópodos, anélidos, moluscos, celenterados y es un componente de la pared celular de algunos hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, así como de algas como las diatomeas (Shahidi y col., 1999; Martínez-Castellanos, 2009). A pesar de su enorme producción anual y fácil disponibilidad la quitina sigue siendo un recurso subutilizado principalmente debido a su estructura molecular intratable e insolubilidad en casi todos los disolventes comunes lo cual ha sido un gran obstáculo en su apropiada utilización (Pillai, 2009).

La quitina, es un polisacárido cristalino que cuenta con tres diferentes formas cristalográficas:  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -quitinas. La  $\alpha$ -quitina es la isoforma más abundante, se encuentra compactada dando una estructura cristalina donde sus cadenas se encuentran antiparalelas, favoreciendo los enlaces de hidrogeno intermoleculares. La alta cantidad de puentes de hidrogeno entre las cadenas de  $\alpha$ -quitina que se forman, son los responsables de su insolubilidad en disolventes acuosos y en la mayoría de los disolventes orgánicos (Blackwell y col., 1980). La  $\beta$ -quitina tiene un arreglo paralelo con una fuerza intermolecular más débil, dando una molécula más hidratable pero menos estable de quitina y la  $\gamma$ -quitina es una mezcla de las dos anteriores (Ramírez y col., 2006, Juárez, 2010).

### 2.1.2. Obtención de quitina

El exoesqueleto de camarón y cangrejo son las principales fuentes para la producción de la quitina a nivel comercial asociada con proteínas, minerales, lípidos y pigmentos, estos tienen que ser removidos para alcanzar un alto grado de pureza para diferentes aplicaciones biológicas necesarias (Percot y col., 2003; Pastor, 2004; Juárez, 2010). Diversos procesos de obtención de quitina se han empleado, destacando los métodos químicos y los biológicos. Dentro de los biológicos, se encuentra el ensilado, se define como un proceso de obtención en



el cual los ácidos adicionados o producidos inhiben el crecimiento de patógenos, presenta ciertas ventajas respecto a los otros, como el permitir la recuperación de productos con valor agregado. Dos tipos de ensilado son los más frecuentes: el ensilado químico, que se basa en la adición de ácidos inorgánicos u orgánicos y posteriormente es neutralizado y el ensilado obtenido por fermentación láctica, en el que el ácido es producido *in situ* por la fermentación bacteriana de una fuente de hidratos de carbono, y en donde los microorganismos responsables pueden provenir de la microflora natural del desecho o de cultivos iniciadores (Shirai y col., 2001; Cira y col., 2002; Juárez, 2010).

En el tratamiento químico se realizan procesos sucesivos de desproteínización y de desmineralización en medios alcalinos y ácidos respectivamente caracterizando el producto para definir sus propiedades (Pastor, 2004; Aye y Stevens, 2004, Juárez, 2010).

### 2.1.3 Quitosano

El quitosano es el polisacárido catiónico derivado desacetilado más importante de la quitina, la cual químicamente es una molécula análoga a la celulosa (Shirai, 1996; Plascencia, 2004); Esta formado por más de 5000 unidades de glucosamina (2-amino-2-desoxi-beta-D-glucosa) unidas por enlaces glicosídicos  $\beta$ -(1-4) (fig. 1). Se obtiene comercialmente del polímero de la quitina.

La diferencia entre ambos biopolímeros es arbitraria debido a que las formas completamente acetiladas o desacetiladas no existen en la naturaleza, ni como productos finales en un proceso; por tal motivo, en la práctica se le llama quitina al polímero que presenta mayor acetilación y quitosano al más desacetilado (Hansen y Llanes, 1994, Plascencia, 2004).

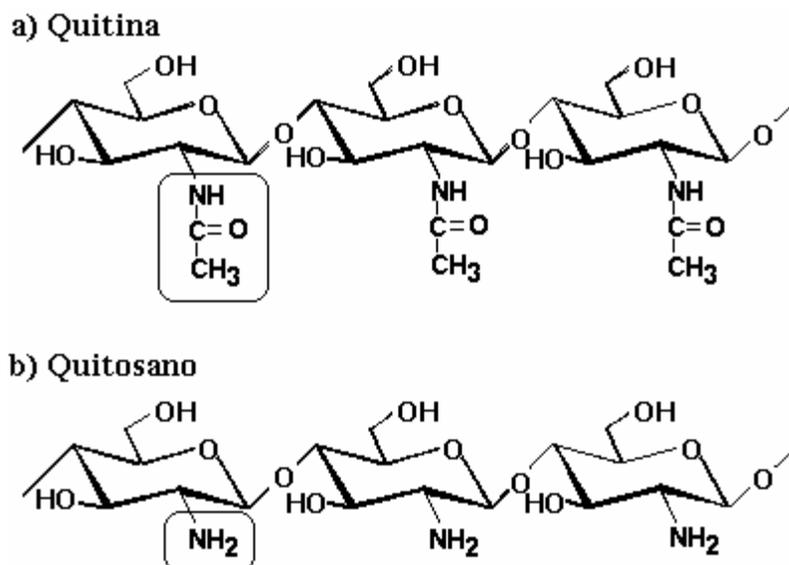


Figura 1.- Estructuras químicas de la quitina y quitosano.

El quitosano es insoluble en muchos disolventes, pero es soluble en soluciones ácidas como ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, ácido málico, sulfúrico, clorhídrico, entre otros. El uso del quitosano se ha visto limitado por ser insoluble en agua por su alta viscosidad y por su tendencia a coagular con proteínas a valores de pH altos, se han llevado a cabo modificaciones químicas teniendo como resultado muchos efectos que incrementan su solubilidad en agua (Rabea y col., 2003; Juárez, 2010).

#### 2.1.4. Obtención de quitosano

El quitosano se obtiene químicamente mediante la N-desacetilación de la quitina en medio alcalino, los parámetros de temperatura, concentración y tiempos de reacción son estrictamente controlados debido a que influyen en el grado de desacetilación, peso molecular, distribución molecular y por consiguiente en las propiedades y aplicaciones del biopolímero resultante (Synowiecki y col., 2003; Pacheco, 2010).

Existen dos tipos de desatilación química: la desaetilación homogénea y la heterogénea, la primera se lleva a cabo a bajas temperaturas o a temperatura



ambiente durante largos periodos de tiempo, con lo que se asegura la uniformidad de la reacción (Nemtsev y col., 2002; Pacheco, 2010) y la distribución de los grupos acetil resultante es arbitraria.

La desacetilación heterogénea es aquella en la que se utilizan altas temperaturas (100 a 140° C) las cuales favorecen la velocidad de la reacción, sin embargo la desacetilación se da con mayor rapidez en las regiones amorfas del biopolímero que en las áreas cristalinas lo que proporcionan una distribución de bloque e impide una mayor desacetilación (Prhajtan y col., 2008). La presencia de oxígeno durante la desacetilación favorece la degradación del polisacárido y da como resultado una disminución en la viscosidad y el peso molecular de los productos, estos cambios pueden ser limitados mediante el uso de atmósferas inertes como nitrógeno o argón (Pacheco, 2010).

#### 2.1.5. Métodos de determinación de grado de acetilación de quitosano

La estructura molecular y propiedades del quitosano se ven altamente afectadas por el DA. Por esta razón es necesario un método que determine con exactitud el grado de acetilación (Hirai y col., 1991).

Diversos métodos han sido estudiados para determinar el DA tales como titulaciones ácido base, conductimétricas, espectroscopia de infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear de protón (1H-NMR) (Roberts, 1992). La espectroscopia de NMR presenta la ventaja de la utilización de una pequeña cantidad de muestra y pueden analizarse muestras en forma líquida o sólida sin embargo, para la determinación del DA del quitosano el método más preciso es la espectroscopia de H-NMR en medio líquido, donde las muestras son disueltas en solución de D<sub>2</sub>O acidificado con HCl y el DA se determina con la relación del protón del metilo (1-4) 2 acetomido-2-dexoxy-β-D-glucano y la referencia de los protones H-2 al H-6 como se expresa en la ecuación 1 reportada por Hirai (1991) y Pacheco (2010):

$$DA(\%) = \frac{\frac{1}{3}ACH_3}{\frac{1}{6}\sum_{i=2}^6 AH_i} \quad (1)$$



### 2.1.6. Determinación del peso molecular

La viscosidad de las soluciones de la quitina y el quitosano se ven afectadas por el DA,  $M_w$ , concentración de polímero, pH y temperatura (Rabea y col., 2003). Debido a la insolubilidad de la quitina en diferentes disolventes, existe una limitación para la determinación del  $M_w$ . El método más utilizado para este propósito es la determinación de la viscosidad intrínseca, que con ayuda de la ecuación de Mark Houwink-Sakurada (Ecuación 2) proporciona el valor del  $M_w$  de manera indirecta (Pacheco, 2010).

$$\eta = KM_w^a \quad (2)$$

Donde  $\eta$  representa la viscosidad intrínseca,  $M_w$  el Peso molecular y los parámetros de K y a dependen de la naturaleza del disolvente y del polímero (Kumar, 2000).

Otros métodos como cromatografía en permeación en gel (GCP) y viscosidad han sido utilizados para la determinación del  $M_w$  en quitosanos. GPC, también llamada cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) acoplada a un detector de dispersión de luz es una de las técnicas de mayor confiabilidad que permite no solo la determinación del peso molecular sino también la distribución del mismo. La viscosimetría es un método rápido y simple en la determinación del  $M_w$  por lo que ha sido ampliamente estudiado (Einbu y col., 2004; Pacheco, 2010).

## 2.2. Películas y recubrimientos comestibles

Un recubrimiento es una capa de material comestible formado sobre un alimento a partir de una emulsión o hidrodispersión que es aplicado por atomización, inmersión, aplicación mecánica o manual con brochas (Bosquez y col., 2000; Martínez-Castellanos, 2009).

La aplicación de recubrimientos comestibles proporciona muchas ventajas respecto a la interacción de los alimentos frescos con el medio que los rodea,



como la disminución del intercambio gaseoso ( $O_2$  y  $CO_2$ ), migración de grasas y aceites, y transporte de solutos, mejorando las propiedades mecánicas y la integridad de los alimentos, además de la retención de los compuestos volátiles (Kester y Fennema, 1986; Martínez-Castellanos, 2009). El uso de películas comestibles ha sido ampliamente utilizado en la cobertura de superficies alimenticias separando diferentes componentes así como en la fabricación de cajas, bolsas o envolturas. Otras ventajas que incluyen las películas comestibles son la extensión del tiempo de vida de anaquel y la conservación de la calidad de los alimentos que forman barreras contra el oxígeno y que evitan pérdida de humedad (Fwu-Long y col., 2006). Existen aditivos que pueden mejorar y modificar las propiedades mecánicas, nutritivas y sensoriales de los recubrimientos, tales como: plastificantes, surfactantes y conservadores químicos. Sin embargo, también pueden alterar adversamente las propiedades de permeabilidad al vapor de agua, gases o transporte de solutos; su influencia dependerá de su concentración, estructura química, grado de dispersión en la película y grado de interacción con el polímero (Kester y Fennema, 1986).

La selección de los materiales para formar recubrimientos, se realiza en función de sus características y de las condiciones a las que será sometido el recubrimiento.

### *2.2.1 Uso de polímeros para la formación de películas y recubrimientos*

Los empaques basados en biopolímeros son definidos como empaques que contienen materiales crudos de origen agrícola o marino (Cha, 2004).

Durante las últimas dos décadas, los polímeros como empaque han empezado a ser una opción para muchas aplicaciones en la industria de los alimentos donde materiales como el papel, los metales y el vidrio anteriormente eran los más utilizados (Lee y Piergiovanni, 2008).

Los polímeros abarcan un amplio rango de materiales naturales y sintéticos de los cuales solo una pequeña porción son adecuados como para el uso en



empaques. Dichos polímeros confieren en su mayoría a reducir el costo de los polímeros sintéticos y pueden ser utilizados en varias formas manteniendo las propiedades adecuadas para la protección de los alimentos durante su distribución (Lee y Piergiovanni, 2008).

De acuerdo a Cooksey (2001), hay tres categorías básicas de películas antimicrobianas. Una involucra directamente la incorporación de aditivos antibacterianos en la película mientras que el segundo tipo involucra la cobertura con un material que actúa como acarreador del aditivo, liberando el agente antimicrobiano sobre la superficie del alimento. El tercer tipo es la utilización de macromoléculas antimicrobianas con propiedades de película como lo son los amino-polisacáridos catiónicos donde la liberación de agentes biocidas no es necesaria. Sin embargo, entre las limitaciones que tiene el uso de este último tipo es que requiere de contacto directo entre el empaque y el alimento para mayor efectividad (Moller, 2004).

El quitosano, puede formar fibras, películas, cadenas o nanopartículas utilizadas en diferentes aplicaciones. En comparación con otros bioempaques, el quitosano tiene la ventaja de ser capaz de incorporar sustancias funcionales como lo son vitaminas o minerales manteniendo su actividad antibacteriana. De esta manera, las películas a base de quitosano han sido usadas como material de empaque para la preservación de la calidad de una amplia variedad de alimentos (Fwu-Long y col.,2006).

La permeabilidad al vapor de agua de las películas de quitosano puede ser controlada mediante una modificación química con un agente de entrecruzamiento. Sin embargo, actualmente la utilización de agentes de entrecruzamiento como lo son el glutaraldeido y compuestos diepóxidos muestran ser altamente citotóxicos (Fwu-Long y col., 2006).

Los derivados de celulosa como lo son la hidroxil propil metil celulosa (HPMC) son materiales prometedores en la elaboración de cubiertas o películas comestibles asociados con la actividad antimicrobiana. La HPMC es un polímero



soluble usado en la industria de los alimentos como agente gelificante y estabilizante. Sin embargo, las películas de celulosa son pobres contra la barrera de vapor de agua debido a la inherente naturaleza hidrofílica del polisacárido (Moller,2004).

Las características higroscópicas de los derivados de celulosa muestran que la hinchazón debida al agua conduce a la pérdida de las propiedades barrera contra el agua y oxígeno. Una manera de mejorar esta barrera podría ser la incorporación de compuestos hidrofóbicos como lo son ácidos grasos dentro de la matriz de celulosa y así desarrollar una película compuesta. El entrecruzamiento por medio de un ácido policarboxílico podría ser otra interesante alternativa para potencializar el decremento de las características hidrofílicas y solubilidad de los polímeros de celulosa, el cual consiste en la formación de enlaces covalentes entre las cadenas de celulosa. Esta modificación química conduce a un decremento en la disponibilidad de los grupos hidroxilo, limitando la interacción polisacárido-agua por puentes de hidrogeno (Moller, 2004).

El entrecruzamiento de la HPMC con ácido cítrico resulta en el decremento de la afinidad natural del polímero hacia el agua produciendo películas no solubles asociadas con el mejoramiento de las propiedades barrera contra el vapor de agua (Moller, 2004).

Se han desarrollado materiales de empaque bioactivos que son amigables con el ambiente a base de Quitosano-HPMC, teniendo al quitosano como agente antibacteriano. Entre los principales obstáculos que tiene el desarrollar películas únicamente basados en quitosano se encuentra el alto costo. Por lo que su asociación con derivados de celulosa conduce a la reducción en costos de los materiales ya que la HPMC no es un polímero costoso (Moller, 2004).

### *2.2.2. Uso de películas y recubrimientos en frutos y hortalizas*

El uso de películas y recubrimientos para mejorar la calidad y vida comercial de frutas y hortalizas es común, ya que tiene la capacidad de retardar la velocidad de respiración, disminuir la pérdida de vapor de agua y emanación de



compuestos volátiles y de combatir, controlar o prevenir el crecimiento de larvas y microorganismos (Gontard y col.,1994). En frutos y hortalizas también se ha observado que las bajas presiones de oxígeno, generadas en el interior de los frutos por las películas y recubrimientos, tienen efectos benéficos sobre la fisiología del producto, tales como la reducción de la tasa respiratoria, inhibición de la producción y acción de etileno, así como la reducción de algunas fisiopatías (Ke y Kader,1992; Pesis, y col.,1993).

## **2.3. Frutos**

### *2.3.1. Desarrollo fisiológico*

La vida de los frutos puede dividirse en tres etapas fisiológicas: el crecimiento, la maduración y la senescencia. El crecimiento implica la división celular y el subsiguiente desarrollo de las células que dan cuenta del tamaño final alcanzado por el fruto y de la especialización de sus tejidos. La maduración suele iniciarse antes de que termine el crecimiento e incluye diferentes actividades en los distintos frutos (Martínez-Castellanos, 2009). La madurez de consumo sería el estado de desarrollo en el que el fruto ha alcanzado su máxima calidad estética y sensorial, lo que lo hace apto para el consumo humano inmediato. La madurez hortícola se define como aquel estado de desarrollo de una planta o parte de ella que posee los requisitos necesarios para ser utilizado por el consumidor para un propósito particular (Bosquez, 1999). La senescencia es un fenómeno genéticamente programado y altamente regulado durante el cual algunas rutas biosintéticas se inhiben y otras se activan. Esta incluye cambios dramáticos en la mayoría de los organelos, particularmente en los plástidos, las células mesofílicas y el tejido parenquimático de la pulpa de los frutos que conducen finalmente a la muerte (Martínez-Castellanos, 2009).



### 2.3.2. Frutos climatéricos

La mayoría de los frutos carnosos presentan una característica: la elevación de la respiración, que coincide con los evidentes cambios de color, gusto y textura, asociados a la maduración. A este aumento de la respiración se le llama climaterio y a los frutos que exhiben este incremento en la tasa respiratoria en la parte final de la maduración se les llama frutos climatéricos (Fennema, 1985; Martínez-Castellanos, 2009).

Durante las fases finales del crecimiento celular del fruto, la respiración de los frutos disminuye a valores muy bajos ; sin embargo es seguido por un incremento de cuatro a cinco veces en la tasa con la llegada de la maduración de consumo, denominado pico respiratorio o climatérico. Posteriormente la respiración disminuye en el periodo post climatérico o senescencia (Kays, 1991, Martínez-Castellanos, 2009)). Los frutos climatéricos se caracterizan también por que la síntesis de etileno que se incrementa en respuesta a la exposición a bajos niveles de esta hormona (producción autocatalítica de etileno).

### 2.3.3. Frutos no climatéricos

Se conoce como frutos no climatéricos a aquellos donde el climaterio respiratorio no ocurre. Estos frutos mantienen una tasa respiratoria relativamente baja durante la maduración de consumo.

## 2.4. *Litchi (Litchi chinensis Sonn)*

El litchi (*Litchi chinensis Sonn*) es un fruto tropical y subtropical que es comúnmente exportado debido a su atractivo color y exótico sabor.

### 2.4.1. Origen y distribución

El litchi es un fruto nativo de las zonas subtropicales del sudeste de Asia. Algunas fuentes consideran como centro de origen la provincia de Cantón, en el



sur de China, otras también mencionan como origen a Vietnam del Norte (Aserca-Ciestaam, 1996).

La escasa viabilidad de la semilla del litchi, limitada a muy pocos días, y la dificultad para obtener nuevas plantas a partir de ella explican que el litchi haya permanecido durante muchos siglos en su área de origen. Al continente americano la fruta llegó a través de Hawaií, donde el chino Ching Check la introdujo en 1873. El productor más famoso de litchi es hasta la fecha el reverendo W.M. Brewster, quien entre 1903 y 1906 se dedicó a la selección de cultivares de litchi en la península de Florida. Este es el cultivar más difundido en EUA y México (Aserca-Ciestaam, 1996).

#### 2.4.2. Familia botánica

El litchi (*Litchi chinensis* Sonn) pertenece a la familia de *Sapindaceae*, que comprende 140 géneros y 1,500 especies. A esta familia pertenecen tres especies más que son de interés comercial:

Longan (*Dimocarpus longan* ssp. longan)

Rambután (*Nephelium lappaceum* L.)

Pulusán (*Nephelium matabile* Blume)

Todos ellos son nativos del Sudeste de Asia.

Existen tres subespecies de litchi:

*Litchi chinensis* Sonn., ssp. *chinensis*, de importancia internacional.

*Litchi chinensis* Sonn., ssp. *philippensis* (Radlk.) Leenh., se encuentra en Filipinas y tiene frutos no comestibles.

*Litchi chinensis* Sonn., ssp. *Javanensis* Leenh., es ocasionalmente cultivado en Indochina y en el Oeste de Java y tiene frutos similares al ssp. *chinensis* (Aserca-Ciestaam, 1996).



### 2.4.3. El fruto

Los frutos son producidos en grupos sueltos, desde 2-30. Es importante que estos maduren en el árbol, para alcanzar un mejor sabor, para lo cual son necesarios de 60 a 90 días después de la floración. La estación de producción en Florida y México, va de mediados de mayo a principios de julio, dependiendo de la variedad y de la zona productora.

El fruto de litchi es una drupa de forma redonda, ovoide, acorazonada e incluso arriñonada. Su tamaño es variable según cultivares pero llega a alcanzar hasta 5 cm de largo y hasta 4 cm de diámetro; con un peso entre 12 y 25 g. La cubierta externa del fruto (pericarpio) es delgada, coriácea, dura y quebradiza, es verde en el fruto inmaduro pero adquiere un color rojizo brillante e incluso es amarilla o verde en algunos casos. Esta cubierta posee protuberancias angulares poco pronunciadas. Cuando comienza a secarse, la piel cambia a un color marrón sucio y se torna mucho más quebradiza. Ello sucede rápidamente incluso con el fruto perfectamente comestible. Es una fruta altamente perecedera y delicada y su calidad puede deteriorarse rápidamente si no se almacena debidamente, especialmente en un lugar seco y fresco.

La parte comestible de la fruta es una estructura denominada botánicamente arilo, se forma a partir de las células que deviene meristemáticamente en el fonículo (pendúnculo de la semilla) y en la parte exterior de las túnicas exteriores. El arilo tiene su pulpa de color normalmente blanco, en algunos casos tendiendo a rosado, con una consistencia jugosa y con un aroma agradable, subácido-dulce.

La semilla, brillante, marrón oscura, casi café es de forma ovoide a oblonga midiendo entre 1y 2 cm de longitud y entre 6 y 12 mm de ancho. Comprende aproximadamente, el 10-18% del peso del fruto (10-35 g) según cultivares. Las semillas abortadas “semillas lengua de pollo” son pequeñas y arrugadas, no viables y representan en este caso cerca del 4% del peso del fruto. Los frutos con semilla abortadas son un poco más pequeños de los de semilla normal, ocupando



el arilo hueco dejado por aquella. En consecuencia son preferidos, pues contienen una mayor proporción de pulpa (Aserca-Ciestaam, 1996).

#### *2.4.4. Composición de fruto*

Los estudios que se han realizado sobre la composición del fruto indican que su principal constituyente es el agua que representa entre el 76 y 87% del peso de la pulpa. Su contenido de proteína es bastante bajo y usualmente comprendido entre el 0.8 y el 0.9% pudiendo llegar a 1.5%. La pulpa contiene cantidades significativas de grasas, con valores situados entre 0.5 y 1.6%. Su contenido de azúcar (azúcares reductores y sacarosa), es muy variable según variedad pero oscila entre el 11.8 y el 20.6%. El litchi es un fruto no climatérico, por lo que el contenido total de sólidos solubles no aumenta tras la recolección. La acidez es bastante variable según cultivares, registrándose valores entre 0.20 y 1.1% de acidez total. Como en la mayoría de los frutos el valor decrece conforme avanza el proceso de maduración e incluso el almacenaje. El litchi tiene un valor calórico en tomo a las 65 calorías por cada 100g y es una fuente apreciable de vitamina C, pero las cantidades difieren mucho entre cultivares y varían entre 40.2 y 90 mg. El litchi no es una fuente apreciable de tiamina, riboflavina, calcio, fósforo o hierro, aunque contiene cantidades importantes de potasio. Carece totalmente de vitamina A y provitamina A y sólo algunos cultivares son buena fuente de niacina (Aserca-Ciestaam, 1996).

#### *2.4.5. Manejo poscosecha de la fruta fresca*

La vida natural de la fruta de litchi, sin empaque es de menos de 72 horas a una temperatura ambiente entre 17 y 21 grados centígrados. La desecación ocurre durante el transporte, va acompañada de una pérdida del color rojo en la cáscara, desarrollándose en su lugar un color marrón, debido a la oxidación de los polifenoles. La vida de anaquel y la calidad de la fruta también varían de acuerdo a la variedad a la que pertenezcan, así en Estados Unidos, las frutas de la variedad Brewster se han conservado perfectamente bien por más de un año sin perder su color y sabor. A nivel mundial existe un gran número de estudios científicos que se han realizado con el fin de encontrar un método eficaz en la preservación del



color, textura y sabor del litchi durante el mayor tiempo posible, después de haber sido cosechado (Aserca-Ciestaam, 1996).

#### *2.4.6. Recomendaciones para el manejo poscosecha.*

Entre los tratamientos más utilizados para conservar el litchi se ubica el control de la temperatura. Entre los diferentes procedimientos que existen sobresalen los siguientes:

El almacenamiento de los frutos en refrigeración (7°C), con una humedad relativa entre 85 y 90%, puede conservar el litchi de 4 a 6 semanas; es posible incrementar el tiempo de conservación a 2 meses si los frutos se introducen a una solución de tiourea (5%), depositándolos después en bolsas de vinilo a una temperatura de 8°C. (Aserca-Ciestaam, 1996).

El preenfriado de la fruta (con agua o aire) y transporte refrigerado (0 a 2°C) una humedad relativa entre 85 y 90%, conserva la apariencia del litchi durante más tiempo (10 semanas) (Aserca-Ciestaam, 1996).

El empaque de los frutos en bolsas de plástico no perforadas a temperatura entre 2 y 10°C puede conservar tanto el color como otros atributos del fruto en perfectas condiciones durante un mes (Aserca-Ciestaam, 1996).

#### *2.4.7. Factores que afectan la calidad comercial del litchi*

Entre las características deseables que buscan en los frutos de litchi se encuentran peso elevado, forma redonda, alta aptitud para la conservación, corto periodo para la maduración, época de madurez apropiada y una larga vida comercial (Tabla 2). Se desea que en la cáscara exista un lento oscurecimiento después de la recolección, grosor, consistencia, resistencia a plagas y enfermedades así como semilla pequeña, alta proporción de semillas abortadas, y fácil desprendimiento, agradable sabor y consistencia del arilo (Tabla 3) (Galán-Sauco, 1987).



Tabla 2.- Características deseables en la fruta de litchi (Fuente: Galán-Sauco ,1987.)

<b>Característica</b>	<b>Descripción</b>
<b>Peso</b>	Se debe buscar un peso elevado de 25g
<b>Forma</b>	La forma redonda es la más eficiente ya que facilita el embalaje, aunque la ovoide y ligeramente acorazonada pueden seleccionarse.
<b>Aptitud para conservación</b>	Principalmente por congelación, que es el método más común para la conservación
<b>Periodo de maduración</b>	Para facilitar la recolección y disminuir los costos, entre más homogénea y corta sea la maduración de los frutos es mejor.
<b>Época de madurez</b>	Esta depende del hemisferio donde se encuentre la plantación, siendo predilectas las variedades precoces y tardías.
<b>Vida comercial</b>	Cuanto mayor sea es más deseable.
<b>Semilla</b>	Seleccionar principalmente aquellos cultivares en donde la semilla sea pequeña y represente menos del 30% del peso del fruto.
<b>Semillas abortadas</b>	Alta proporción. Esta es de las características más deseables, ya que los frutos de este tipo no desmerecen en calidad.

Tabla 3.- Características deseables en la cáscara de la fruta de litchi (Fuente: Galán-Sauco)

<b>Color rojo brillante</b>	<b>Entre más atractivo sea es mejor.</b>
<b>Oscurecimiento de la piel</b>	Lento oscurecimiento tras la recolección. Con esto se evitara la necesidad de refrigeración inmediata.
<b>Grosor y consistencia</b>	Facilita una mejor protección en la fase de recolección-consumo y el pelado.
<b>Resistencia</b>	A plagas y enfermedades. Esto es importante en la piel como en la totalidad del árbol.
<b>Resistente al rajado y sol</b>	Más resistente fundamentalmente a extremos de humedad y temperatura.
<b>Arilo y piel</b>	Fácil desprendimiento. De vital importancia para facilitar el consumo
<b>Sabor y consistencia del arilo</b>	Se deben preferir los frutos ligeramente aromáticos de sabor dulce o ligeramente agridulce, incluso antes de la madurez, de textura crujiente y no excesivamente acuosos.



## 2.5. Antocianinas

Estos compuestos, al igual que los flavonoides y las betalainas, son pigmentos hidrosolubles con características de glucósidos; están constituidos por una molécula de antocianidina, que es la aglucona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. La estructura química básica de estas agluconas es el ion flavilio que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B) (fig. 2); por su posición trivalente del oxígeno, el flavilio normalmente funciona como un catión. Los hidratos de carbono que comúnmente se encuentran son la glucosa y la ramnosa, seguidos de la galactosa, la xilosa y la arabinosa, y ocasionalmente, la gentiobiosa, la rutinosa y la soforosa; todos ellos se unen a la antocianidina por medio de un hidroxilo de la posición 3, y en un segundo término, de la 5 o de la 7. Cuando en una misma molécula se encuentran dos azúcares, éstos se localizan en los hidroxilos 3 y 5, produciendo una estructura que generalmente es más estable que cuando sólo contienen un solo monosacárido (Badui,1994).

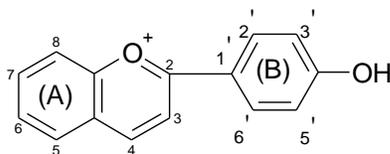
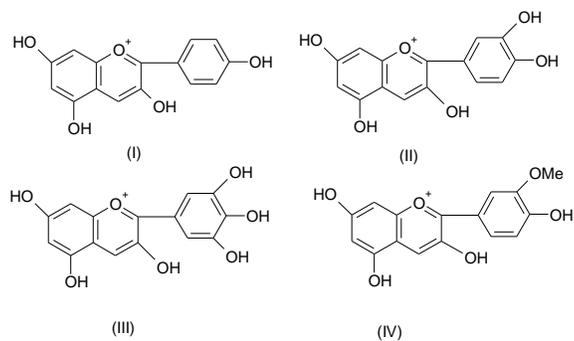


Figura 2.- Grupo Flavilio

De todas las antocianinas que actualmente se conocen, las más importantes son pelargonidina, delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (fig. 3). Es muy común que una misma antocianidina interactúe con más de un hidrato de carbono para formar diferentes antocianinas (Badui,1994).

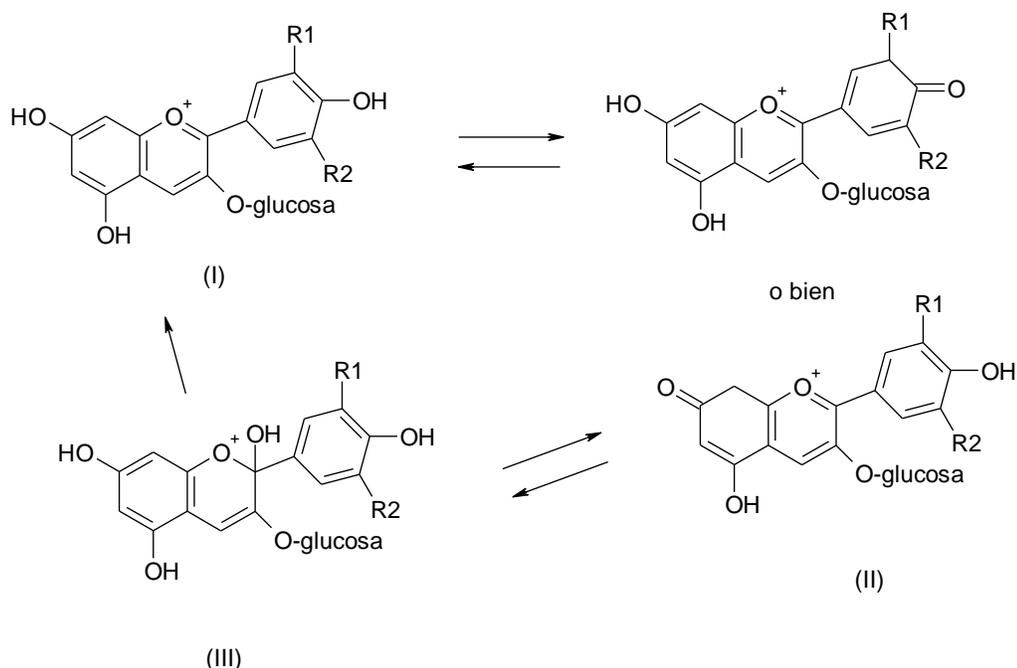


**Figura 3.- Antocianidinas, I: Pelargonidina, II: Cianidina, III: Delfinidina y IV: Peonidina**

### 2.5.1. Estabilidad de las antocianinas

El color de las antocianinas depende de varios factores intrínsecos, como lo son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; por ejemplo, si se aumentan los hidroxilos del anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de metoxilos provoca la formación de los rojos (Badui, 1994).

Debido a una deficiencia del núcleo de flavilio, el color de las antocianinas depende de las condiciones de acidez o alcalinidad del sistema en que se encuentran: a pH ácidos adquieren una estructura estable de catión flavilio rojo (I), cuando se incrementa el pH, la distribución electrónica se modifica hasta llegar a la formación quinoidea azul (II); la hidratación del flavilio produce la base carbinol incolora (III) (fig. 4). Los cambios fisiológicos en la maduración de los frutos lleva consigo alteraciones en el pH, y por tanto, modificaciones en el color del tejido vegetal (Badui, 1994).



**Figura 4.- Reacciones de transformación estructural de las antocianinas en el intervalo de pH de 1 a 7. A valores de pH bajos se encuentra en forma de flavilio (I) de color rojo; a pH mayores de 5 se produce la base anhidra (II) de color púrpura. Tanto la sal de flavilio como la base anhidra pueden convertirse a la base de carbinol (III) incolora, que predomina en el intervalo de pH de 4 a 5 (Badui, 1994).**

El tratamiento térmico influye en la degradación de las antocianinas; se ha visto que en las fresas se presenta una relación logarítmica entre la pérdida del color y la temperatura. La figura 5 muestra la degradación de las antocianinas del jugo de uva calentado en diferentes condiciones y almacenado posteriormente; se puede observar una gran diferencia entre la absorbancia del control y los productos tratados térmicamente. Así como ocurre con las antocianinas y otros pigmentos, los sistemas de alta temperatura-corto tiempo son más adecuados para conservar el color de los alimentos; esto se debe a la diferencia de los valores de  $z$  y de  $D_{121}$  para los microorganismos y las antocianinas.

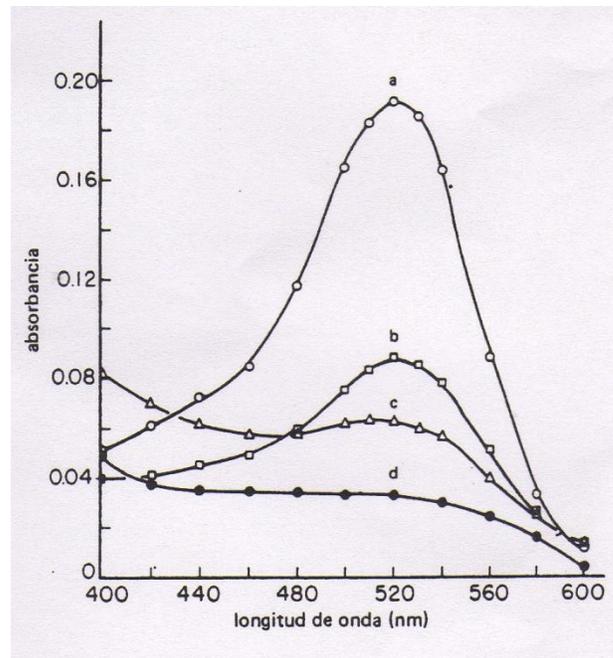


Figura 5.- Curva espectrofotométrica de la degradación de las antocianinas del jugo de uva durante el almacenamiento: a) control sin calentar, b) calentado a 99 °C por 1h, c) calentado a 99 °C por 2h y d) jugo de uva comercial (Badui, 1994).

Las antocianinas cambian de color cuando forman complejos, quelatos o sales con iones de sodio, potasio, calcio, magnesio, estaño, hierro o aluminio, con estos dos últimos producen coloraciones azules, sobre todo con aquellas que tienen dos grupos en posición orto; por esta razón, se recomienda que las latas que se empleen para los alimentos que contengan antocianinas, se recubran con una laca protectora que evite el desprendimiento de los metales indeseables. También hay que tener en cuenta las sales y los minerales propios del agua empleada en la preparación industrial de frutas y hortalizas (Badui, 1994).

Dada su alta hidrosolubilidad, estos pigmentos se pueden perder fácilmente por lixiviación en el agua que se utiliza en los diferentes tratamientos; a medida que aumente la temperatura se acelera la decoloración de las frutas (Badui, 1994).

Se ha visto que la degradación de las antocianinas va acompañada de la del ácido ascórbico, de tal manera que en muchos casos la oxidación de la vitamina C implica una decoloración. Estos pigmentos también se ven afectados



por la presencia de azúcares reductores, sobre todo de la fructosa; al parecer por el hecho de que el monosacárido en condiciones ácidas y a altas temperaturas se descompone en hidroximetil-furfural y en furfural, y estos ácidos son los que en realidad atacan a los pigmentos (Badui, 1994).

El oxígeno disuelto tiene un efecto negativo en la estabilidad de las antocianinas, sobre todo en las de productos como el vino, y para eliminarlo se llega incluso a utilizar la glucosa oxidasa, ya que lo consume durante la transformación de la glucosa en ácido glucurónico. Se recomiendan espacios de cabeza muy pequeños o envasar en atmósferas inertes para evitar los cambios de color en el almacenamiento (Badui, 1994).

El anhídrido sulfuroso y los sulfitos tienen un efecto decolorante sobre estos pigmentos pues se producen formas sulfónicas en las posiciones 2 y 4 que son incoloras (fig. 6). La reacción es reversible por lo que la eliminación de estos agentes con ácidos o mediante calor regenera la coloración. Estas formas sulfónicas ejercen paralelamente un efecto estabilizador sobre el enlace glucosídico y evitan la hidrólisis de la antocianina (Badui, 1994).

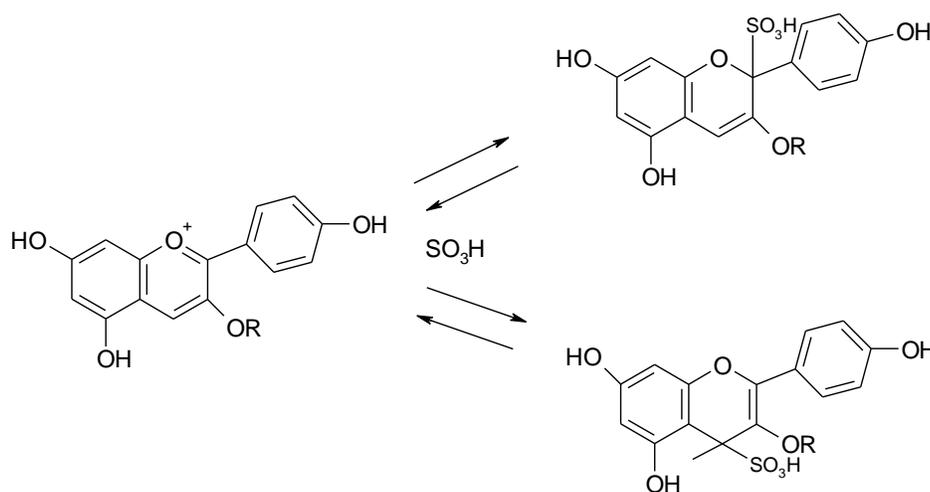


Figura 6.- Reacción del bisulfito con las antocianinas (Badui, 1994).

Las antocianinas también cambian de color cuando se forman complejos con otros compuestos fenólicos (proantocianidinas, catequinas, taninos y flavonoides) o con algunos polisacáridos, ya que se favorece un desplazamiento



de la absorción a longitudes de onda mayores. En ocasiones, con un alto contenido de taninos se producen grandes agregados poliméricos con tamaños y características coloidales que pueden llegar a sedimentar al cabo de un largo almacenamiento. Cuando esto sucede, se reduce la intensidad del color y se observa oscurecimiento incipiente, esto va acompañado de una reducción de la concentración de las antocianinas monoméricas y de un incremento en la producción de compuestos poliméricos, hasta llegar a la formación de sustancias con pesos moleculares de varios miles de daltones que son inestables en solución (Badui, 1994).

Otra causa de la pérdida de estas sustancias son las reacciones efectuadas por enzimas endógenas o las que provienen de microorganismos y que tienen actividades de  $\beta$ -glucosidasa (antocianidasas) que hidrolizan el enlace glucosídico en posición 3, produciendo la correspondiente aglucona, pero esta es más inestable que la antocianina de donde proviene, por lo cual su degradación es más rápida. Por tener estructuras fenólicas, son atacadas por las fenolasas; la peroxidasa las degrada rápidamente cuando existe catecol ya que éste, al transformarse en o-quinona, oxida estos pigmentos (Badui, 1994).

## **2.6. Fenoles**

Los compuestos fenólicos son metabolitos aromáticos del metabolismo secundario de las plantas que tienen una común estructura con un anillo aromático con por lo menos un grupo hidroxilo, el cual le da la habilidad de neutralizar especies reactivas que ayudan al cuerpo a protegerse del estrés oxidativo. Adicionalmente, los fenoles contribuyen al color y sabor de las frutas y han sido descritos como poseedores de actividad anticancerígena y antimutagénica. Varios estudios han mostrado que los compuestos fenólicos tienen un alto potencial antioxidante lo cual tiene un efecto benéfico en la salud humana (Gayosso-García, 2011).



Estos pigmentos son generalmente amarillos; no contribuyen de manera importante al color de los alimentos sin embargo si son responsables en gran medida de la astringencia de diversos productos. Normalmente los flavonoides son más estables al calor y a las reacciones de oxidación que las antocianinas y resisten la mayoría de los tratamientos térmicos que se emplean en la manufactura de los alimentos enlatados (Badui, 1994).

En el litchi, el oscurecimiento del pericarpio se ha relacionado con la degradación de las antocianinas y el ácido ascórbico, y con las actividades de las enzimas polifenol oxidasa y peroxidasa que actúan sobre los fenoles y pueden por lo tanto, acelerar la degradación de antocianinas, aumentando el número de subproductos de color oscuro a pardo (Underhill y Critchley, 1995; Jiang y col.,2004 ; Martínez-Castellanos, 2009).

## **2.7. Determinación del color**

El color depende de la aptitud para distinguir cambios de luz (eficiencia), del observador y de las características de la iluminación y reflectancia espectral de la sustancia problema. El color puede considerarse bajo tres aspectos: matiz, brillo y saturación. El matiz o clase del color se relaciona con la longitud de onda de la radiación que produce la estimulación óptica: el brillo es la medida del grado de dilución del matiz con el negro; y la saturación es la pureza del color o bien puede considerarse alternativamente como el grado de dilución con el blanco. Tanto el matiz como la saturación son difíciles de determinar y en consecuencia se utilizan técnicas instrumentales para medir la reflectancia del azul, verde y ámbar o la transmitancia de las sustancias transparentes (Lees, 1980).

Los valores triestímulo propuestos para X, Y, y Z por la “Commission International d’Eclairage” (CIE) han sido adoptados ampliamente. Estos valores aproximan la reflectancia al ámbar, luminoso y azul y definen la energía que produce el color visualizado. Los valores se representan en un sistema de coordenadas tridimensional. Si cada uno de los valores se divide por la suma de



los tres valores resultantes representan coordenadas bidimensionales de cromaticidad (Lees,1980).

Un colorímetro espectrofotométrico como el utilizado (Hunter-lab, Color Flex ® fig. 7) usa una fuente de luz para iluminar la muestra a medir. La luz reflejada o transmitida por el objeto pasa entonces a una red de difracción que la rompe en el espectro. El espectro cae en una matriz de diodos que mide la luz a cada longitud de onda. Los datos espectrales se envían entonces a un procesador donde se multiplican con los valores de la tabla de datos para el iluminante CIE y el observador a 2° o 10° seleccionado para obtener los valores X,Y, y Z. ( Hunter Lab, 2001).

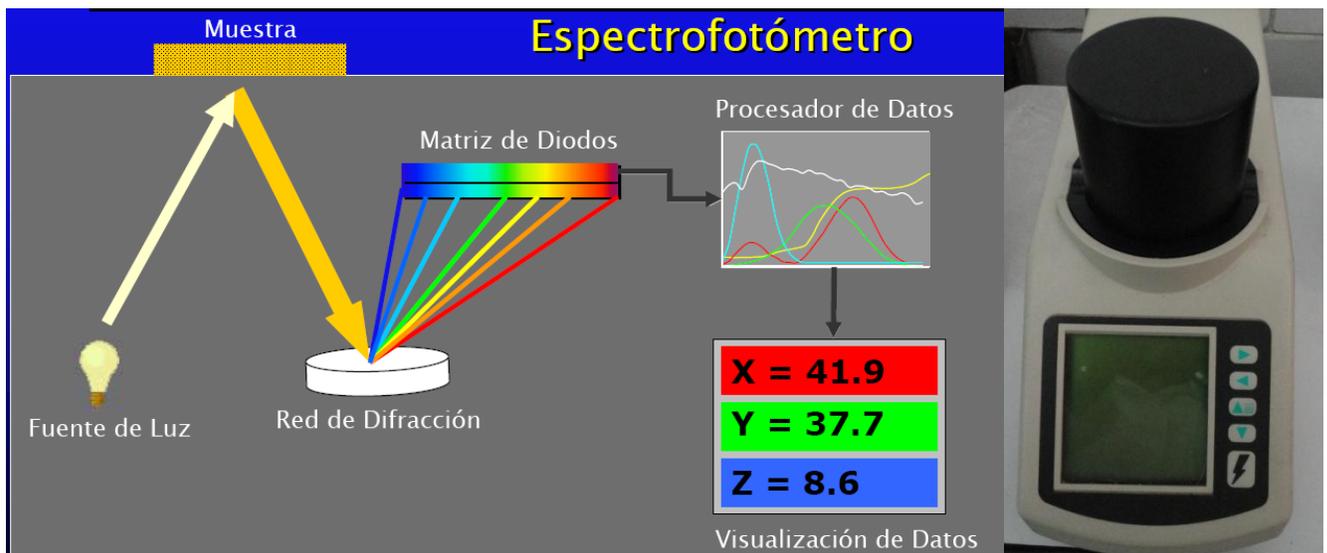


Figura 7.- Medida del color utilizando un colorímetro Hunter-Lab Color Flex ® (Hunter Lab, 2001)

El espacio del color Hunter L,a,b es un espacio de color rectangular de 3 dimensiones basada en la teoría de los colores opuestos. El eje L (Luminosidad), 0 es negro, 100 es blanco, el eje a (rojo-verde), los valores positivos son rojos; los valores negativos son verdes y 0 es el neutro, el eje b (azul-amarillo), los valores positivos son azules ; los valores negativos son amarillos y 0 es el neutro (fig. 8).

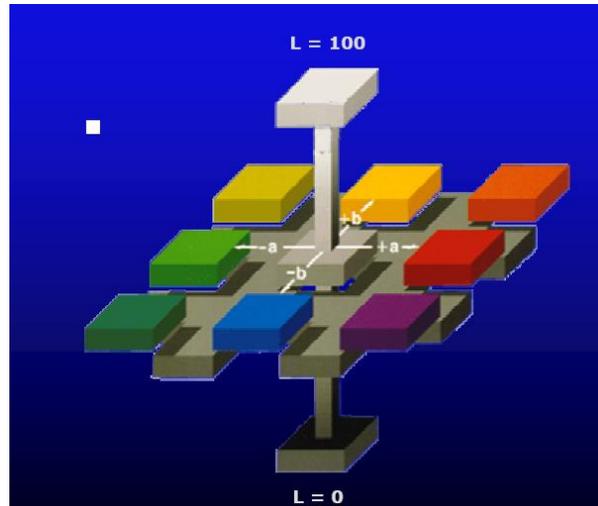


Figura 8.-Espacios de color Hunter L,a,b de un colorímetro Hunter-Lab Color Flex © (Hunter Lab, 2001)

Las dos escalas Hunter y CIE  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  emanan matemáticamente de los valores X,Y y Z, ninguna escala es normalmente uniforme, Hunter L,a,b se concentra en la región azul del espacio de color y CIE  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  se sobre expande en la región amarilla. La recomendación actual CIE es usar la CIE  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ .

## 2.8. Grados Brix

Representan el porcentaje de sacarosa determinado en el jugo del fruto. Se mide utilizando un brixómetro o un refráctometro para grados brix , las lecturas registradas están dadas a la temperatura indicada por estos instrumentos (Bosquez, 1999).

## 2.9. Sólidos solubles totales (SST)

Las frutas y hortalizas contienen otros sólidos solubles diferentes de la sacarosa, esto es, otros tipos de azúcares y también ácidos orgánicos, por lo que es más frecuente determinar el contenido total de éstos en porcentaje. Para ello se emplean instrumentos como el refractómetro de Abbe.



Frecuentemente se consideran a los °Brix como equivalentes de los SST por qué el mayor contenido de los sólidos solubles en el jugo de las frutas son azúcares, sin embargo es más preciso realizar las correcciones pertinentes a las lecturas registradas con los brixómetros para obtener datos reales en términos de SST. También deben hacerse correcciones por la temperatura a la cual se realice la determinación (Bosquez, 1999).

### **2.10. Acidez Titulable (AT)**

La mayoría de las frutas son particularmente ricas en ácidos orgánicos que están usualmente disueltos en la vacuola de la célula, ya sea en forma libre o combinada como sales, ésteres, glucósidos, etc. La acidez libre (acidez titulable) representa a los ácidos orgánicos presentes que se encuentran libres y se mide neutralizando los jugos o extractos de frutas con una base fuerte, el pH aumenta durante la neutralización y la acidez titulable se calcula a partir de la cantidad de base necesaria para alcanzar el pH del punto final de la prueba, en la práctica se toma como punto final pH= 8 usando fenolftaleína como indicador. Bajo estas condiciones, los ácidos orgánicos libres y sólo una parte del ácido fosfórico y fenoles están involucrados en el resultado final. Para reportar la acidez, se considera el ácido orgánico más abundante del producto vegetal, el cual varía dependiendo de la especie de que se trate, por lo que el resultado se expresa en términos de la cantidad del ácido dominante (Bosquez, 1999).

### **2.11. Relación SST/Acidez.**

Desde el punto de vista práctico, los azúcares y la acidez son componentes muy prácticos en poscosecha y la relación que guardan constituye un índice, incluso existen normas que lo relacionan con el estado de madurez para la cosecha de cítricos y uvas.



Cabe mencionar que este tipo de indicadores son sencillos, precisos y confiables que permiten determinar el estado de madurez adecuado para la cosecha, pueden emplearse como referencia del estado de madurez poscosecha y también como información objetiva relacionada con la calidad (Bosquez, 1999).



### 3. ANTECEDENTES

En la preparación de películas a base de biopolímeros con actividad antibacteriana y propiedades de barrera a la humedad, la eficiencia antibacteriana del quitosano ha llevado a que muchos investigadores estudien variaciones en la formulación de películas y recubrimientos así como la modificación de los métodos de preparación y el uso de aditivos como lo son los plastificantes.

En un estudio previo, Coma y col. en el 2003 realizaron empaques basados en derivados solubles de celulosa a fin de disminuir su sensibilidad al agua especialmente cuando se utiliza este material en alimentos. Se realizó un entrecruzamiento entre la hidroxipropil metil celulosa y el ácido cítrico probando diferentes concentraciones. El entrecruzamiento del polímero hidrofílico mostro una fuerte influencia en su solubilidad al agua y una mejora en su permeabilidad al vapor de agua cercana al 34%.

Plascencia en el 2004 obtuvo películas antimicrobianas de quitosano. En su trabajo probó sorbitol y glicerol como plastificantes, deduciendo que la adición del 17% de sorbitol proporciona mejores características de flexibilidad, elasticidad y maleabilidad. Así mismo encontró que al combinar el biopolímero con bajas temperaturas éste muestra una alternativa para la conservación de productos alimenticios con mayor resistencia al ataque de hongos saprófitos.

Moller y col. en el 2004 prepararon películas a base de quitosano e HPMC asociados con lípidos y modificados mediante una reacción de entrecruzamiento con ácido cítrico. El entrecruzamiento entre el quitosano y el HPMC en una proporción 50:50 usando ácido cítrico y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y un tratamiento térmico de  $190^\circ\text{C}$  por 15 min , mostró una reducción de solubilidad en agua del 40% así como una mejora en la reducción de la transferencia de vapor de agua del 40%.

Alonso y col. en el 2009 realizaron un entrecruzamiento de Quitosano con fibras de celulosa con la adición de ácido cítrico empleando  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  como catalizador y un tratamiento térmico en horno a  $130^\circ\text{C}$  por tres minutos a fin de conferir propiedades antimicrobianas a las fibras de celulosa. El análisis



termogavimétrico del material con el mayor contenido de quitosano mostro un incremento en la estabilidad térmica comparado con el quitosano y la celulosa por separado. Así mismo se observo que un tratamiento previo de las fibras de celulosa con radiación UV aumenta la incorporación de quitosano a la matriz celulósica. El material obtenido mostró un decremento significativo en el porcentaje de biomasa y germinación de esporas de *Penicillium chrysogenum* y en las unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* comparado con la fibra de celulosa cruda y similarmente a una fibra comercial de celulosa con efecto antimicrobiano.

Atáres y col. en el 2010 caracterizaron películas a base de HPMC y probaron la eficiencia de tres aditivos: ácido ascórbico, ácido cítrico y aceite esencial de jengibre comparados con recubrimientos libres de antioxidantes. El efecto de entrecruzamiento entre las matrices que contenían ácido ascórbico o cítrico fue detectado mediante el análisis de microestructura, comportamiento mecánico y propiedad barrera contra oxígeno y vapor de agua. Estas películas fueron las más eficientes protectores contra la oxidación esto debido a su hermética y antioxidante estructura guiada a una baja permeabilidad al oxígeno.

En el 2010, Montes elaboró películas a base de quitosano proveniente de pluma de calamar junto y HPMC unidos mediante una reacción de entrecruzamiento con ácido cítrico y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Se probaron 8 formulaciones con diferentes relaciones de solución de quitosano y HPMC en presencia y ausencia de 1% de sorbitol como plastificante. Se observó que la mezcla de quitosano-HPMC 1:1 ofrecía un material más termoresistente además de que aquellas que contenían sorbitol en la formulación mostraron ser beneficiadas en cuanto a elasticidad. Al aplicar esta formulación como película se observó un mayor porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Penicilium chysogenum* frente al uso de polietileno de baja densidad.

Por último, Martínez-Castellanos y col. analizarón las interacciones entre los agentes de control biológico, los recubrimientos y sus efectos sobre la calidad poscosecha de dos frutos: litchi y rambután. En el en el 2009, Martínez-



Castellanos y col. estudiaron el oscurecimiento de frutos de rambután (*Nephelium lappaceum*) para analizar el efecto de *Lb. plantarum* y quitosano en la retención de la calidad de estos frutos. Los frutos de rambután fueron recubiertos con quitosano y *Lb. plantarum* y se almacenaron a 10° y 25 °C con 75±2% de humedad relativa durante 15 y 10 días. El desarrollo de los microorganismos fue evidenciado por un análisis de viabilidad y la producción de ácido láctico. La aplicación de *L. plantarum* mejoró significativamente la retención del color ( $a^*$  y  $L^*$ ) y redujo la pérdida de peso. Los lactobacilos solos o en combinación con quitosano preservaron la calidad de los frutos como firmeza, sólidos solubles totales y acidez titulable; así mismo, la aplicación de los lactobacilos produjo acidificación en el pericarpio evitando el oscurecimiento. Posteriormente en el 2011, Martínez-Castellanos y col. complementaron el estudio e investigaron el efecto de *Lb. plantarum* en la preservación del color y la calidad del litchi (*Litchi chinensis* Sonn). Los frutos tratados mostraron una significativa reducción en la pérdida del color ( $a^*$  y  $L^*$ ) en comparación de aquellos donde no se aplicaron las bacterias. De igual manera, el contenido de cianidina-3- rutinosido y las antocianinas totales corroboró la retención del color, ya que aquellos frutos tratados con *Lb. Plantarum* mostraron significativamente ( $\alpha < 0.05$ ) una mayor concentración de pigmentos que el control. Por último se determinó una alta concentración de compuestos fenólicos en la corteza de los frutos tratados.

Con base a lo anterior y debido a que el entrecruzamiento entre quitosano y HPMC ha mostrado características y aplicaciones interesantes, el presente trabajo muestra una alternativa más en la elaboración de nuevos materiales plásticos donde, las propiedades biológicas y biodegradables de dichos polímeros son explotadas aplicándolas a un producto vegetal como lo es el litchi (*Litchi chinensis* Sonn).



## 4. JUSTIFICACIÓN

Debido a que actualmente existe un incremento en la demanda de alimentos que proporcionen seguridad, alta calidad microbiológica y una larga vida de anaquel, la elaboración de empaques con actividad antimicrobiana tiene como principal objetivo disminuir el deterioro de los alimentos por contaminación superficial por lo que en este sentido el elaborar películas a base de quitosano, un polímero biodegradable, no tóxico, renovable y que tiene la capacidad de inhibir la actividad antimicrobiana disminuye riesgos en la salud y el medio ambiente.



## 5. OBJETIVOS

### **Objetivo general**

Preparación y caracterización de películas de quitosano funcionalizadas con HPMC, entrecruzante y catalizador grado alimenticio.

### **Objetivo específicos**

- 1.- Obtención de  $\beta$ - quitina a partir de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) y quitosano.
- 2.- Caracterización química del quitosano obtenido de  $\beta$ -quitina de pluma de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).
- 3.- Establecimiento de las condiciones de funcionalización de quitosano con ácido cítrico y HPMC (Q-C-HPMC) para la elaboración de películas.
- 4.- Caracterización físico-mecánica de películas de Q-C-HPMC.
- 5.- Determinación de permeabilidad al vapor de agua de películas de Q-C-HPMC.
- 6.-Evaluación del efecto de la formulación de Q-C-HPMC para la conservación del litchi (*Litchi chinensis Sonn*) CV Brewster.



## 6. HIPÓTESIS

La funcionalización química del quitosano con hidroxipropil metil celulosa (HPMC) mediante un agente de entrecruzamiento de grado alimenticio (ácido cítrico) permitirá obtener materiales nuevos con propiedades mecánicas y químicas superiores.



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada se resume en la figura 9. En la primera etapa se realizó la extracción y caracterización de  $\beta$ -quitina a partir de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) (Rocha-Pino y col., 2008), mientras que en la segunda parte se obtuvo quitosano a partir de la  $\beta$ -quitina extraída en la etapa anterior. En la tercera y cuarta etapa se elaboraron películas de quitosano, ácido cítrico y HPMC para su posterior caracterización. En la quinta y sexta etapa se determinó la cantidad de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  como catalizador de la reacción de entrecruzamiento y su correspondiente caracterización. En la última etapa se hizo un estudio sobre el efecto en la conservación y calidad poscosecha de *Litchi chinensis Sonn* de la formulación elegida de Q-C-HPMC.

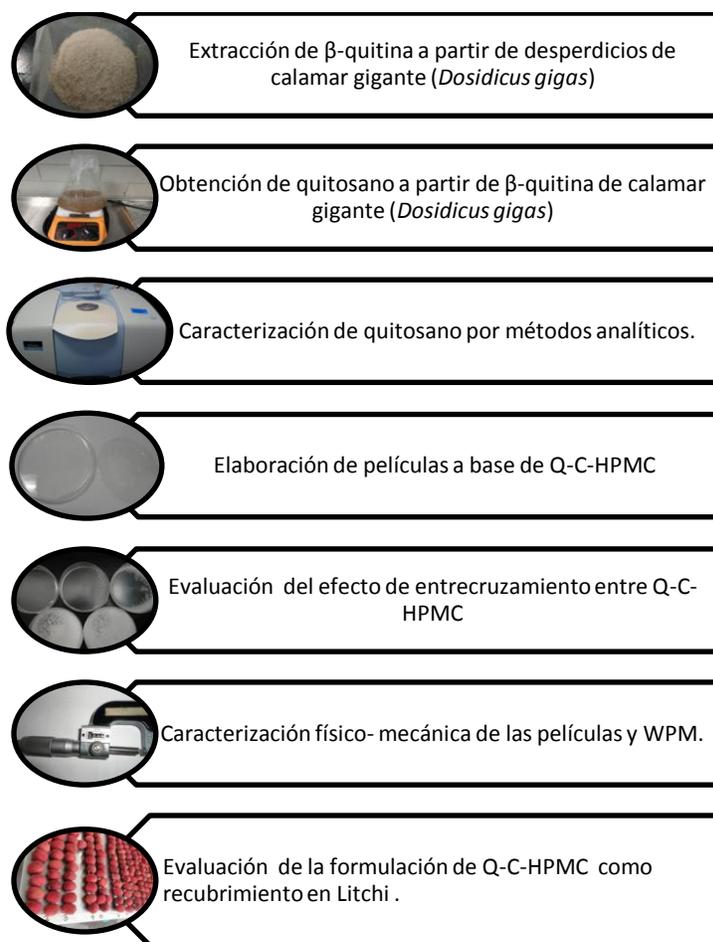


Figura 9.- Desarrollo experimental de la preparación y caracterización de los materiales con base a quitosano y HPMC.



## **7.1. Materiales**

### *7.1.1. Pluma de calamar gigante, *Dosidicus gigas**

Se utilizó pluma de calamar gigante, *Dosidicus gigas* proveniente del Golfo de California donada por la empresa Bona pesca S.A. de C.V. de Mazatlán, Sinaloa. Estas muestras fueron secadas al sol y molidas en un molino industrial (Thomas-Scientific EUA) con criba de 2 mm de diámetro. Por efectos de tamaño de partícula, la pluma de calamar fue molida nuevamente utilizando un molino casero (Belt-Art products USA) para pasar por una criba de 0.5mm de diámetro.

### *7.1.2. Material biológico*

Se utilizó litchi (*Litchi chinensis Sonn*) CV Brewster proveniente del Istmo de Tehuantepec en el Estado de Oaxaca cosechada en el mes de Mayo del 2011.

### *7.1.3. Reactivos*

#### *7.1.3.1. Obtención de quitosano y preparación de películas*

Ácido clorhídrico A.C.S. (Reactivos Química Meyer, Lote: C0109018). Hidróxido de sodio grado industrial (Casa Miyako, México). Ácido acético glacial CH<sub>3</sub>COOH (J.T. Baker, Lote: H29C56). Acetato de sodio Anhídrido (J.T. Baker, Lote: H35C06). Agua deuterada (Sigma). Ácido cítrico monohidratado granular (J.T. Baker, Lote: E32C04). Sorbitol (J.T. Baker, Lote: C01592). Fosfato de sodio Monobásico, Monohidratado, Cristal (J.T. Baker, Lote: C03C11). Hidroxipropil metil celulosa HPMC (Derivados macroquímicos S.A. de C.V. DEMACSA, Lote: 438/05). Alcohol Etílico Absoluto A.C.S. (Reactivos Química Meyer Lote: B1210692). Polietilenglicol-600 Diácido (Fluka, Lote: 81324). Acido fosfórico H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (J.T. Baker, Lote: V02C56). Metanol anhidro (J.T. Baker, Lote: K01C52).

#### *7.1.3.2. Otras determinaciones*

Para las determinaciones realizadas se preparan los reactivos de acuerdo a las metodologías utilizadas.



## **7.1. Métodos**

### *7.2.1. Extracción de $\beta$ -quitina*

Se realizó la extracción de  $\beta$ -quitina a partir de desperdicios de pluma de calamar gigante (*Dosidicus gigas*) de acuerdo al método reportado por Rocha-Pino y col. (2008), el cual consistió en una etapa de desmineralización y desproteinización.

La desmineralización de la pluma de calamar se llevó a cabo utilizando una solución acuosa de HCl (1M) en una relación 1:15 (p/v) durante 12 h a 25°C.

Una vez concluida la reacción la muestra fue lavada con agua corriente hasta su completa neutralización. La muestra fue secada a temperatura ambiente en una campana de extracción durante 12 h. El rendimiento de la  $\beta$ -quitina cruda obtenida después de la desmineralización fue determinado con respecto a la pluma de calamar en base seca.

Una vez desmineralizada la  $\beta$ -quitina cruda, ésta fue tratada con una solución de NaOH (2M) en una relación 1:15 (p/v) durante 12 h a 25°C para posteriormente lavar con agua corriente hasta su completa neutralidad. La muestra fue secada a temperatura ambiente en una campana de extracción durante 12 h. El rendimiento de quitina fue determinado con respecto a la pluma de calamar en base seca.

### *7.2.2. Preparación de quitosano por desacetilación homogénea*

La  $\beta$ -quitina obtenida fue tratada con NaOH al 65% (p/v) en una relación 1:15 (p/v) durante 3 días a 25°C con agitación a 200 rpm. El quitosano obtenido fue lavado con agua corriente hasta su completa neutralidad (Kurita y col., 1993).



### 7.2.3. Caracterización de quitosano por métodos analíticos

#### 7.2.3.1. Espectrometría de infrarrojo.

Se realizó espectrometría de infrarrojo medio para el análisis del quitosano obtenido por desacetilación homogénea. Se utilizó un espectro de infrarrojo (Perkin Elmer ATR-FTIR 100) en el cual el quitosano se colocó cuidadosamente sobre el diamante para realizar el espectro correspondiente a un intervalo de número de onda de  $650\text{cm}^{-1}$  hasta los  $4000\text{cm}^{-1}$  (Duarte, 2002). Se realizó 16 escaneos para cada espectro.

#### 7.2.3.2. Determinación del contenido de insolubles de quitosano en ácido acético (0.1M)

El contenido de insolubles se llevó a cabo de acuerdo a la metodología reportada por Kasaii y col. (2000). Se determinó por diferencia de peso al disolver 0.5% (p/v) de  $\beta$ -quitosano en una solución de ácido acético 0.1 M. La solución se dejó en agitación durante 24 h a 200 rpm para posteriormente filtrarla y llevarla a peso constante.

#### 7.2.3.3. Determinación de peso molecular promedio por viscosidad ( $M_w$ )

Se determinó el peso molecular del quitosano mediante viscosidad intrínseca con concentraciones de 0.5, 1, 1.5, 2 y 4 g/L en ácido acético 2% (v/v)/ acetato de sodio 0.2 M. Las soluciones fueron analizadas utilizando un viscosímetro de Ostwald a  $25^\circ\text{C}$ . Se determinó el tiempo que tarda la solución en recorrer el capilar y así determinar la viscosidad intrínseca como se explica en el anexo 13.2, utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (2):

$$[\eta] = KM_w^a \quad (2)$$



donde  $K$  es  $1.38 \times 10^{-5}$  L/g;  $a$  es 0.85;  $\eta$  es viscosidad intrínseca (Kjoniksen y col., 1997)

#### 7.2.3.4. Determinación del grado de acetilación (DA)

El grado de acetilación fue determinado por medio de resonancia magnética nuclear, donde el quitosano fue disuelto en una solución de HCl/D<sub>2</sub>O al 20% con agitación magnética durante 12 h. Se utilizó un espectrómetro Broker AC 200 a 200 MHz para <sup>1</sup>H a 298 °K de acuerdo a la metodología reportada por Hirai y col. (1991).

#### 7.2.4. Preparación de películas a base de Q-C-HPMC.

##### 7.2.4.1 Preparación de disolución de quitosano.

Quitosano en polvo de peso molecular medio (461.3 KDa) y grado de acetilación del 13.34±0.61% fue disuelto en solución de ácido acético la cual fue disminuida de su concentración original (Montes, 2010) de 0.2 M a 0.1 M. La disolución obtenida con concentración de 1g/L, se mantuvo bajo agitación magnética a 25° C durante 24 h. Después de este tiempo se agregó lo correspondiente a ácido cítrico de acuerdo al tipo de formulación (tabla 4), 37.5 g de fosfato de sodio monobásico y 10 g de sorbitol.

Tabla 4.- Formulaciones con diferentes concentraciones de ácido cítrico.

<b>Formulación</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>Ac. Cítrico (g/L)</b>	75	50	25	5	2.5



*7.2.4.2. Preparación de disolución de hidroxipropil metil celulosa (HPMC).*

Se preparó una disolución con 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 bajo agitación a 25° C durante 2 h.

*7.2.4.3. Preparación de películas*

La preparación de películas de quitosano con HPMC se llevó a cabo utilizando el método de evaporación de disolventes. Las películas de quitosano se prepararon con 20 g de solución formadora de película (1:1 v/v disolución quitosano (7.2.4.1)/HPMC (7.2.4.2)) y se dejaron en agitación magnética a 25° C durante 30 min.

*7.2.4.4. Reacción de entrecruzamiento y formación de película por evaporación de disolventes*

La solución formadora de película fue vertida sobre placas de poliestireno de 9 cm de diámetro y tratada térmicamente a 100±110°C durante 3 min, posteriormente las películas fueron secadas en estufa con una superficie previamente nivelada a una temperatura de 40-45 ° C durante 48 horas.

*7.2.5. Evaluación del efecto de entrecruzamiento entre quitosano-cítrico-HPMC*

Se evaluaron las formulaciones con las diferentes concentraciones de ácido cítrico (tabla 4) a fin de obtener la cantidad mínima necesaria requerida para que ocurra una reacción de entrecruzamiento entre éste, el quitosano y la HPMC.



7.2.5.1 Purificación de quitosano-cítrico-HPMC

Se precipito el quitosano presente en las películas ya formadas de acuerdo a la metodología que se muestra en la figura 10.

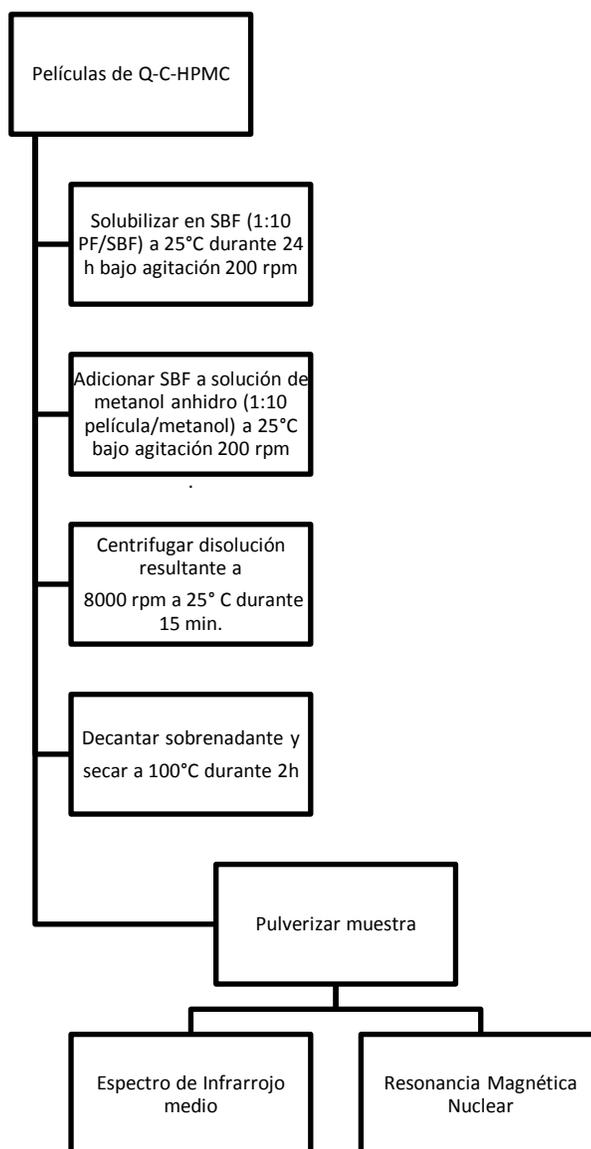


Figura.- 10 Metodología utilizada para purificar películas de Q-C-HPMC.



7.2.6. *Determinación de concentración de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> necesario para catalizar la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano, el ácido cítrico y la HPMC.*

La Formulación 2 (tabla 4) fue seleccionada para determinar la cantidad de fosfato de sodio monobásico, se probaron tres relaciones equimolares entre el ácido cítrico y el fosfato de sodio monobásico correspondientes a 1:0.75, 1:0.50 y 1:0.25 mol respectivamente (tabla 5).

Tabla 5.-Variación de concentración de fosfato de sodio monobásico con la formulación 2.

Formulación	2.1	2.2	2.3
	0.75 mol	0.50 mol	0.25 mol
Ácido cítrico	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
(g/L)	(g/L)	(g/L)	(g/L)
50	27.89	19.19	9.35

7.2.7. *Caracterización de las películas en cuanto a espesor, propiedades físico-mecánicas y permeabilidad al vapor de agua*

7.2.7.1. *Acondicionamiento*

Previamente a las mediciones, todas las muestras fueron acondicionadas en un desecador a una humedad relativa de  $44 \pm 1\%$  y una temperatura de  $25 \pm 1$  °C durante tres días con una solución saturada de Mg (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O.

7.2.7.2. *Medición de espesores*

Los espesores de las películas fueron obtenidos con un micrómetro (Mitutoyo, Japón) con una de sensibilidad de  $\pm 1 \mu\text{m}$ , Los espesores obtenidos fueron reportados como el promedio de por lo menos tres mediciones al azar en diferentes partes de la película.



#### *7.2.7.3. Propiedades físico - mecánicas*

Se determinaron las fuerzas de punción y extensión para las películas de Q-C-HPMC siguiendo procedimientos estándar. Para estas pruebas se utilizó una máquina de pruebas mecánicas SINTECH 1/S (MST, EUA) con una celda de carga de 100 N.

#### *7.2.7.4. Fuerza de fractura por tensión*

Las muestras se cortaron en tiras de 7 cm de largo por 10 mm de ancho las cuales fueron sujetadas con mordazas para medir su resistencia a la tensión. La muestra fue estirada a una velocidad de 100 mm/min hasta su fractura. Se hicieron repeticiones por triplicado. Se midió en tiempo real la fuerza de fractura en la tensión.

#### *7.2.7.5. Fuerza de fractura por punción*

Cada película de cada formulación fue sujeta con dos placas circulares de metal con un orificio central por el cual una punta de 0.0119 m de diámetro y de superficie lisa descendió verticalmente a una velocidad de 100 mm/min hasta penetrar la película. Las determinaciones se hicieron por triplicado midiendo en tiempo real la fuerza requerida para penetrar cada película.

#### *7.2.7.6. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)*

La permeabilidad al vapor de agua (WVP por sus siglas en inglés) se evaluó de acuerdo con el método gravimétrico sugerido por la ANFOR (Asociación Francesa de Normalización, ANFOR H00-030 y reportado por Martín-Polo y col. (1992) y Debeaufort y col. (1993). Este método es similar al método de la ASTM E-96-80 (Association of Standard Testing Methods, USA) reportado por McHugh y col., (1993). La permeabilidad al vapor de agua (WVP) se determinó a 26°C a un gradiente de humedad relativa de 0-44% y a 13°C para gradientes de humedad relativa de 0-75% y 75-92%. Se realizaron al menos tres mediciones de espesor para cada una de las películas preparadas de acuerdo a la metodología explicada en la sección 7.2.7.2. Las películas fueron previamente acondicionadas y cortadas



en forma circular para posteriormente colocarlas en la parte superior de un vial donde se fijó toda la periferia con cinta teflón. Dentro del vial se colocó el material para producir una humedad relativa constante de 0% y 75%.

El vial se colocó dentro de un desecador de tapa esmerilada que contenía una solución saturada de sal de NaCl o KNO<sub>3</sub>, para generar una humedad relativa de 75% ó 92% respectivamente. Las determinaciones se hicieron al menos por triplicado y la variación en el peso del vial fue registrada cada 24 h en una balanza analítica (Analytical Plus, Ohaus E.U.), hasta obtener un mínimo de siete valores a partir del estado de equilibrio.

#### *7.2.8. Diseño experimental para bioensayo con frutos de litchi.*

Se seleccionaron frutos de litchi (*Litchi chinensis* Sonn) en estado maduro libres de daño mecánico por golpes o infestación de microorganismos o insectos.

Se aplicó la formulación 2.2 (Q-C-HPMC) la cual fue seleccionada como la mejor en base a las pruebas aplicadas así mismo, fueron aplicados otros tratamientos a base de quitosano. Uno sintetizado previamente de acuerdo a la metodología reportada por Corona en el 2011 (Q-co-C) y el otro el cual es básicamente una mezcla entre quitosano, ácido cítrico y antioxidantes (Q-C-AOX). Así mismo se utilizaron tres controles donde se evalúa el efecto del fruto sin tratamiento (CST), el fruto lavado (CCT) y el fruto con una película de quitosano y ácido cítrico sin entrecruzar (CQC). Así, para el análisis de los frutos se planteó un diseño experimental de bloques completos y aleatorizados donde las variables fueron 3 tratamientos y 3 controles aplicados:

- 1) Quitosano-Cítrico-HPMC (Q-C-HPMC): Aplicación de quitosano disuelto en ácido acético 0.1M modificado con HPMC (1:15 g/L) mediante reacción de entrecruzamiento con ácido cítrico (50g/L) y catalizador NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (19.2 g/L) más la adición de sorbitol (10g/L). pH 2.48 ±0.02.



2) Quitosano-co-Cítrico (Q-co-C): Aplicación de quitosano entrecruzado con ácido cítrico (1:10 g/L) a una temperatura de 70°C con 2.44% de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  con respecto al ácido cítrico y 17% de sorbitol con respecto al quitosano.  $\text{pH} = 2.32 \pm 0.016$ .

3) Quitosano/Cítrico/Antioxidantes (Q-C-AOX): Aplicación de quitosano disuelto en ácido acético 0.2 M (10g/L) más ácido cítrico (50g/L) y una mezcla de antioxidantes (Cisteína 5g/L + Eritorbato de Sodio 15g/L).  $\text{pH} = 2.61 \pm 0.026$ .

4) Control quitosano/ácido cítrico (CQC): Aplicación de un control a base de quitosano y ácido cítrico (1:10g/L) . $\text{pH} = 2.23 \pm 0.01$ .

5) Control (CST): Sin ningún tipo de tratamiento.

6) Control lavado (CCT): Los frutos de litchi únicamente fueron lavados con solución de tensoactivos aniónicos y anfotéricos 1%.

Los bloques se definieron con el factor tiempo en 0, 3 y 10 días para todos los tratamientos. De acuerdo a este resultado se seleccionó el tratamientos 1 y los controles 4 y 5 y se hizo un último monitoreo a los 17 días.

La temperatura de almacenamiento del fruto se mantuvo constante, siendo esta de 7°C a una humedad relativa de 75%. Cada unidad experimental consistió de un domo de plástico con 10 frutos y se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

#### *7.2.8.1 Características de calidad*

##### *7.2.8.1.1 Pérdida de peso*

Se midió la pérdida de peso con respecto al tiempo de tres unidades experimentales por tratamiento durante todo el periodo de almacenamiento. La pérdida de peso fue calculada en porcentaje de acuerdo con la ecuación 3:



$$\%Pérdida\ de\ peso = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (3)$$

donde  $P_i$ = peso inicial y  $P_f$ = peso final

#### 7.2.8.1.2. Cambio de color del fruto

Pará el análisis del cambio del color en la cáscara del fruto de litchi se utilizó un colorímetro Hunter-Lab Color Flex® (Hunter Associates Laboratoty, Inc.) y se determinaron los parámetros cromáticos CIE-LAB:  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . Las mediciones fueron realizadas en dos posiciones centradas equidistantes de la periferia del fruto.

#### 7.2.8.1.3. Índice de daño

El índice de daño se evaluó visualmente en cada monitoreo donde se empleó una escala numérica de seis grados clasificándose de acuerdo a esta el oscurecimiento en la superficie del fruto de litchi:

0 = Ausencia

1 = 1-10%

2 = 11-20%

3 = 21-30%

4= 31-40%

5= 41-50%

6=  $\geq 50\%$

Para el tratamiento de los datos se aplicó la ecuación 4:

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



donde n se refiere al número total de frutos estudiados y  $n_{1-6}$  al número de frutos estudiados desde el grado 1 al 6.

#### 7.2.8.1.4. Determinación de sólidos solubles totales (SST)

Esta determinación se realizó mediante un refractómetro (Erma, Tokyo®) a  $22 \pm 2.1$  °C. Para ello se extrajo completamente el jugo de la pulpa mediante un extractor de jugos mecánico 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 al menos por triplicado.

#### 7.2.8.1.5. Acidez titulable (AT)

Se determinó el porcentaje de ácido málico presente en el jugo de litchi mediante una titulación volumétrica ácido-base (AOAC, 2000). Se tomaron 5 mL de jugo de litchi de cada UE y se agregaron 20 mL de agua destilada junto con 3 gotas de fenolftaleína. La titulación se realizó con NaOH 0.1 N. La acidez titulable fue calculada como % de ácido málico mediante la ecuación 5:

$$\% \text{ Ácido málico} = \frac{V_{\text{NaOH}} * N_{\text{NaOH}} * F}{V_{\text{muestra}}} \times 100 \quad (5)$$

donde:

V = Volumen

N= Normalidad

F = Factor de conversión a gramos de ácido málico (0.06705)

#### 7.2.8.1.6. Extracción de fenoles y antocianinas

Se maceraron pericarpios de frutos de litchi con nitrógeno líquido. Se pesaron 3 g de pericarpio y se extrajeron dos veces con una mezcla de metanol:ácido clorhídrico 1N en una proporción 85:15 v/v. los extractos se centrifugaron a 12 100 g durante 15 min, a 5°C (Martínez-Castellanos, 2009).



#### 7.2.8.1.7. Determinación de antocianinas totales

Esta determinación se hizo con un método espectrofotométrico de acuerdo a lo reportado por Zheng y Tian (2006) donde, se tomó una alícuota de 1mL del extracto metanólico y se leyó en un espectrofotómetro a tres diferentes longitudes de onda (530, 620 y 650 nm). Posteriormente se utilizó la ecuación 6 para la obtención de la absorbancia (A):

$$A = (A_{530} - A_{620}) - 0.1(A_{650} - A_{620}) \quad (6)$$

#### 7.2.8.1.8. Determinación de antocianinas por medio del estándar cianidina-3-rutinósido

La determinación de antocianinas se realizó mediante HPLC de acuerdo a lo reportado por Hosseinian y col., (2008) para lo cual se tomó una alícuota del extracto metanólico (1mL) y se secó con nitrógeno. El extracto metanólico fue reconstituido en un vial con 200  $\mu$ L de ácido fórmico 4.5% v/v metanol. De este extracto, se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L y se inyectó en un HPLC Agilent Technology Modelo 1260 Infinity equipado con una columna Agilent Eclipse XDB-C18 de 5  $\mu$ m y un detector UV-Visible de arreglo de diodos. Se utilizó un flujo de 0.6 mL/min a 25°C y 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. Las lecturas fueron realizadas a una longitud de onda de 530,620 y 650 nm.

#### 7.2.8.1.9. Determinación de fenoles

El contenido de fenoles totales fue estimado por un método espectrofotométrico y se expresó como equivalentes de catequina según lo reportado por Jaramillo-Flores y col., (2003) y Thililertdech y col., (2008). Una alícuota (0.1mL) previamente diluida del extracto metanólico fue transferido en un tubo de ensayo que contenía 7.9 mL de agua destilada. Luego se adicionaron 0.1 mL de reactivo Folin-Ciocalteu. Después de 5 minutos se añadieron 1.5 de solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (200g/L) y se dejó reaccionar durante 90 minutos a



temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 760 nm y se comparó con una curva de calibración realizada con catequina.

La curva de calibración con catequina fue preparada con concentraciones de 0.008,0.009,0.01,0.05,0.1,0.5 y 1 mg/mL de catequina y se siguió el mismo procedimiento utilizado para la determinación de fenoles. Se realizó una regresión lineal para la obtención de la ecuación de la recta.

#### *7.2.8.1.10. pH de la cáscara*

La cáscara fue almacenada con nitrógeno líquido en una cámara de ultracongelación. Posteriormente fue triturada en un mortero y se tomó 1g para diluir en 5 mL de agua desionizada. El pH fue medido con un potenciómetro (pH209, Hanna Instruments Italia) a temperatura ambiente.

#### *7.2.8.2 Análisis estadístico*

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



## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1. Extracción de $\beta$ -quitina y quitosano

Se realizaron dos repeticiones en la extracción de  $\beta$ -quitina y obtención de quitosano para posteriormente hacer un promedio y determinar el porcentaje extraído de ambos productos. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 6.

Tabla 6.- Rendimiento de  $\beta$ -quitina y quitosano en base seca después de los tratamientos (ácido/álcali/desacetilación) con respecto a la materia inicial.

Tratamiento	Rendimiento g quitina /100g pluma	Referencia Rocha-Pino y col., 2008
DM y DP de pluma de calamar	30.2±0.4	28-34
Tratamiento	Rendimiento g quitosano /100g quitina	Referencia Rocha-Pino y col., 2008
Desacetilación Homogénea	78.06±4.8	-----

De acuerdo a los resultados, se observó que el rendimiento de  $\beta$ -quitina de *Dosidicus gigas* se encuentra dentro del intervalo reportado para pluma de calamar de 28-34% según Rocha-Pino y col. (2008). Esta extracción se llevó a cabo por método químico donde en un paso inicial la desmineralización de la pluma de calamar (*Dosidicus gigas*) con HCl permitió eliminar las sales inorgánicas como carbonato de calcio que se encuentran unidas a la quitina. La importancia de la desmineralización radica en el alto contenido inicial de cenizas en pluma de calamar de *Dosidicus gigas* reportado por Rocha-Pino y col. (2008) de  $7.5 \pm 1.5\%$  con respecto a otros calamares como *Loligo*, 2.4% (Chaussard y Domard, 2004) o *Loligo formosana* y *Loligo lessoniana* donde los porcentajes de ceniza reportados son menores al 0.1% (Chandumpai y col., 2004).

En la obtención del quitosano el rendimiento obtenido de quitosano fue de  $78.06 \pm 4.8\%$  respecto a la quitina inicial.



## 8.2. Caracterización de $\beta$ - quitina y quitosano

### 8.2.1. Espectrometría de infrarrojo.

Se realizó la espectrometría de absorción en el infrarrojo medio de la  $\beta$ -quitina y quitosano extraídos de la pluma de calamar de acuerdo a la metodología 7.2.3.1. Para el caso de la quitina se pueden apreciar bandas características tales como la presencia de amida secundaria y alcohol a  $3278\text{ cm}^{-1}$ , doblete característico del grupo amida en  $1629$  y  $1548\text{ cm}^{-1}$  así como la torsión del grupo NH en  $1373\text{ cm}^{-1}$ . El grupo éter alifático se aprecia en  $1026\text{ cm}^{-1}$  (fig. 11a) (Anexo 13.1).

En cuanto al quitosano se observa la desaparición de las bandas características del grupo amida y la aparición de un doblete a  $1590\text{ cm}^{-1}$  característico de una amina secundaria, comportamiento debido a la desacetilación de la quitina. A una frecuencia de  $3356\text{ cm}^{-1}$  se observa la presencia de un grupo alcohol y amina secundaria, mientras que la banda del éter alifático a  $1019\text{ cm}^{-1}$  se conservando (fig. 11b)(Anexo 13.1).

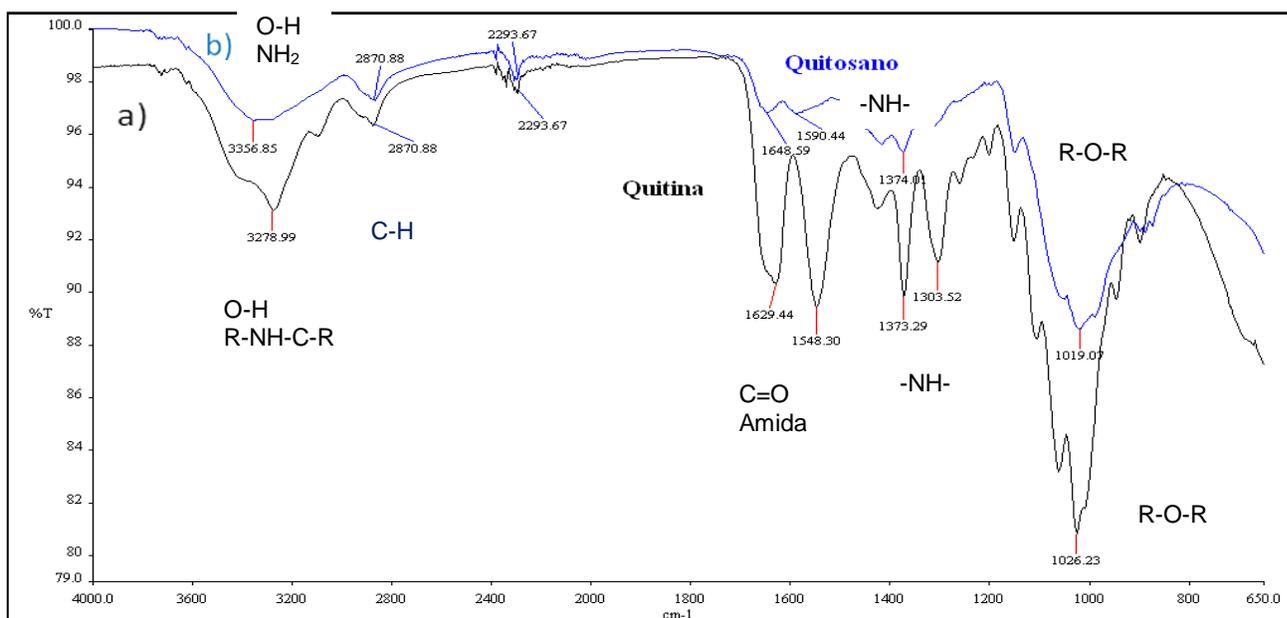


Figura 11.-Espectro de transmitancia en la región del infrarrojo medio de a)  $\beta$ -quitina y b) quitosano de calamar.



8.2.2. *Determinación del contenido de solubles, viscosidad intrínseca ( $M_w$ ) y grado de acetilación de quitosano.*

Los resultados en contenido de solubles, viscosidad intrínseca y grado de acetilación se resumen en la tabla 7.

Tabla 7.- Contenido de Solubles, viscosidad intrínseca y grado de acetilación de quitosano de calamar.

<i>Muestra</i>	<i>% Solubles en ácido acético</i>	<i><math>M_w</math> (g/mol)*</i>	<i>%DA*</i>
Quitosano	93.02±0.81%	461.3	13.24±0.61

\*Los cálculos para determinar el Peso molecular y el grado de acetilación se muestran en los anexos 13.2 y 13.3

Se determinó una alta solubilidad de la muestra correspondiente al 93.02±0.81% y un contenido de insolubles de 6.98%.

Por medio de la viscosidad intrínseca obtenemos el valor del  $M_w$  de una forma indirecta, esta viscosidad se ve afectada por el grado de acetilación, peso molecular, concentración del polímero, pH y temperatura. En base a esto se determinó un PM de 461.3 kilodaltons correspondiente a un quitosano de peso molecular medio.

El grado de acetilación fue determinado por medio de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H-NMR}$ ) donde se utilizaron las señales correspondientes a los protones H2, H3, H4, H5, H6, H6' (H2-6) de ambos monómeros (entre 4 y 3.1 ppm) y el pico correspondiente al grupo acetilo (H-Ac) (alrededor de 2ppm) (fig. 12)

Normalmente el grado de acetilación puede oscilar entre el 25 y el 20% mientras que el quitosano de mayor calidad tiene un grado de acetilación menor al 15% (Pacheco, 2010) en este sentido el quitosano obtenido por desacetilación homogénea a partir de pluma de calamar con un grado de acetilación del 13.24±0.61% es considerado de alta calidad.

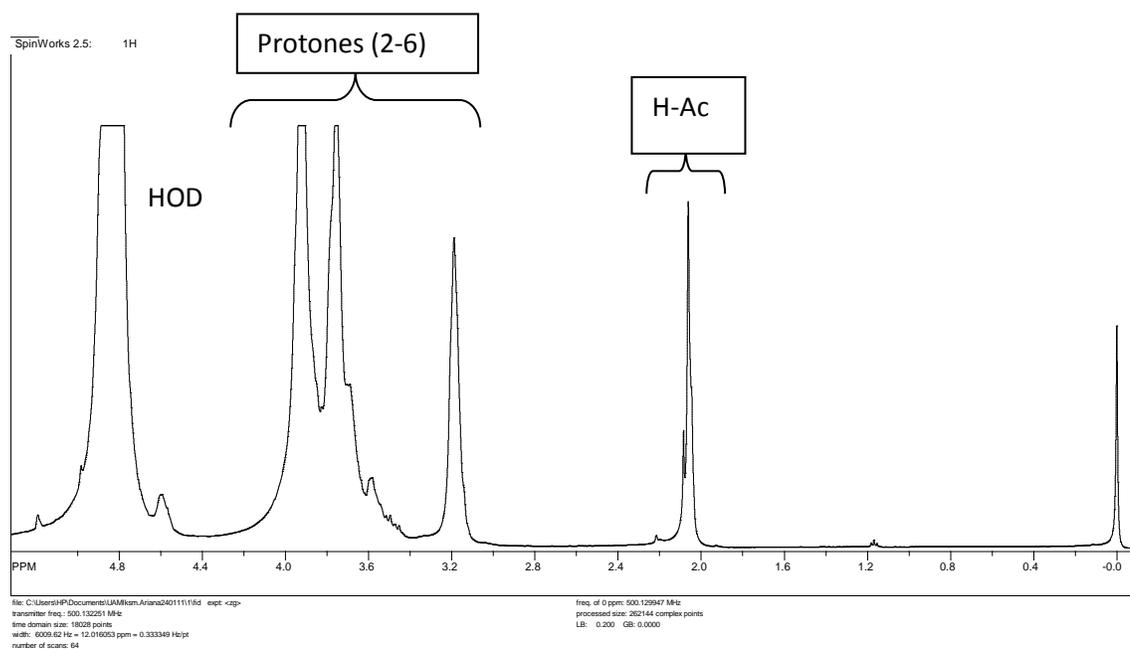


Figura 12.- Espectro de H-RMN de quitosano de calamar (*Dosidicus gigas*)

### 8.3. Elaboración de películas a base de Q-C-HPMC y evaluación del efecto de entrecruzamiento por medio de HRMN e IR

Se prepararon 5 diferentes formulaciones a base de quitosano, ácido cítrico y HPMC donde se mantuvieron constantes las respectivas cantidades de Quitosano,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Sorbitol, HPMC, etanol y Peg-600 y se vario la concentración de ácido cítrico (tabla 4), en la tabla 8 y fig. 13, se muestran las características cualitativas de las películas de Q-C-HPMC.



Tabla 8.- Características cualitativas de películas de prueba de formulaciones iniciales.

<i>Formulación</i>	<i>Observaciones</i>
<b>1 ( cítrico 75g/L)</b>	Fáciles de desmoldar, a simple vista no se observan fracturas, coloración ligeramente opaca.
<b>2 (cítrico 50g/L)</b>	Fáciles de desmoldar y manejar, películas translúcidas y flexibles.
<b>3 (cítrico 25g/L)</b>	Desmoldado con un poco de dificultad, fáciles de fracturar, poco flexibles.
<b>4 (cítrico 5g/L)</b>	Difíciles de desmoldar, se rompen con facilidad, rígidas.
<b>5 (cítrico 2.5g/L)</b>	Películas muy delgadas, difíciles de desmoldar quebrándose en su totalidad.

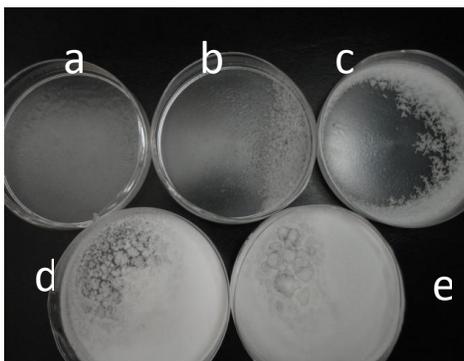


Figura 13.- Películas de Q-C-HPMC, a) Formulación 1, b) Formulación 2, c) Formulación 3, d) Formulación 4, e) Formulación 5.

Posteriormente mediante la metodología 7.2.5.1. se obtuvo un precipitado correspondiente al quitosano entrecruzado con ácido cítrico y HPMC. Este quitosano fue caracterizado mediante espectrometría IR y HRMN con la finalidad de determinar el grado de entrecruzamiento que sufrió la estructura.

Como se muestra en la fig. 14 debido a que el grupo R de la estructura base de la HPMC varía en cada unidad de repetición y en cada tipo de HPMC el grado de entrecruzamiento se verá afectado por el tipo de sustituyente. El grupo R puede corresponder a un grupo H, CH<sub>3</sub> ó CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>.

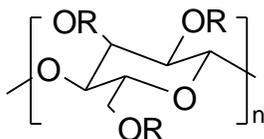


Figura 14.- Estructura química de la Hidroxi propil metil celulosa donde R=H, CH<sub>3</sub> ó CH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>.



Debido a esto, la estructura final del polímero formado por medio de la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano, el ácido cítrico y el HPMC puede variar en cada unidad de repetición tal como se propone en la siguiente reacción (fig. 13):

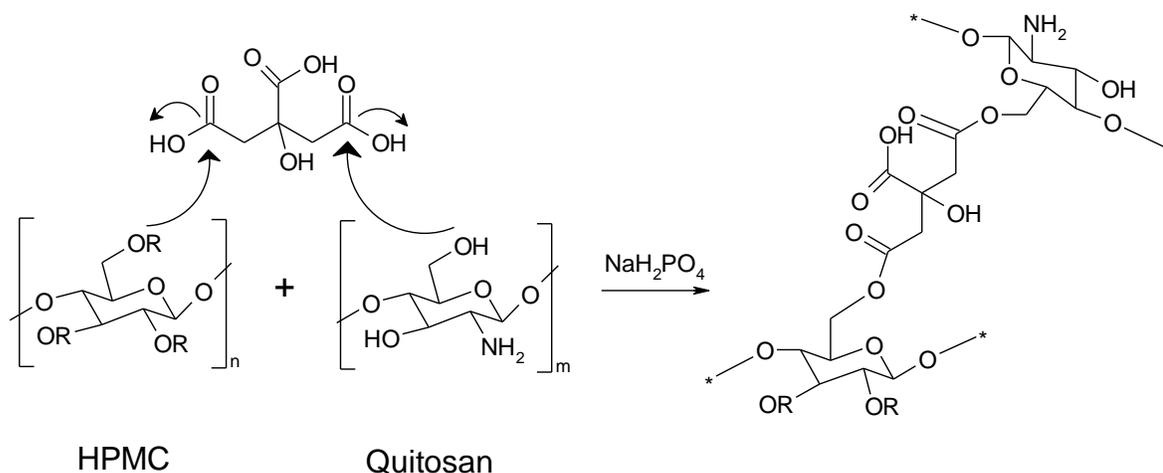
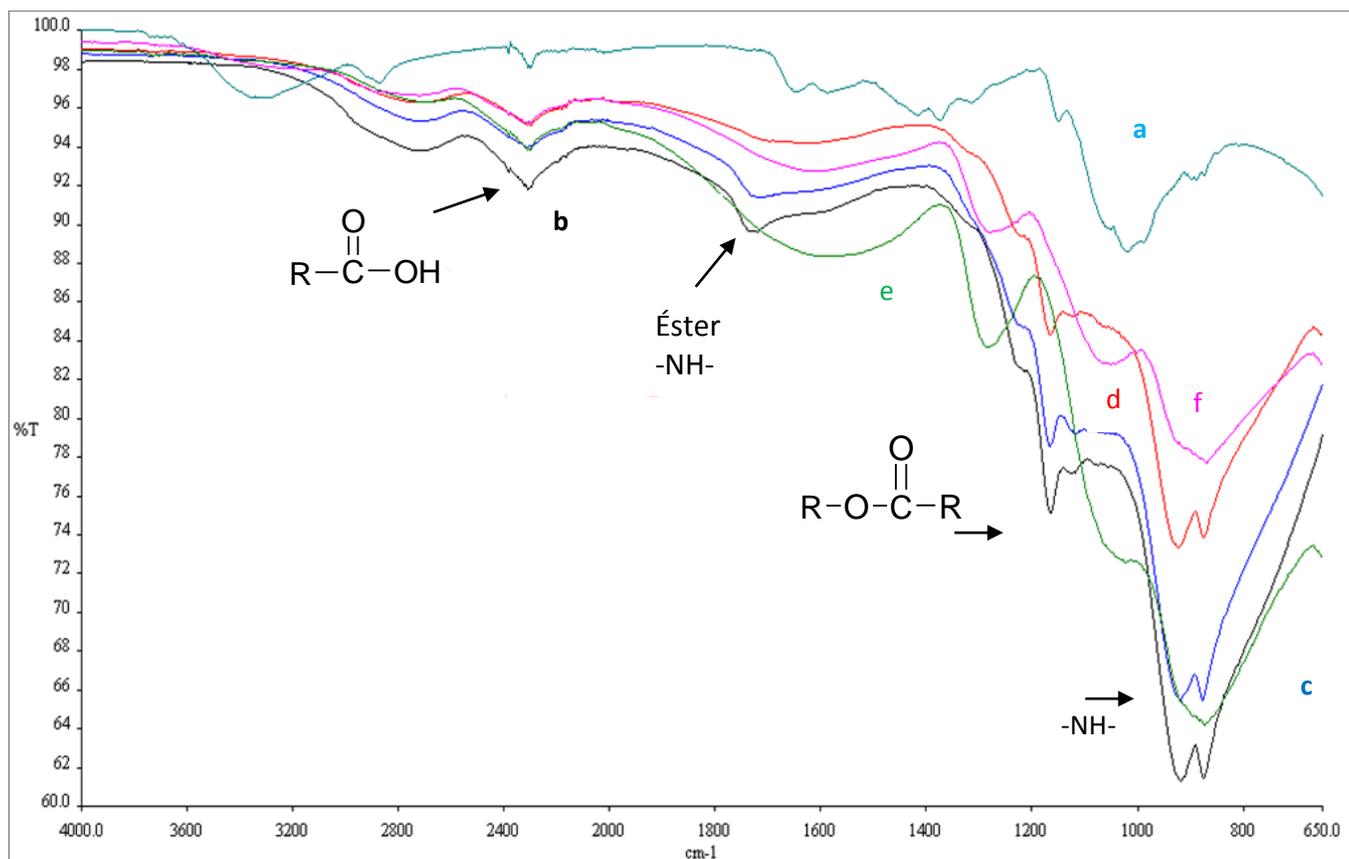


Figura 15.- Reacción de entrecruzamiento propuesta entre el quitosano, ácido cítrico, HPMC y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  como catalizador donde  $\text{R}=\text{H}$ ,  $\text{CH}_3$  o  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ .

El espectro de Infrarrojo obtenido para cada precipitado correspondiente al producto de la reacción de entrecruzamiento se muestra en la fig. 14 así como los grupos funcionales presentes en los espectros de cada formulación (Tabla 9), como se puede observar conforme disminuye la concentración de ácido cítrico disminuye de igual forma la formación del enlace éster, representado principalmente por las vibraciones presentes a  $1750\text{ cm}^{-1}$ , mostrando que las formulaciones 1 y 2 presentaron mayor intensidad en esta banda.



Formulación	1	2	3	4	5
Ac. Cítrico (g/L)	75	50	25	5	2.5

Figura 16.- Espectro de transmitancia en la región del infrarrojo medio de a) quitosano, quitosano con diferentes concentraciones de ácido cítrico (g/L): b) 75, c) 50, d) 25, e) 5, y f) 2.5.



Tabla 9.- Grupos funcionales presentes en el polímero formado por la reacción de entrecruzamiento.

Estructura del polímero formado Quitosano-Cítrico-HPMC

<b>Grupo funcional</b>	<b>Frecuencia (cm<sup>-1</sup>)</b>
Ácidos carboxílicos	3500-2500 estiramiento
Alcohol	1420-1200 torsión
	3650-3200
Amina	1640-1560 torsión en el plano
primaria	900-650 torsión fuera de plano
	1230-1030 estiramiento
Éster	1750-1735

La relación molar y el porcentaje de incorporación tanto de la HPMC como del ácido cítrico al polímero final formado fueron determinados mediante H-RMN y fueron calculados de manera similar a lo propuesto por García-Pérez en el 2010. Se identificó en el quitosano dos regiones características, la primera correspondiente a un masivo de protones del anillo glucosídico del quitosano Massif A (H<sub>2</sub>-H<sub>6</sub>) alrededor de 4.2 y 3.1 ppm y la segunda correspondiente al grupo acetilado alrededor de 2.1 ppm. Para el caso del HPMC el masivo de protones de su anillo muestra una señal alrededor de 4 y 3.2 ppm (señal que se encuentra traslapada con el masivo de protones del quitosano) y para el caso de un grupo sustituyente metilo una señal a 1.2 ppm. Por último, el ácido cítrico presenta dos picos característicos, uno a 3.01 ppm y a 2.84 siendo ambos dobletes (Anexo 13.4).



Con base al espectro de H-RMN del quitosano, se calculó la relación molar entre el masivo A y los H de su metil, manteniendo una relación de intensidades promedio de  $15:1 \pm 0.66$ .

En el anexo 13.4 se muestra el espectro de resonancia magnética del quitosano purificado de la formulación 1, donde de acuerdo a lo anterior se identificaron los picos característicos de cada compuesto y se integraron. Con esta información la resultante de la integral de la señal correspondiente al metil del quitosano se multiplica por la relación de intensidades promedio de la señal del masivo A (2-6), obteniendo así el valor correspondiente a la integral del masivo A (2-6) en el espectro del quitosano purificado (fig. 17).

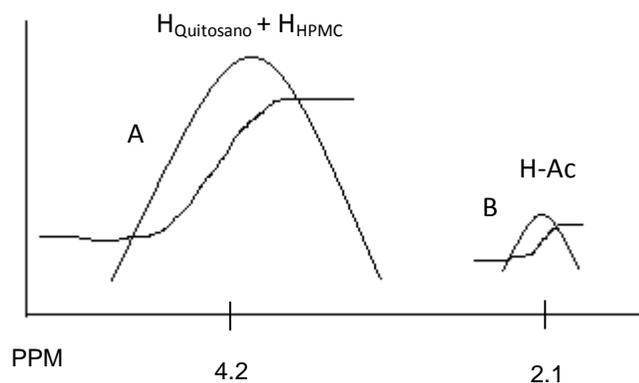


Figura 17.- Zona de integración de las señales correspondientes al masivo de protones del quitosano, la HPMC y el metil del quitosano.

$$(\int B) \times 15 = \int \text{Masivo 1 (2-6)} \quad (7)$$

Posteriormente se resta lo equivalente al masivo 1 (2-6) del quitosano a la integral del masivo total de protones A, lo que nos proporciona la porción correspondiente a la integral de protones de la HPMC.

$$\int A - \int \text{Masivo 1 (2-6)} = \int H_i \text{ HPMC} \quad (8)$$

La relación molar entre el quitosano y el HPMC será calculada a partir de la ecuación 9 :

$$\frac{\int H_i \text{ HPMC} / 7 \text{ ó } \int H_i \text{ HPMC} / 19}{\int \text{Masivo 1 (2-6)} / 6} = \frac{X_A \text{ ó } X_{A'}}{X_B} \quad (9)$$



Donde los H totales correspondientes al compuesto HPMC son 7 cuando el grupo sustituyente es H ó 19 cuando se tiene un máximo de dos propilos como grupos sustituyentes.

De acuerdo a lo anterior, el cálculo de porcentaje de incorporación de HPMC se propone de la siguiente manera:

$$\% \text{ Incorporación de HPMC} = \frac{X_A \text{ ó } X_{A'}}{(X_A \text{ ó } X_{A'}) + X_B} \times 100 \quad (10)$$

De igual manera, la relación molar existente entre el ácido cítrico y los polisacáridos así como el cálculo de incorporación de ácido cítrico se propone de la siguiente manera:

$$\frac{\int H_i \text{ Ac.Cítrico} / 4}{\int A / 13 \text{ ó } \int A / 25} = \frac{X_C}{X_D \text{ ó } X_{D'}} \quad (11)$$

$$\% \text{ Incorporación de Ácido Cítrico} = \frac{X_C}{X_C + X_D \text{ ó } X_{D'}} \times 100 \quad (12)$$

de esta manera es como se llega a las siguientes ecuaciones:

Ecuación 13:

$$\text{Relación molar 1(HPMC - Q)} = \frac{\int H_i \text{ HPMC} / 7}{\int \text{Masivo 1} (2 - 6) / 6}$$

Ecuación 14:

$$\text{Relación molar 2(HPMC - Q)} = \frac{\int H_i \text{ HPMC} / 19}{\int \text{Masivo 1} (2 - 6) / 6}$$

Ecuación 15:



$$\% \text{ Incorporación de HPMC } 1 = \frac{\int H_i \text{ HPMC} / 7}{\int H_i \text{ HPMC} / 7 + \int \text{Masivo } 1 (2 - 6) / 6} \times 100$$

Ecuación 16:

$$\% \text{ Incorporación de HPMC } 2 = \frac{\int H_i \text{ HPMC} / 19}{\int H_i \text{ HPMC} / 19 + \int \text{Masivo } 1 (2 - 6) / 6} \times 100$$

Ecuación 17:

$$\text{Relación molar } 1(\text{Ac. cítrico}) = \frac{\int H_i \text{ Ac. Cítrico} / 4}{\int A / 13}$$

Ecuación 18:

$$\text{Relación molar } 2(\text{Ac. cítrico}) = \frac{\int H_i \text{ Ac. Cítrico} / 4}{\int A / 25}$$

Ecuación 19:

$$\% \text{ Incorporación de Ácido Cítrico } 1 = \frac{\int H_i \text{ Ac. Cítrico} / 4}{\int H_i \text{ Ac. Cítrico} / 4 + \int A / 13} \times 100$$

Ecuación 20:

$$\% \text{ Incorporación de Ácido Cítrico } 2 = \frac{\int H_i \text{ Ac. Cítrico} / 4}{\int H_i \text{ Ac. Cítrico} / 4 + \int A / 25} \times 100$$

En la tabla 10 y 11 se muestran los cálculos de relación molar y porcentaje de incorporación de la HPMC y el ácido cítrico.

Para el caso de la relación existente entre el quitosano y el HPMC se observa una mayor incorporación del polímero HPMC en la formulación 4 mientras que la mínima se observa en la formulación 2. Para el caso de la relación entre el quitosano y el ácido cítrico se observa un grado de incorporación proporcional a la concentración de ácido cítrico, es decir, a medida que la concentración de cítrico disminuye lo hace de igual manera la relación molar y el grado de entrecruzamiento entre este y el quitosano sin embargo, aunque las



formulaciones 1 y 2 prácticamente muestran el mismo grado de incorporación, en la formulación 1 se utilizaron 75g/L de ácido cítrico y en la formulación 2 solo 50g/L.

Para la elección de la mejor formulación se tomaron en criterios cualitativos, químicos y de rendimiento. Como se observa en el cuadro 1, las películas con características más favorables se obtienen de la formulación 1 y 2. Al ser la HPMC un polímero soluble en agua que es pobre en cuanto a su barrera de vapor debido a su naturaleza hidrofílica la elección no se inclina a la formulación que presente la mayor incorporación de este polímero si no a la que debido a su asociación con ácidos policarboxílicos muestra una interesante alternativa en la disminución de sus características hidrofílicas y solubilidad en agua como lo fue reportado por Moller y col. (2004). En este sentido la formulación 2 muestra ser la mejor en cuanto a rendimiento e incorporación de ácido cítrico.

**Tabla 10.-** Calculo de relación molar y porcentaje de incorporación de la HPMC para cada formulación realizada.

Formulación	Relación molar 1 Q:HPMC	Relación molar 2 Q:HPMC	% Incorporación 1 HPMC	% Incorporación 2 HPMC
1	1:2±0.3	5:4±0.1	68.1±3.1	44.1±3.5
2	5:2±0.03	10:1±0.01	27.3±1.4	12.15±0.7
3	1:1±0.08	5:2±0.04	54.6±1.6	30.7±1.4
4	1:13±0.2	1:5±0.07	93±0.1	82.9±0.2
5	1:6±0.3	1:2±0.09	84.7±0.6	67.1±1

**Tabla 11.-** Calculo de relación molar y porcentaje de incorporación de ácido cítrico para cada formulación realizada.

Formulación	Relación molar 1 Q:Cítrico	Relación molar 2 Q:Cítrico	% Incorporación 1 Ac. cítrico	% Incorporación 2 Ac. cítrico
1	1:3±0.02	1:5±0.05	72.3±0.2	83.4±0.1
2	1:2±0.04	1:4±0.08	68.7±0.4	80.9±0.3
3	1:1±0.04	1:2±0.07	47.2±1.0	63.2±0.9
4	10:3±0.01	2:1±0.01	21±0.3	33.8±0.4
5	5:1±0.01	2:1±0.03	19.3±0.9	31.4±1.2



Con base a estos resultados, se utilizó la formulación 2 para las pruebas posteriores.

**8.4. Determinación de concentración de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  necesaria para catalizar la reacción de entrecruzamiento entre el quitosano, el ácido cítrico y la HPMC en base a sus propiedades físicas. Determinación de espesores, fuerza puncción y fuerza tensión.**

En la tabla 12 se muestran las características cualitativas de las películas de quitosano-cítrico-HPMC con diferentes concentraciones de fosfato de sodio monobásico.

**Tabla 12.- Características cualitativas de películas de prueba. Variación de concentración de fosfato de sodio monobásico.**

Formulación	Observaciones
2.1 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 27.89g/L)	Fáciles de desmoldar, ligeramente quebradizas. Flexibles.
2.2 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 19.19g/L)	Fáciles de desmoldar y manejar, películas translucidas no se observan fracturas. Flexibles.
2.3 ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 9.35g/L)	Difíciles de desmoldar, muy flexibles, textura granular, ligeramente opaca, alta adherencia y de difícil manipulación.

**8.4.1. Efecto de la concentración de catalizador (Fosfato de sodio monobásico) en el espesor de las películas.**

Como se observa en la fig. 13, a medida que se disminuye la concentración de cítrico aparece un exceso de catalizador ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) por lo que es necesario ajustar su concentración a fin de que ocurra la reacción de entrecruzamiento. Para esto, inicialmente la formulación 2 poseía una relación molar entre el ácido cítrico y el fosfato de sodio monobásico de 1:1.2 y ya mostraba un exceso de catalizador por lo que se probaron 3 concentraciones equimolares de fosfato de sodio monobásico (tabla 13) a partir de una concentración fijada de ácido cítrico (50g/L, F2) y se determinó espesor, fuerza puncción y tensión de las películas formadas a fin de elegir la mejor en base a estas características.



Tabla 13.- Relaciones molares probadas para 3 distintas formulaciones donde la cantidad de ácido cítrico se mantiene constante.

Formulación	Relación equimolar (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Concentración (g/L)
2.1	0.75	27.89
2.2	0.50	19.19
2.3	0.25	9.35

Como se muestra en la figura 18 el efecto de la concentración del catalizador está descrito por una relación proporcional inversa es decir, que el espesor de la película disminuye con forme se disminuye la concentración de catalizador.

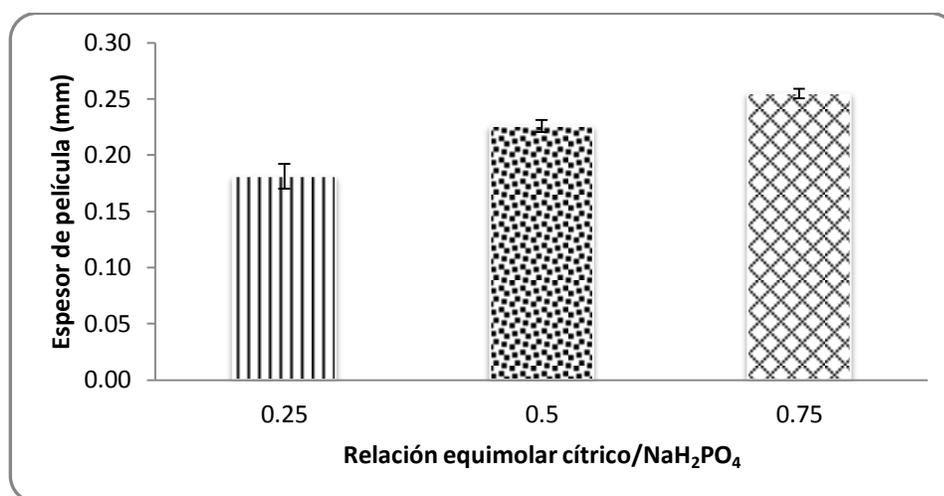


Figura 18.- Efecto de la concentración de catalizador (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) sobre el espesor (mm) de película.

Este efecto podría estar relacionado directamente con la cantidad de ácido cítrico incorporado a la molécula, reacción que está catalizada por el fosfato de sodio monobásico. El ácido cítrico podría disminuir las características hidrofílicas y solubilidad en agua de la HPMC lo que facilita mediante el secado la movilidad molecular necesaria para la migración de agua hacia la fase gaseosa, esto



consecuentemente repercute en la disminución del espesor de la película debido a la falta de retención de agua en el polisacárido.

#### *8.4.2. Esfuerzo de fractura*

Los valores de fuerza de fractura en la punción y en la tensión se reportan como esfuerzo de fractura para incluir el área sobre la que se aplica la fuerza. De esta forma es más fácil comparar con valores reportados y evitar interpretaciones erróneas. En el caso de la punción, el área se calcula considerando la superficie de contacto entre el sensor y la película (fig. 19 a), mientras que en la tensión el área es el producto del espesor de la película por el ancho de los listones (fig. 19 b). Estos valores fueron calculados conforme a la ecuación 30 para el caso de la compresión y la ecuación 31 para el caso de la extensión (anexo 13.5.2) y son presentados en el anexo 13.5.3 Los resultados obtenidos para el caso de la formulación 2.3 no son comparables con las formulaciones 2.1 y 2.2 bajo las mismas condiciones debido a que no hubo fractura tanto en la prueba de esfuerzo en la tensión como en la punción. Además, cabe señalar que la formulación 2.3 fue de muy difícil manipulación debido a su alta adherencia (tabla 12) En la figura 20 apreciamos que el esfuerzo requerido para fracturar los materiales empleados es mayor en la tensión que en la punción. La que mostro el mayor esfuerzo de fractura tanto en la punción como en la tensión fue la formulación 2.2. Este comportamiento pudo haber sido consecuencia del grado de incorporación de los polímeros y su entrecruzamiento con el ácido cítrico mismo que es catalizado por la adición de fosfato de sodio monobásico y cuya concentración se varía en este rubro. A medida que se incrementa la concentración de fosfato de sodio monobásico se incrementa el grado de incorporación y entrecruzamiento de los polímeros de tal forma que con 19.19 g/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  se observa un aumento en la flexibilidad de las películas lo que involucra la disminución de las fuerzas intermoleculares a lo largo de la cadena de los polímeros constituyentes de las películas, remplazando las interacciones quitosano-quitosano y HPMC-HPMC por interacciones quitosano-cítrico-HPMC logrando un incremento en la movilidad de las cadenas y del espacio libre intermolecular y así mejor la flexibilidad y



disminución de la fragilidad de la película. Por lo que en la formulación 2.2 la cantidad de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  utilizada para la catálisis es la que proporciono las mejores características de resistencia en las pruebas de esfuerzo en la tensión y punción.

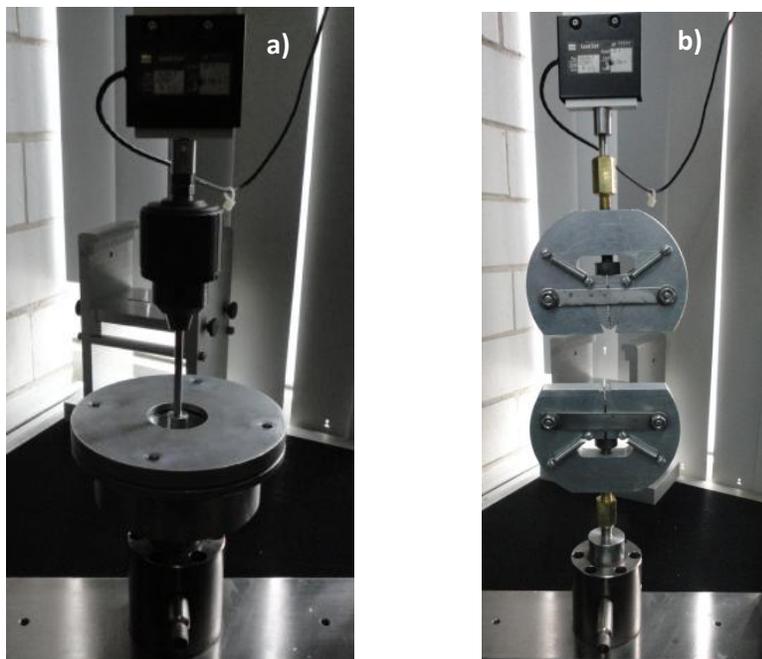


Figura 19.- a) Equipo utilizado para la prueba de esfuerzo de fractura en la punción. b) Equipo utilizado para la prueba de esfuerzo de fractura en la extensión. Máquina de pruebas SINTECH 1/S.

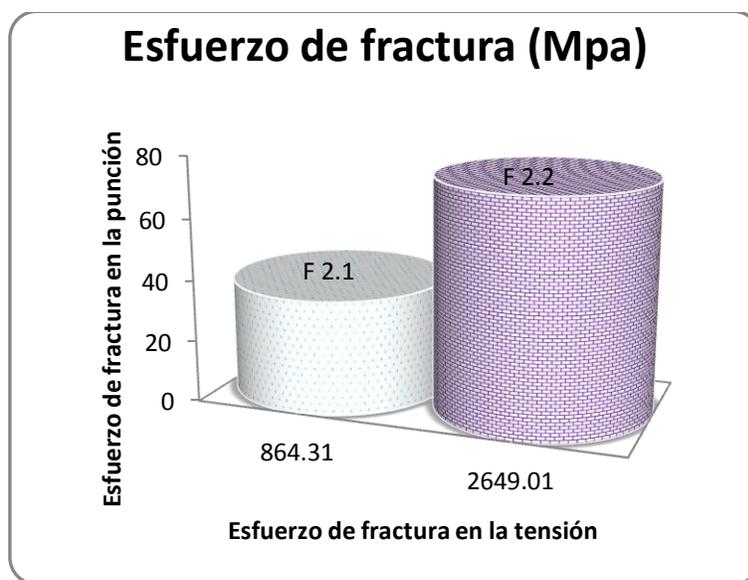


Figura 20.- Comparación entre el esfuerzo de fractura (Mpa) por punción y por tensión de las formulaciones 2.1 y 2.2.



### 8.4.3. Deformación de fractura

Los valores de deformación de fractura fueron obtenidos conforme a las ecuaciones 28 y 29 (anexo 13.5.2.) y son presentados en el anexo 13.5.3. En la fig. 21, apreciamos que la deformación de fractura requerida es mayor en la punción que en la tensión. La formulación que muestra una mayor capacidad de deformación en la punción es la 2.1, mientras que en la prueba de deformación en la tensión la formulación 2.2 muestra la mayor capacidad de deformación. Este comportamiento sugiere que la disminución equimolar de catalizador 1:0.5 de la formulación 2.2 muestra que este es un material que requiere un mayor esfuerzo para ser deformado y por lo tanto presenta la mejor elasticidad, mientras que la formulación 2.1 presenta una disminución de la fuerza mecánica de las películas logrando un decremento en el esfuerzo requerido requerido para su deformación.

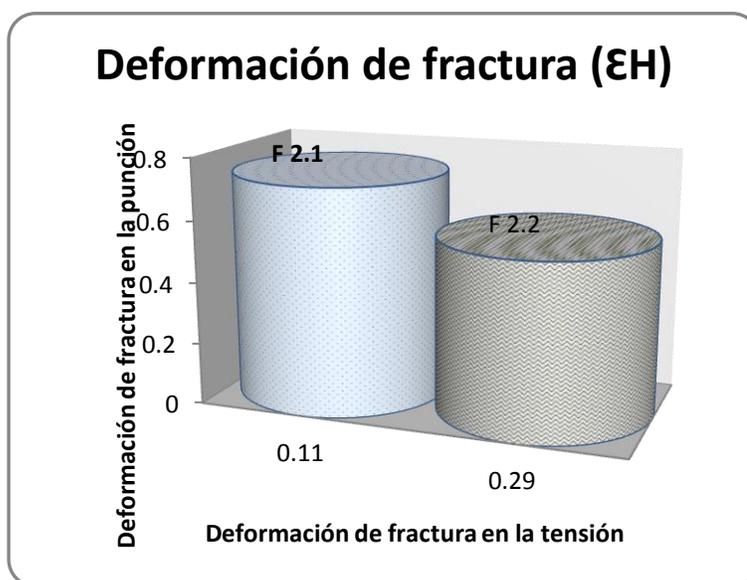


Figura 21.-Comparación entre la deformación de fractura ( $\epsilon H$ ) en la punción y en la tensión de las formulaciones 2.1 y 2.2.



#### 8.4.4. Modulo de Young

Los valores del módulo de Young fueron calculados a partir de la pendiente de la curva de esfuerzo verdadero contra la deformación de Hencky. Estos valores se muestran en el anexo 13.5.3

En la figura 22 apreciamos que para el módulo de Young en tensión es mucho mayor que en punción para ambas formulaciones. La formulación 2.2 mostró el mayor módulo de Young tanto en tensión como en punción en comparación con la formulación 2.1, valor directamente relacionado con la elasticidad de la formulación.

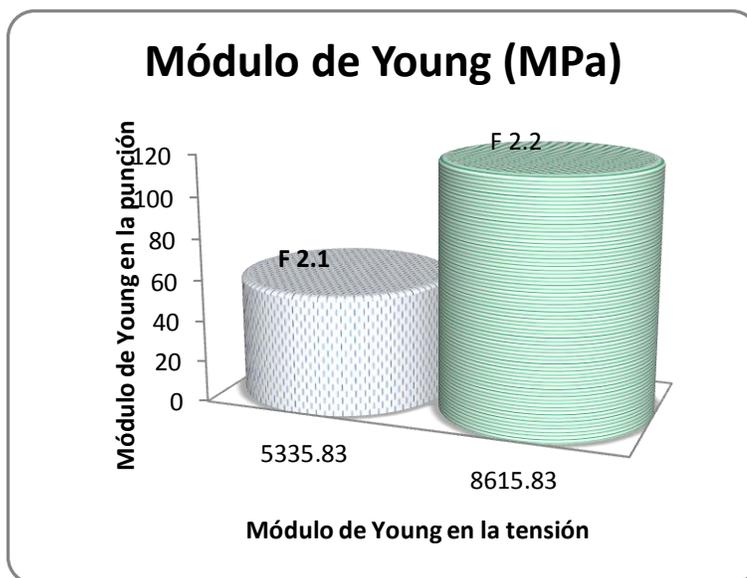


Figura 22.- Comparación entre el módulo de Young en la punción y en la tensión de las formulaciones 2.1 y 2.2.

Con base a las pruebas anteriores se eligió a la formulación 2.2 (Q-C-HPMC) como única para su evaluación de permeabilidad al vapor de agua así como su aplicación *in-vivo* al haber obtenido los mejores resultados en las pruebas cualitativas, de espesor y elasticidad.



### 8.5. Propiedades de barrera. Evaluación de la permeabilidad al vapor de agua de la película Q-C-HPMC.

La permeabilidad al vapor de agua (WVP) fue evaluada para la película Q-C-HPMC en gradientes de humedad relativa de 0-75%, 75-95% y de 0 a 44% y calculada con la ecuación 34 (anexo 13.6). Se probaron gradientes de 0-75% y 75-95% para predecir el comportamiento de las películas en una cámara de refrigeración a una HR 85% 90% y una temperatura de 7°C, misma que se utiliza en el almacenamiento de frutos de litchi (ASERCA/CIESTAAM, 1996) fruto al cual se enfocara dicha formulación debido a las características ácidas que la caracterizan, así como un gradiente de HR de 0-44% y temperatura de 26°C debido a que a esta HR se acondicionaron las películas para la realización de las pruebas mecánicas .

Como se observa en la fig. 23, la mayor permeabilidad de la película se observa a una temperatura de 13°C y un gradiente de HR de 0-75%, mientras que la menor permeabilidad se observa a una temperatura de 13°C y un gradiente de HR de 75-95%. A una HR de 44% y una temperatura de 26°C se observa una permeabilidad intermedia entre las dos HR anteriores a una misma temperatura. Por los resultados anteriores, la formulación 2.2 muestra una mejor resistencia al vapor de agua a altas HR y bajas temperaturas.

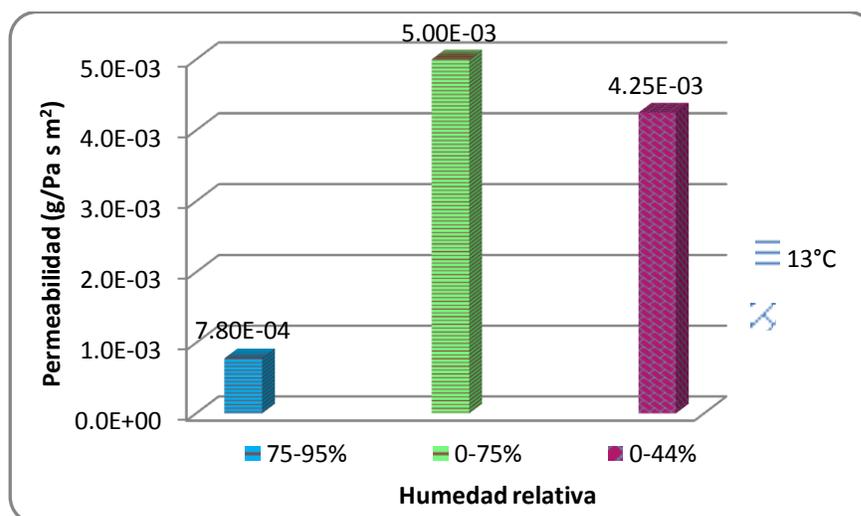


Figura 23.- Permeabilidad al vapor de agua (WVP) de película de Q-C-HPMC.



### **8.6. Evaluación del efecto de la formulación Q-C-HPMC y otros tratamientos en la calidad y el periodo de conservación del litchi (*Litchi chinensis Sonn*) CV Brewster.**

Una vez seleccionados los frutos de aquellos que aún se encontraban inmaduros o presentaron daños por golpes e infestación de microorganismos. Se realizó una selección utilizando números aleatorios de tal manera que diera a la formación de 3 grupos destinados a la aplicación de tratamientos y 3 grupos destinados a ser controles (tabla 14).

**Tabla 14.- Tratamientos aplicados a frutos de litchi (*Litchi chinensis Sonn*) CV Brewster.**

Tratamiento	Formulación
Q-C-HPMC	Quitosano-Cítrico-HPMC (Quitosano 1g/L +Cítrico 50g/L+HPMC 15/L), pH=2.48±0.02
Q-co-C	Quitosano -co-Cítrico(1:10 g/L) (Corona,2011), pH=2.32±0.016
Q-C-AOX	Quitosano 10g/L+Cítrico 50g/L+Mezcla de antioxidantes L-cisteína+Eritorbato (5:15 g/L), pH=2.61±0.026
Controles	
CST	Control
CCT	Control lavado con solución de tensoactivos aniónicos y anfotéricos al 1%
CQC	Control Quitosano/Ac. Cítrico (1:10 g/L) , pH=2.23±0.01

Posterior a la aplicación de tratamientos se prosiguió a la formación de unidades experimentales y su almacenamiento en una cámara de refrigeración a 7°C y una humedad relativa del 75%.

A excepción de pérdida de peso donde el monitoreo fue hecho cada tercer día, cada tratamientos fue evaluado al inicio, al tercer y al décimo día a fin de hacer una selección de los tratamientos que alojaron los mejores resultados, por lo que en base a esto las siguientes evaluaciones solo se realizaron para el tratamiento Q-C-HPMC y los controles CST y CQC.



8.6.1. Resultados de las variables o atributos de calidad medidos durante el almacenamiento de los frutos.

8.6.1.1. Pérdida de peso

La pérdida de peso fue elevada siendo esta fluctuación en todos los tratamientos entre 2.38-12.85% observándose la menor pérdida de peso en CST, mientras que la mayor pérdida de peso se observó en Q-C-AOX (fig. 24). Hay que recordar que todos los tratamientos fueron sometidos a una misma condición de temperatura y humedad relativa (7°C, 75% HR). De acuerdo al análisis estadístico existe evidencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) de que la pérdida de peso en cada tratamiento y tiempo es diferente (anexo 13.7.1). De acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD, básicamente los datos se agrupan en dos grupos donde estadísticamente no existe diferencia entre el tratamiento Q-C-HPMC y los controles CQC y CST. Dicho comportamiento puede estar relacionado con el posible estrés que le causa al fruto el recubrimiento con el quitosano sin embargo cuando este se asocia con un polímero de celulosa como lo es la HPMC la permeabilidad a la transferencia de vapor de agua disminuye y consecuentemente la pérdida de humedad.

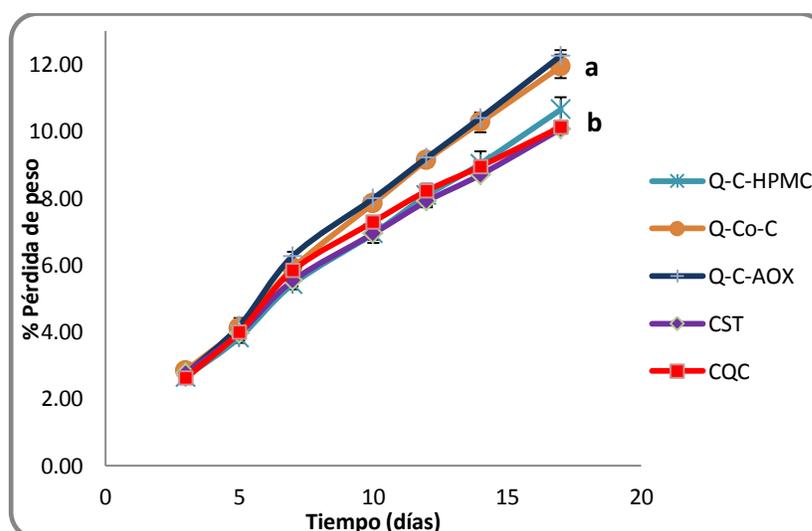


Figura 24.- Pérdida de peso de litchi CV Brewster tratados con biopolímero de Q-C-HPMC frente a 2 diferentes tratamientos y 2 controles almacenados a 7°C y una humedad relativa de 75%. Datos promedio de tres observaciones. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha<0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD.



8.6.1.2. Cambio de color del pericarpio y pH de la cáscara.

Como se observa en la figura 25, la calidad visual de los frutos de litchi tratados con el recubrimiento Q-C-HPMC es mucho mejor hasta el día 14 de su almacenamiento, esta calidad es gradualmente seguida por Q-Co-C y Q-C-AOX, mientras que en los controles el oscurecimiento de los frutos es más evidente.

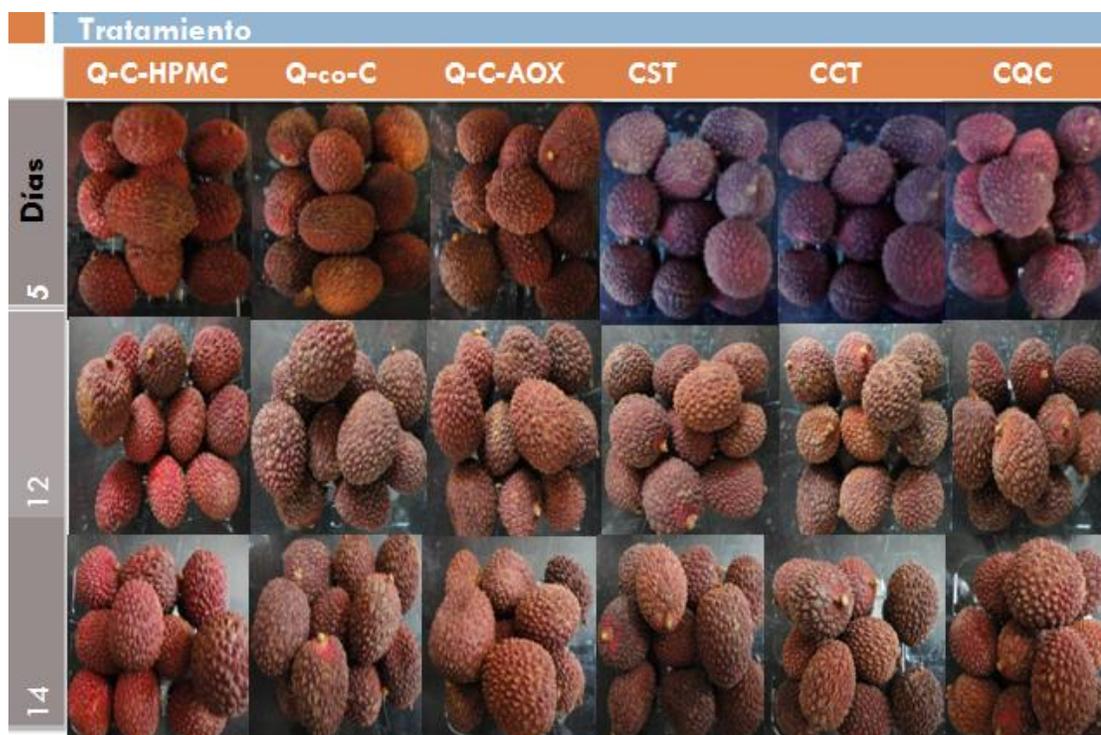


Figura 25.- Calidad visual de frutos de litchi CV Brewster tratados con quitosano. Fotos tomadas en los días 5,12 y 14 de almacenamiento a 7°C y 75%HR.

El parámetro de luminosidad es representado por la variable L, donde 0 es negro y 100 es blanco. Como se aprecia en la figura 26 ,los valores de L\* (luminosidad) obtenidos mostraron básicamente una caída drástica, donde todos los tratamientos y controles muestran una misma tendencia durante todo el tiempo de almacenamiento, a excepción del CCT en el tiempo 3 donde se observa un ligero incremento de la luminosidad al día 10. De acuerdo al análisis estadístico existe evidencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) de que la luminosidad en cada tratamiento y tiempo es diferente (anexo 13.7.2.). De acuerdo al análisis de comparación



múltiple de medias LSD, los datos se agrupan en dos grupos donde estadísticamente no existe diferencia entre el tratamiento Q-C-HPMC y Q-C-AOX así como no existe diferencia entre Q-Co-C y los controles CST, CCT y CQC.

Se realizó un último muestreo al día 17 donde solamente se utilizo el tratamiento Q-C-HPMC y los controles CST y CQC. Como observamos al punto final la luminosidad continúa descendiendo siendo el tratamiento Q-C-HPMC el que termino con los frutos mas oscuros. Este efecto puede estar relacionado con la desecación y pérdida de agua que el biopolímero de Q-C-HPMC provoca en los frutos de litchi así como la aparición de microfisuras en el pericarpio en el tiempo de almacenamiento las cuales, son causantes directamente de un aumento en la senescencia del fruto (Sivakumar y col.,2007).

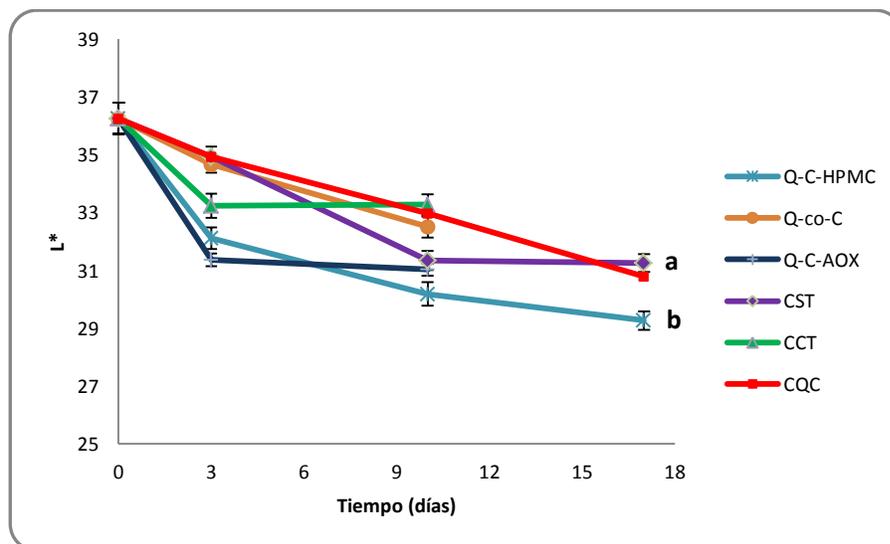


Figura 26.- Luminosidad (L\*) en frutos de litchi tratados con quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD.



8.6.1.3. Parámetro cromático a\*

El parámetro cromático a\* se encuentra representada por una escala rojo-verde donde los valores positivos son rojos, los valores negativos son verdes y el cero es neutro. La figura 27 muestra el comportamiento de este parámetro al inicio, al tercer y al décimo día para Q-C-HPMC, Q-co-C, Q-C-AOX, CST, CCT y CQC, y el comportamiento al decimo séptimo día para Q-C-HPMC, CST y CQC bajo una atmosfera controlada. De acuerdo al análisis estadístico existe evidencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) de que el parámetro cromático a\* es diferente en cada tratamiento y tiempo (anexo 13.7.3.).

Graficando el tiempo 17, no se observa evidencia significativa que haga que el tratamiento Q-C-HPMC sea igual a CST y CQC, manteniéndose significativamente mayor. Por lo que en este sentido, la funcionalización entre el quitosano-cítrico-HPMC permite obtener recubrimientos que estabilizan las antocianinas presentes en la cáscara de los frutos de litchi.

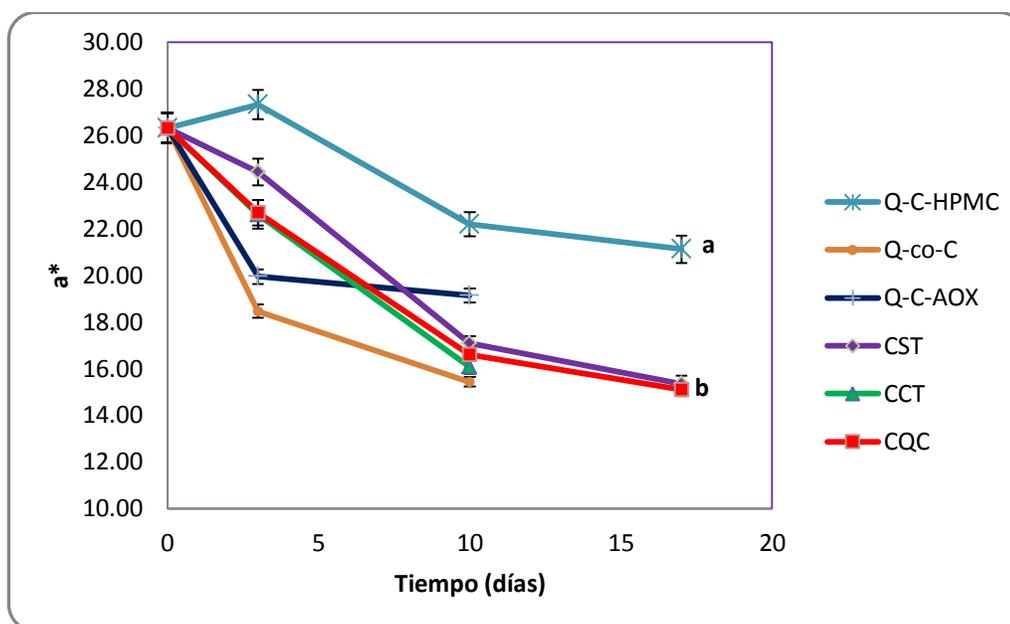


Figura 27.- Parámetro cromático a\* en frutos de litchi tratados con quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha<0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD.



#### 8.6.1.4. Parámetro cromático $b^*$

El parámetro cromático  $b^*$  se encuentra representado por una escala azul-amarillo donde los valores positivos son azules, los valores negativos son amarillos y el cero es neutro. Durante los primeros 10 días de almacenamiento, el análisis estadístico muestra diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ) del parámetro cromático  $b$  en cada tratamiento y tiempo (anexo 13.7.4.). La tendencia estadística de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD muestra la formación de dos grupos donde CCT posee una media superior a los demás tratamientos, lo cual significa una mayor tendencia al color azul y los demás una tendencia al amarillo (fig. 28).

Al tiempo 17, el análisis de varianza muestra que entre el tratamiento Q-C-HPMC y CST y CQC no existe diferencia significativa sin embargo, el análisis LSD muestra una diferencia y la formación de dos grupos donde el tratamiento Q-C-HPMC junto con CQC tienden al color azul.

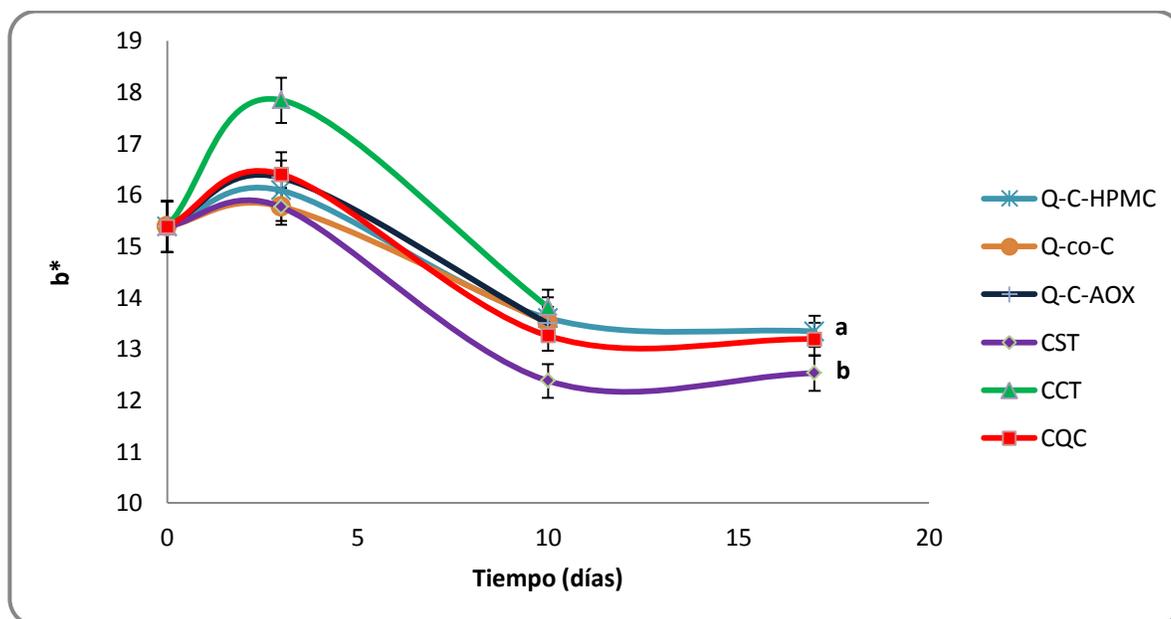


Figura 28.- Parámetro cromático  $b^*$  en frutos de litchi tratados con diferentes tratamientos de quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha<0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD



8.6.1.5. Determinación de antocianinas

En la figura 29 se presenta la evolución de Cianidina-3-rutinósido la cual, es la antocianina más abundante ( $\geq 75\%$ ) en frutos de litchi CV Brewster (Lee y Wiker, 1991). Se puede observar que la aplicación del tratamiento Q-C-HPMC logró disminuir significativamente la degradación de esta antocianina durante los primeros 3 días de almacenamiento y aunque en el décimo día esta diferencia no fue significativa si lo fue en el décimo séptimo (anexo 13.7.5). Este efecto principalmente se le atribuye al bajo pH que maneja la formulación de Q-C-HPMC, pH en el cual las antocianinas adquieren una estructura más estable de catión flavilio rojo.

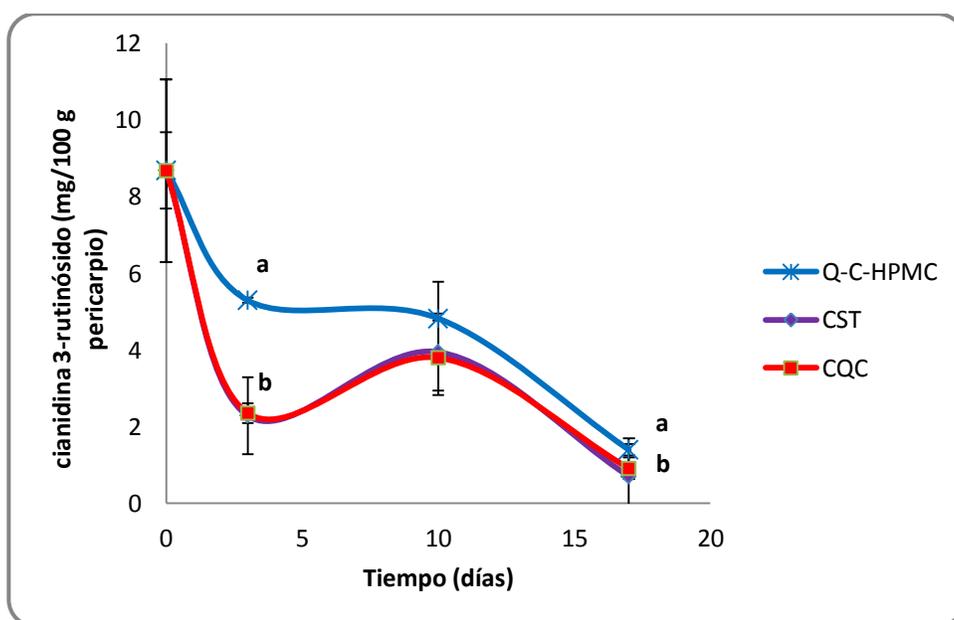


Figura 29.- Evolución de cianidina-3-rutinósido en frutos de litchi CV Brewster tratados con biopolímero Q-C-HPMC frente a dos controles, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) para cada tratamiento en tiempo diferente de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD.

La medida de la absorbancia por espectrofotometría ( $A/g$  pericarpio) también mostró una disminución significativa ( $\alpha = 0.05$ ) durante los primeros tres días de almacenamiento de las antocianinas totales en el pericarpio de los frutos



(anexo13.7.6), resultado congruente que se correlacionó bien con la concentración de cianidina-3-rutinósido obtenida por HPLC (fig. 30).

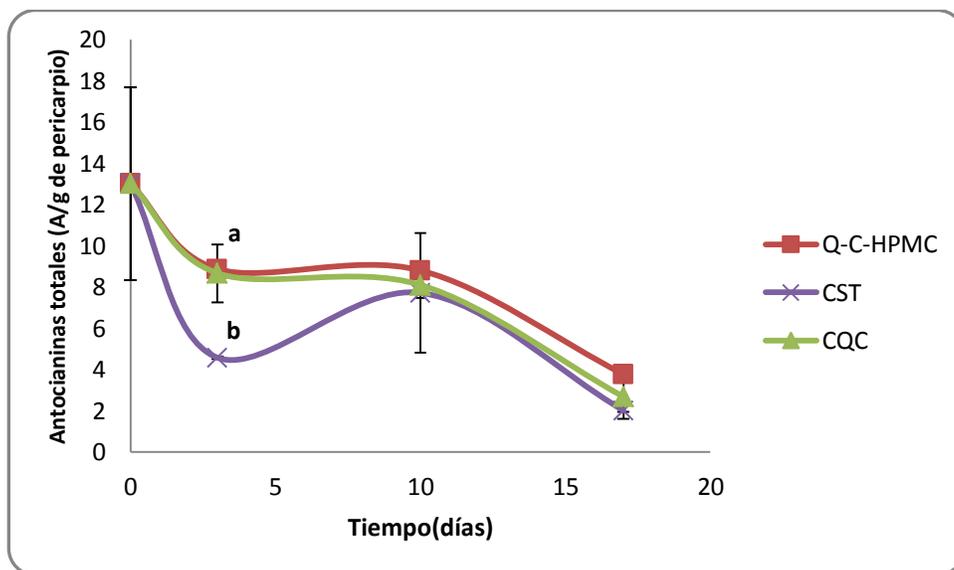


Figura 30.- Antocianinas totales medidas por absorbancia (A/g pericarpio) en frutos de litchi CV Brewster tratados con con biopolímero Q-C-HPMC frente a dos controles, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para cada tratamiento en tiempo diferente de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD.

#### 8.6.1.6. Determinación de fenoles

Los niveles de fenoles totales mediante el método de Folin-Ciocalteu se presentan expresados como mg de catequina por g de pericarpio. En la figura 31, pudo observarse que hubo una mayor concentración de fenoles en los frutos tratados con el tratamiento Q-C-HPMC. Este tratamiento podría disminuir la oxidación de antocianinas y consecuentemente el oscurecimiento del pericarpio de acuerdo al mecanismo propuesto por Jiang, y col., (2004) que sugiere que la acción de algunas enzimas (PDO y la PPO) sobre los fenoles produce productos de oxidación que aceleran la degradación de antocianinas con el subsecuente aumento en la concentración de compuestos de color café.

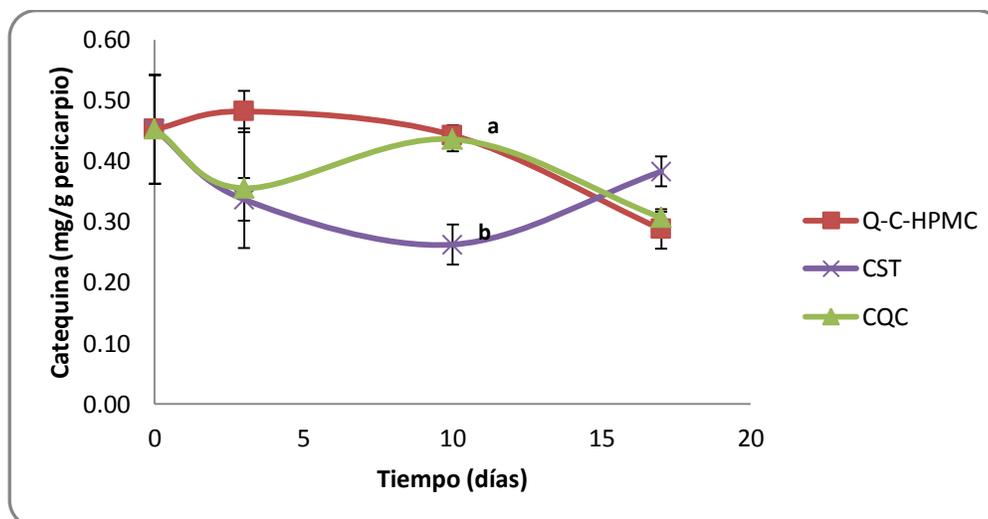


Figura 31.- Concentración de fenoles (mg catequina/g pericarpio) en frutos de litchi CV Brewster tratados con biopolímero Q-C-HPMC frente a dos controles, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) para cada tratamiento en tiempo diferente de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD.

#### 8.6.1.7. pH de la cáscara

Entre los factores que afectan a las antocianinas se encuentra el pH, donde a valores bajos de pH se encuentran en forma de flavilio, si el pH se encuentra dentro del intervalo 4-5 estas se encuentran en su forma incolora carbinol, mientras que a pH's mayores a 5 se produce una base anhidra de color púrpura, en este sentido el pH de la cáscara oscila dentro de un rango de 4.3 a 4.8 no favoreciendo la forma roja flavilio.

Como se aprecia en la tabla 16 el pH inicial de la formulación Q-C-HPMC es de 2.48 y el pH inicial de los frutos sin ningún tipo de tratamiento es de 4.35. Cuando este tratamiento es aplicado a los frutos, prácticamente estos se mantuvieron en el mismo pH, aumentando ligeramente en el día 10 y finalmente un ligero declinó en el día 17, por lo que de acuerdo a las observaciones, el tratamiento Q-C-HPMC mantiene a los frutos oscilando su pH original (fig. 32).

El pH de la formulación original (2.48) probablemente no se conserva en la cáscara debido a la posible existencia de sustancias amortiguadoras que forman parte de esta y que no permiten la disminución de la acidez. Sin embargo, posiblemente la técnica de medición del pH de la cáscara no fue la más adecuada



al tener en cantidades desproporcionadas de cáscara y agua desionizada (1:5) repercutiendo en la validez de la medición, por lo que es recomendable el uso de otra técnica para esta determinación.

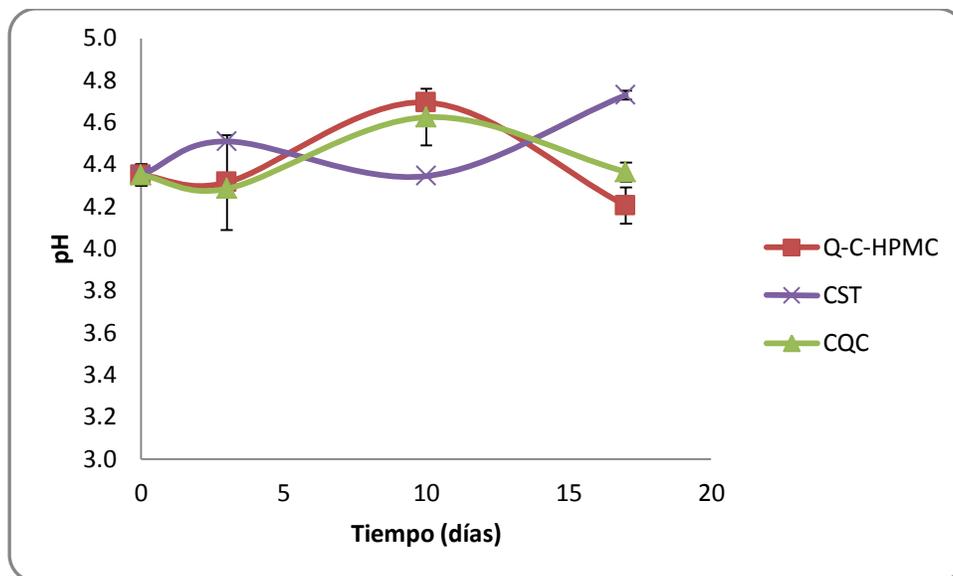


Figura 32.- pH de la cáscara en frutos de litchi tratados con biopolímero Q-C-HPMC frente a dos controles, almacenados a 7°C y 75% HR.

#### 8.6.1.8. Índice de daño

El índice de daño fue evaluado visualmente de acuerdo a una escala numérica de 6 grados donde se tiene a **0**= Ausencia de oscurecimiento, **1**=1-10% de oscurecimiento, **2**=11-20% de oscurecimiento, **3**=21-30% de oscurecimiento, **4**=31-40% de oscurecimiento, **5**=41-50% de oscurecimiento y **6**≥50% de oscurecimiento. Este índice de daño mostro una perspectiva de la degradación del pericarpio y la pérdida de coloración de la superficie de la superficie ya que está directamente relacionado con la calidad visual de los frutos.

En general, los frutos de los cuales inicialmente se partió se encontraron en un grado superior a 4 dentro de la escala hedónica de 6 grados establecida para la clasificación de estos frutos (fig. 33), esto indica que los frutos tenían un grado de oscurecimiento mayor al 31 % y no mayor del 40% en la superficie al inicio del experimento.



**Figura 33.- Litchi inicial antes de aplicar algún tipo de tratamiento.**

Al tercer día de monitoreo el biopolímero a base de Q-C-HPMC fue el que conservó los frutos dentro del mismo nivel inicial ( $31\% \geq \text{oscurecimiento} \leq 40\%$ ) mientras que el copolímero Q-co-C y Q-C-AOX se encontraron cercanos al nivel 6 (oscurecimiento  $\geq 50\%$ ) significativamente más dañados que CQC (quitosano al 0.1% y Cítrico al 1%) y CST que se encontraron dentro del nivel 5 ( $41\% \geq \text{oscurecimiento} \leq 50\%$ ). En el séptimo día de muestreo prácticamente estos 3 tratamientos incluyendo el control se encontraron en el nivel 6 (fig. 34). El análisis estadístico (ANOVA,  $\alpha < 0.05$ ) señala que no hay evidencia de que exista diferencia significativa entre tratamientos, pero si entre tiempos (Ver anexo 13.7.9.)

Al décimo séptimo día de monitoreo aunque hubo una ligera mejora en el ID de los frutos de CST, prácticamente todos se encontraban dentro del nivel 6 de la escala numérica que indica un oscurecimiento mayor al 50%.

De acuerdo al análisis estadístico, en la calidad visual de los frutos al tiempo 17 no existe diferencia significativa entre Q-C-HPMC y los controles CQC y CST.

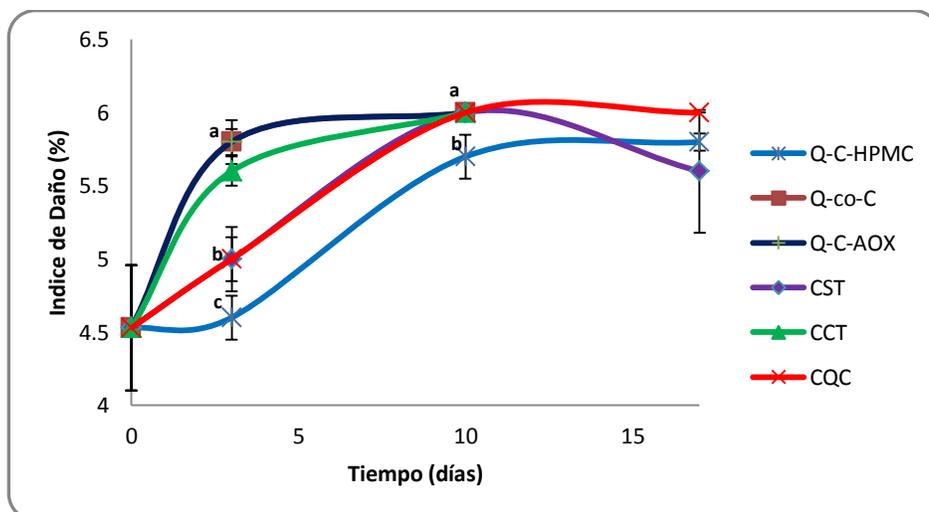


Figura 34.- Índice de daño en frutos de litchi tratados con quitosano durante el almacenamiento a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) en cada tiempo de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD.

#### 8.6.1.9. Determinación de sólidos solubles totales, Acidez titulable (AT) y cociente SST/AT

Como se muestra en la fig. 35, los análisis de concentración de SST no mostraron diferencias significativas ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos (Anexo 13.7.10.), solo al tiempo 10 se observa la formación de dos grupos donde el control 6 muestra ser el que contiene significativamente una cantidad menor de sólidos solubles, en este tiempo, los porcentajes de SST fluctúan entre 19-20%. Al tiempo 17 se observa la misma una misma tendencia de incremento, con porcentajes de SST fluctuando entre 19-21%. Lo anterior sugiere que los azúcares, principales componentes de los SST, no son el principal sustrato respiratorio de los litchis y que los tratamientos con quitosano no afectan este parámetro de calidad.

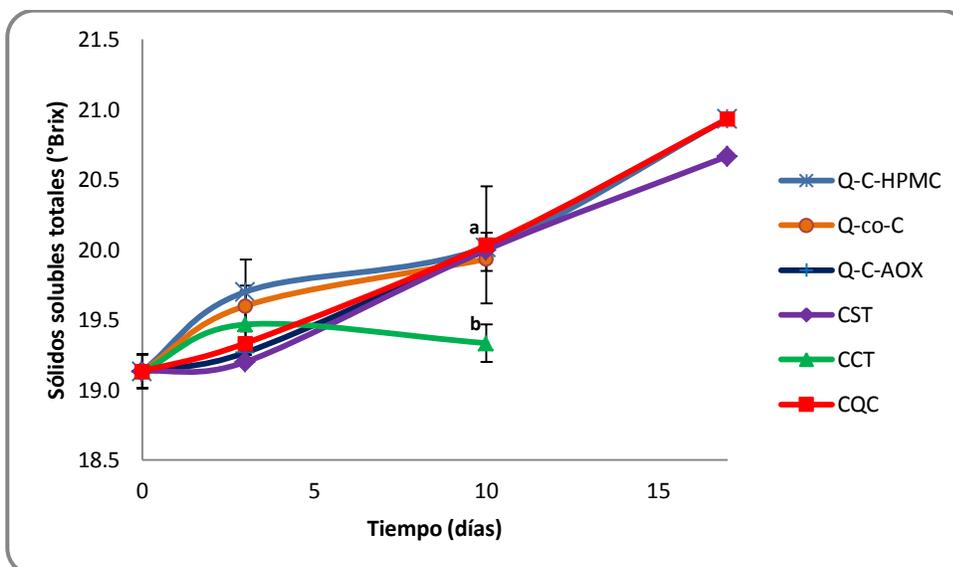


Figura 35.- Sólidos solubles totales de litchi CV Brewster tratados con diferentes formulaciones de quitosano y almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) para cada tiempo de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD

La AT, que es un parámetro importante del sabor y específicamente de la calidad gustativa del fruto (Castillo y col., 2004), disminuyó durante el almacenamiento (fig. 36), observándose un porcentaje mayor de acidez en los frutos CQC. El análisis estadístico ANOVA señala que existe diferencia significativa entre tratamientos y tiempos (anexo 13.7.11.), haciéndose evidente la formación de dos grupos donde son diferentes los tratamientos Q-C-HPMC, Q-co-C, Q-C-AOX y los controles CST y CQC, del control CCT ( $\alpha < 0.05$ ) (Anexo 13.7.11.).

Tomando en cuenta el tiempo 17, el ANOVA señala que no hay diferencia significativa entre el tratamiento Q-C-HPMC y los controles CST y CQC sin embargo, la acidez titulable continúa disminuyendo. Esta disminución de acidez titulable observable sugiere que los ácidos orgánicos son el sustrato empleado en la respiración del fruto.

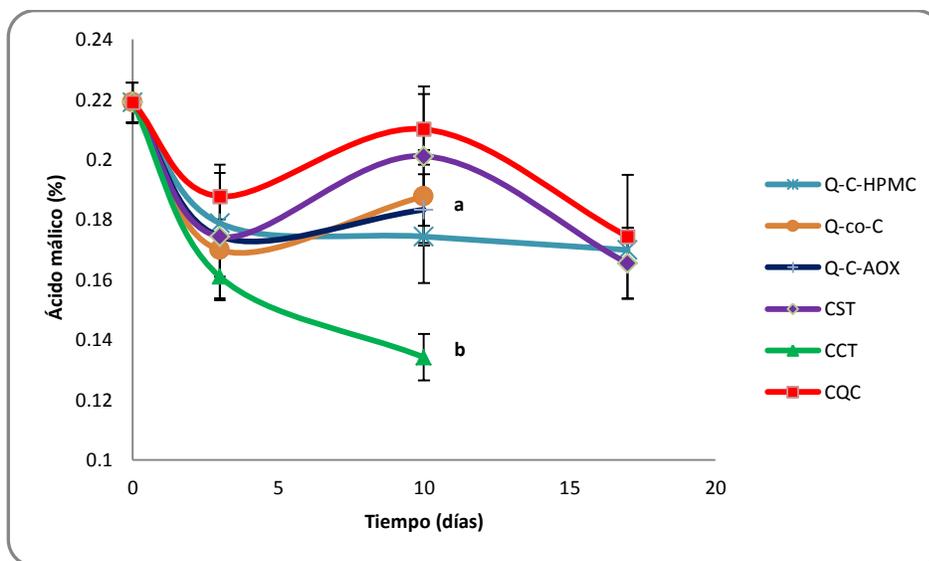


Figura 36.-Porcentaje de acidez titulable reportado en %ácido málico en frutos de litchi CV Brewster tratados con diferentes tratamientos de quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al análisis de comparación múltiple de medias LSD.

Los valores bajos de AT directamente se vieron reflejados en los resultados del cociente SST/AT (fig. 37). Estos valores se elevaron desde 87 (antes del almacenamiento) hasta aproximadamente 145 en el día 10 (CCT). Al décimo séptimo día de almacenamiento, tanto el tratamiento Q-C-HPMC como los controles CQC y CST alcanzan un máximo aproximado de 126 unidades. Cabe señalar que los valores por arriba de 20 y hasta un máximo de 100 son aceptables para el consumo del litchi, pues reflejan una calidad gustativa aceptable (Pelayo-Zaldívar y col., 2006).

Aparentemente la calidad gustativa solo se conserva durante los primeros 3 días de almacenamiento sin embargo, no hay que olvidar que los frutos que inicialmente se tenían se encontraban dentro de un nivel muy alto del cociente SST/AT esto debido al estado de madurez del fruto.

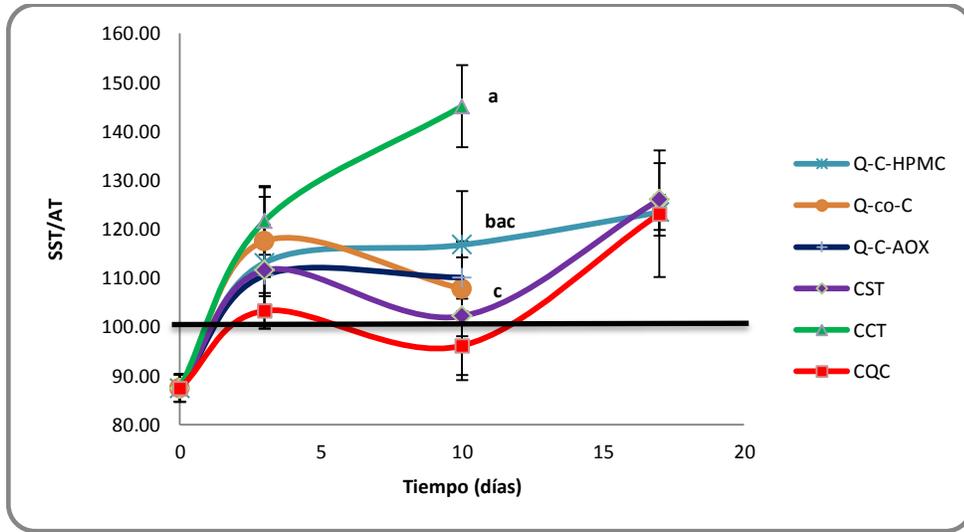


Figura 37.- Cociente SST/AT de litchi CV Brewster tratados con diferentes tratamientos de quitosano, almacenados a 7°C y 75% HR. Letras diferentes indican grupos con diferencia significativa ( $\alpha < 0.05$ ) entre tratamientos de acuerdo al LSD. El cociente SST/AT que representa calidad aceptable se encuentra marcada con la línea.



## 9. CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró la síntesis de un biopolímero a base de quitosano modificado con hidroxipropil metil celulosa (HPMC) mediante un agente de entrecruzamiento de grado alimenticio (ácido cítrico). Así como la formación de las películas y su caracterización mediante métodos analíticos. Por otro lado se demostró que esta funcionalización química permite obtener materiales nuevos con propiedades mecánicas químicas superiores, con una mejor resistencia al vapor de agua a altas humedades relativas y bajas temperaturas.

En su evaluación como recubrimiento se demostró que aunque la formulación a base de quitosano-cítrico-HPMC estabiliza las antocianinas provoca un estrés al fruto el cual se ve reflejado en la aparición de microfisuras y senescencia sin embargo, es importante considerar que los frutos inicialmente se encontraban con un alto índice de daño por lo que para estudios posteriores se debe considerar la calidad de los frutos.



## 10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos permiten ampliar la perspectiva del uso de quitosano como compuesto antimicrobiano y sientan las bases para poder combinarlo con otros compuestos que mejoren ciertas características como recubrimiento.

Se debe profundizar en el estudio del efecto de la proporción de componentes de la formulación del recubrimiento a fin de elegir la adecuada de acuerdo al tipo de alimento.

Es indispensable evaluar el efecto de la aplicación de la formulación como recubrimiento y su distribución en el fruto.

Es indispensable utilizar frutos de excelente calidad con el fin de descartar otras fuentes de variación sobre las variables de respuesta en los bioensayos.

Esta aportación abre la posibilidad de realizar diversos estudios para mejorar y aplicar los materiales obtenidos en la conservación no solo de frutas si no de otros alimentos.



## 11. TRABAJOS PRESENTADOS

### **11.1 Participación en congresos**

Elaboración y caracterización de películas de quitosano y su actividad antifúngica sobre *Penicillium chrysogenum*. Presentado como cartel en XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Querétaro, Qro. 19 a 24 de junio, 2011.

Preparation, characterization and application of chitosan/citric acid/HPMC. Presentado como cartel en 6<sup>th</sup> Iberoamerican Chitin Symposium and 12<sup>th</sup> International Conference on Chitin and Chitosan. Brazil, 2012.



## 12. BIBLIOGRAFÍA

1. Alonso D., Gimeno M., Olayo R., Vazquez-Torres H., Sepúlveda-Sánchez J., Shirai K., 2009. Cross-linking chitosan into UV-irradiated cellulose fibers for the preparation of antimicrobial-finished textiles. *Carbohydrate Polymers* 77: 536-543.
2. Alonso D. 2009. Estudio de la funcionalización de textil de celulosa mediante entrecruzamiento con quitosano, quitoooligosacáridos y microcápsulas de quitosano y evaluación de las propiedades antimicrobianas. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
3. A.O.A.C. 1980. Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
4. AOAC, 2000. Official Methods of Analysis (Horwitz, W. ed.). Gaithersburg, Maryland, EUA. Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. En: Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects. (Salminen, S. y Wright, A. von, eds.), 2<sup>nd</sup> edition.. Marcel Dekker Inc. New York, USA. pp. 1-72
5. ASERCA CIESTAAM. 1996. Mercado mundial de litchi Mexicano. Consultado en línea: [www.aserca.gob.mx/secsa/estudios/litchi.pdf](http://www.aserca.gob.mx/secsa/estudios/litchi.pdf)
6. ASTM D618-00. 2003. Standard practice for conditioning plastics for testing.
7. ASTM D882-97. 2003. Standard practice for conditioning plastics for testing.
8. Atáres, L., Pérez-Masiá, R. and Chiralt, A. 2011. The role of some antioxidants in the HPMC film properties and lipid protection in coated toasted almonds. *Journal of Food Engineering*
9. Aye, K. N., Karuppuswamy, R., Ahamed, T. and Stevens, W. F., 2006. Peripheral enzymatic deacetylation of chitin and reprecipitated chitin particles. *Bioresource Technology*. 97: 577-582.



10. Badui D., S. Química de los alimentos. 3ra Edición. México: Alhambra Mexicana, 1994.
11. Blackwell, J. and Weih, M.A. (1980). Structure of protein chitin complexes: ovipositor of the ichneumon fly *Megarrhysa*. *Journal of Molecular Biology*. 137: 49-60.
12. Bosquez, M., Colina, I. 1999. Fundamentos y aplicaciones del procesamiento térmico de frutas y hortalizas. México., Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
13. Bosquez, M. E., Vernon, J. J., Pérez, L. y Guerrero, L. 2000. Películas y cubiertas comestibles para conservación en fresco de frutas y hortalizas. *Industria Alimentaria*. 22: 14C36.
14. Castillo A.D., Cerón G.A., Pelayo-Zaldívar, C. 2004. Colecta de información sobre el manejo poscosecha de litchi. Reporte de actividades convenio COVIA-0919-2004-07-31. 66pp.
15. Cha, D. y Chinnan, M. 2004. Biopolymer-Based Antimicrobial Packaging: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44:223-237.
16. Chandumpai A., Singhpibulporn N., Faroongsarng D., Sornprasit P. (2004). Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. *Carbohydrate Polymers* 58: 467–474.
17. Chaussard G., Domard A. (2004). New aspects of the extraction of chitin from squid pens. *Biomacromolecules* 5: 559-564.
18. Cira, L.A., Huerta, S., Hall, G.M. and Shirai, K., 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochem*. 37: 1359–1366.
19. Coates, L., Johnson, G. I., Sardud, U. y Cooke, A.W. 1994. Postharvest diseases of lychee in Australia, and their control. Australian Centre for International Agricultural Research. *ACIAR Proceedings*. 58:68–69.
20. Coma, V., Sebti I., Pardon P., Pichavant F.H., Deschamps A. 2003. Film properties from crosslinking of cellulosic derivatives with a polyfunctional carboxylic acid. *Carbohydrate Polymers* 51: 265-271.



21. Coma, V., Martial-Gros A., Copinet A., Salin F. y Deschamps A., 2002. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of food science*. V.67 Nr.3.
22. Cooksey, K., 2001. Antimicrobial food packaging materials. *Addit. Polym.* 8: 6-10.
23. Corona, I., 2011. Síntesis y caracterización de las propiedades mecánicas y antifúngicas de las películas de quitosano-co-cítrico. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México D.F.
24. Debeaufort, F., Martin-Polo, M. y Voilley, A., 1993. Polarity homogeneity and structure affect water vapor permeability of model edible films. *Journal of Food Science*. 58:426-429.
25. Duarte M.L., Ferreira M.C., Marvão M.R., Rocha João. 2002. An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules* 31: 1-8.
26. Ducamp-Collin, M., Ramarson, H., Lebrun, M., Self, G. Reyness M., 2008. *Postharvest Biol. Technol.* 49, 241-246.
27. Einbu, A., Naess, S. N., Elgsaeter, A. and Vårum, K. M. ,2004. Solution properties of chitin in alkali . *Biomacromolecules*, 5: 2048-2054.
28. Fennema, O.R.. *Introducción a la ciencia de los alimentos*. 1ra Edición. España: Reverté, 1985.
29. Flores, R., Barrera-Rodríguez S, Shirai K, Durán-de-Bazúa C. Chitin sponge, extraction procedure from shrimp wastes using green chemistry. 2006. *Journal of Applied Polymer Science*. 104: 3909-3916.
30. Fwu-Long, M., Chin-Tsung, H., Hsiang-Fa, L., Mei-Chin, C., Ya-Ling, C., Chun-Hung, C., y Hsing-Wen, S., 2006. Physicochemical, antimicrobial, and cytotoxic characteristics of a chitosan film cross-linked by a naturally occurring cross-linking agent, aglycone geniposidic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 3290-3296.
31. Galán-Sauco. 1987. *El litchi y su cultivo*. FAO 83. Roma, Italia. Pp 36-41.



32. García-Pérez, C. 2010. Funcionalización enzimática de quitosano con ácido gálico y octil galato empleando peroxidasa de rábano. Caracterización de los materiales y evaluación de sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México D.F.
33. Gayosso-García, L., Yahia, E., González-Aguilar G. 2011. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. *Food Research International* 44: 1284-1291.
34. Gontard, N., Duchez, C., Jean-Luis, C. y Guilbert, S. 1994. Edible composite films of wheat gluten and lipids: water vapor permeability and other physical properties. *International Journal of Food Science and Technology*. 29: 39-50.
35. Hansen, M.E. y Llanes, A., 1994. Applications of crustaceans wastes in Biotechnology. *Fisheries processing: Biotechnological applications*. Edited by A.M. Martin. Chapman & Hall. Londres, pp: 174-205.
36. Hirai, A., Odani, H. y Nakajima, A. 1991. Determination of degree of deacetylation of chitosan by H NMR spectroscopy. *Polymer Bulletin* 26: 87-94.
37. Hosokawa, J., Nishiyama, M., Yoshihara, K. y Kubo, T., 1990. Biodegradable film derived from chitosan and homogenized cellulose. *Ind. Engineer. Chem. Res.*, 29(5):800-805.
38. Hosseinian F., Li W y Beta T. 2008. Measurement of anthocianins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry*. 109: 916-924.
39. Hunter-Lab. 2001. Principios básicos de medida y percepción de color. Consultado en línea : <http://www.hunterlab.com/pdf/color-s.pdf>
40. Jaramillo-Flores M. E., González-Cruz L., Cornejo-Mazón M., Dorantes-Álvarez G. F., Gutiérrez-López y Hernández-Sánchez. H. 2003. Effect of thermal treatment on the antioxidant activity and content of carotenoids and phenolic compounds of cactus pear cladodes (*Opuntia Ficus-Indica*). *Food Science and Technology International*. 9:271-278.



41. Jayakumar, R., Reis RL. , Mano, JF. 2006. Phosphorous containing chitosan beads for controlled oral drug delivery. *J Bioact Compat Polym.* 21:327–40
42. Jang M-K., Kong B-G., Jeong Y-I., Lee C. H., Nah J-W. 2004. Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science* 42: 3423-3432.
43. Jiang, Y.M., Su, X., Duan, X., Lin, W. y Li, Y. 2004. Anoxia treatment for delaying skin browning inhibiting disease development and maintaining the quality of litchi fruit. *Food Technology and Biotechnology.* 42: 131-134.
44. Juárez-Castelán, C. 2010. Estudio de las enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicios de camarón. Tesis de especialización en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
45. Kasai M.R., Arul J., Charlet C. 2000. Intrinsic viscosity-molecular weight relationship for chitosan. *Journal of Polymer Science* 38 (19): 2591-2598.
46. Kays, J.S. 1991. Postharvest physiology of perishable plant products. New York. USA. Editor Kays, J.S. Ed. Van Nostrand Reinhold. West port CT.
47. Ke, D. y Kader, A. 1992. Potential of controlled atmospheres for postharvest insect disinfestation of fruits and vegetables. *Postharvest News and Information.* 3: 31-37.
48. Kester, J. J. y Fennema, O. 1986. Edible films and coatings: a review. *Food Technology.* 48: 47-59.
49. Kjoniksen A. L., Nystrom Bo., Iversen C., Nakken T., Palmgren O., and Tande T. 1997. Viscosity of dilute aqueous solution of hydrophobically modified chitosan and its unmodified analogue at conditions of salt and surfactant concentrations. *Langmuir* 13: 4948-4952.
50. Kumar, M. N. V. R. 2000. A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers.* 46: 1-27.



51. Kurita K., Tomita K., Tada T., Ishii S., Nishimura S-I., and Shimoda K. 1993. Squid chitin as a potential alternative chitin source: Deacetylation Behavior and characteristic properties. *Journal of Polymer Chemistry* 31: 485-491.
52. Lagaron, J., Fernandez-Saiz, P., Ocio, M. 2007. Using ATR-FTIR spectroscopy to design active antimicrobial food packaging structures based on high molecular weight chitosan polysaccharide. *Journal of Agriculture and food chemistry* 55: 2554-2562.
53. Lamarque, G. Cretened, M., Viton, C., Domard, A. 2005. New route of deacetylation of alfa-and beta-chitins by means of freeze pump out thae cycles. *Biomacromolecules* 6: 1380-1388.
54. Lavertu M., Xia Z., Serreqi A.N., Berrada M., Rodrigues A., Wang D., Buschmann M.D., Gupta Ajay. 2003. A validated H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32: 1149-1158.
55. Lee Dong Sun, Yam Kit L. y Piergiovanni Luciano. *Food Packaging Science and Technology*. USA : CRC Press, 2008.
56. Lee H. S. y Wicker L. 1991. Quantitative changes in anthocyanin pigments of lychee fruit during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 40: 263-270.
57. Less R., *Análisis de los alimentos. Métodos analíticos y de control de calidad*. 3ra. Edición. España: Acribia, 1980.
58. McHugh T. H., Avena Bustillos R. y Krochta J. M. 1993. Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*. 58: 889-903.
59. Martin-Polo, M., Voilley, A., Blond, G., Colas, B., Mesnier, M. y Floquet, N. 1992. Hydrophobic films and their efficiency against moisture transfer. 2. Influence of physical state. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40: 413-418.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. Moller Heike, Grelier Stéphane, Pardon Patrick and Coma Véronique. 2004. Antimicrobial and physicochemical properties of chitosano-HPMC-based films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 6585-6591.
64. Montes, E., 2011. Elaboración de películas de quitosano, caracterización y estudio de su efecto antifúngico sobre *Penicillium chrisogenum* en medio de cultivo sólido Czapeck. Trabajo de servicio social. Universidad Autónoma Metropolitana, México D.F.
65. Nemtsev, S. V., Gamzazade, A. I., Rogozhin, S. V., Bykova, V. M. and Bykov, V. P. ,2002. Deacetylation of chitin under homogeneous conditions. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 38(6): 521-526.
66. Orendain, C. 2008. Fuerza de punción, fuerza de tensión y permeabilidad al vapor de agua en películas de gelatina, quitosano y sus mezclas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, México D.F.
67. Orta-López, R. 2010. Aplicación de dióxido de azufre para la conservación del color rojo del litchi (*Litchi Sinensis* Sonn.) cv. Brewster. Escalamiento comercial. Tesina de especialidad en biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, D.F.
68. Pastor, A., 2004. Generalidades de Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones, En Pastor, A. (ed) Pontificia Universidad Católica del Perú, Fondo editorial, pp. 25-71.



69. Pacheco, N. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: Caracterización y aplicación. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. México D.F.
70. Pelayo-Zaldívar, C. 2006. Investigación, asistencia técnica y capacitación para el cultivo y el manejo postcosecha de litchi Mexicano. Convenio COVIA-0718-2005 UAMI-Consejo Nacional de Productores y Exportadores de Litchi A. C. Noviembre 2004-diciembre 2006. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa. México, D.F.
71. Percot, A., Viton, C. and Domard, A. 2003. Optimization of chitin extraction from shrimp shells. *Biomacromolecules*. 4: 12–18.
72. Pesis, E., Marinansky, R., Zauberman, G. y Fuchs, Y. 1993. Prestorage low oxygen atmosphere treatment reduces chilling injuries in avocado fruit. *HortScience*. 29: 1042-1046.
73. Pillai, C.K.S., Willi, P., Sharma, C., 2009. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science* 34: 641-678.
74. Plascencia-Jatomea. 2004. Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas. Tesis de Doctorado en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, México. D.F.
75. Rabea, E. I., Badawy, M.E.T., Stevens, C.V., Smagghe, G. y Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 4: 1457-1465.
76. Ramírez, L., Marin-Cevantes, M. del C., Huerta, S., Revah, S., and Shirai, K., 2006, Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillum fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*. 41: 1106-1110.
77. Rocha-Pino Z., Shirai K., Arias L. y Vázquez-Torres H., 2008. Efecto de la calidad del agua y tamaño de partícula en la producción de quitosano a partir de  $\beta$ -quitina extraída de desperdicios de calamar gigante (*Dosidicus gigas*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. Vol.7, No.3 299-307.



78. Rotta, J., Ávila-Ozório R., Kehrwald, A., De Oliveira-Barra, M., Dias de Melo, R., Amboni, C., Manique-Barreto, P., 2009. Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering* 29: 619-623.
79. Shahidi, F., Arachchi, J. K. V. y Jeon, Y. J., 1999. Food application of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*. 10: 37–51.
80. Shirai, K., Guerrero, I., Huerta, S., Saucedo, G., Castillo, A., Gonzalez, R.O. and Hall, G.M., 2001. Effect of initial glucose concentration and inoculation level of lactic acid bacteria in shrimp waste ensilation. *Enzyme Microb. Tech.*, 28: 446–452.
81. Shirai, K., Guerrero, L.I., Hall, G., 1996. La quitina: ocurrencia, propiedades y aplicaciones. *Ciencia* 47(4): 317- 328.
82. Sebti, I., Chollet, E., Degraeve, P., Noel, C. y Peyrol ,E., 2007. Water sensitivity, antimicrobial, and physicochemical analyses of edible films based on HPMC and/or chitosan. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 693-699.
83. Sivakumar, D., Korsten, L., Zeeman, K., 2007. Postharvest Management on Quality Retention of Litchi during Storage. *Global Science Books* 1: 66-75.
84. Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N.A., 2003. Production, properties, and some new applications of chitin and its derivatives. *Crit. Rev. Food Sci.*, 43: 145–171.
85. Thililertdecha N., Teerawutgulrag A. y Rakariyatham N. 2008. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. *LWT C Food Science and Technology*. 20: 1-7.
86. Underhill, S. y C. Critchley., 1994. Anthocyanin decolorisation and its role in lychee pericarp browning. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 34: 115-122.



87. Underhill, S. y Critchley, C., 1995. Cellular localisation of polyphenol oxidase and peroxidase activity in *Litchi chinensis* Sonn. pericarp. *Australian Journal of Plant Physiology*. 22: 627-632.
88. Vázquez-Gil A., 2008. Estudio y evaluación de las propiedades mecánicas y de barrera de películas de quitosano y k-carragenina. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química, México D.F.
89. Zheng X. y Tian S. 2006. Effect of oxalic acid on control of postharvest browning of litchi fruit. *Food Chemistry*. 96: 519–523.
90. Zhang, Z., Pang, X., Xuwu, D., Ji, Z., Jiang, Y., 2005. Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry* 90: 47-52.



## 13. ANEXOS

### 13.1 Espectrometría de Infrarrojo. Grupos funcionales de $\beta$ -quitina y quitosano.

Tabla 15.- Grupos funcionales del espectro de  $\beta$ -quitina

Frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )	Tipo de Vibración	Grupo funcional
3278.99	$\longleftrightarrow$ Estiramiento O—H Estiramiento $\begin{array}{c} \text{R}-\text{C}-\text{N}-\text{H} \\    \\ \text{O} \end{array}$	R-OH Alcohol Amida secundaria $\begin{array}{c} \text{R}-\text{N}-\text{C}-\text{R} \\   \quad    \\ \text{H} \quad \text{O} \end{array}$
2870.88	C-H	Alcanos
1629.44-1548.30	$\longleftrightarrow$ Estiramiento $\begin{array}{c} \text{R}-\text{C}=\text{O} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	C=O Amida
1373.29	Torsión $\begin{array}{c} \text{H}^- \\   \\ \text{R}-\text{C}-\text{N}^+ \\    \quad   \\ \text{O} \quad \text{R} \end{array}$	-NH-
1026.23	Estiramiento asimétrico	Éter (alifático y cíclico)

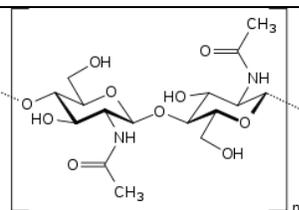


Figura 38.- Estructura de  $\beta$ -quitina



Tabla 16.- Grupos funcionales del espectro de quitosano de calamar.

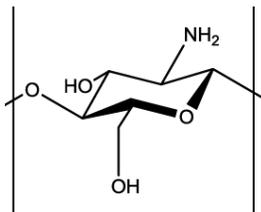
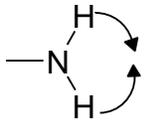


Figura 39.-Estructura de quitosano

Frecuencia (cm <sup>-1</sup> )	Tipo de Vibración	Grupo funcional
3356.85	Estiramiento $\text{O}-\text{H}$ Estiramiento $\text{R}_2-\text{N}-\text{H}$	R-OH Alcohol R-NH-R Amina secundaria
2870.88	C-H	Alcanos
1590.44	Torsión $\text{R}_2-\text{N}-\text{H}(+)$	-NH- Amina secundaria
1648.59	Torsión en el plano 	NH <sub>2</sub>
1019.07	Estiramiento asimétrico	Éter (alifático y cíclico)



### 13.2 Determinación de peso molecular promedio por viscosidad ( $M_w$ )

Se determinó el peso molecular del quitosano mediante viscosidad intrínseca utilizando un viscosímetro de Ostwald con concentraciones de 0,0.5,1,1.5,2 y 4 g/L en ácido acético 2% (v/v)/ acetato de sodio 0.2 M a 25°C. Se determinó el tiempo que tardan las soluciones en recorrer el capilar, estos resultados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17.- Tiempo que tardan en recorrer dentro de un viscosímetro de Ostwald soluciones de quitosano 0, 0.5, 1, 1.5, 2 y 4 g/L en ácido acético 0.35 M/ acetato de sodio 0.2 M a 25°C.

Concentración (g/L)	Concentración real (g/L)	Tiempo (min)
0	0	1.31±0.01
0.5	0.4665	2.34±0.01
1	0.933	2.91±0.01
1.5	1.3995	5.50±0.02
2	1.866	13.29±0.26
4	3.732	31.74±0.96

Posteriormente se calcularon las respectivas viscosidades: relativa, específica, reducida e inherente como se muestra en la tabla 18 y se graficó la viscosidad reducida e inherente con respecto a la concentración de quitosano fig. 40.

Tabla 18.- Cálculo de la viscosidad relativa, específica, reducida e inherente de soluciones de quitosano a diferente concentración.

Vis relativa $\eta=(t/t_0)$	Vis específica $\eta_{sp}=(t-t_0)/t_0$	Vis reducida $\eta_{red}=\eta_{sp}/conc.$	Vis inherente $\eta_{inh}=\ln(\eta_{rel})/conc.$
1.79	0.79	1.69	1.25
2.22	1.22	1.31	0.86
4.21	3.21	2.29	1.03
10.17	9.17	4.91	1.24
24.29	23.29	6.24	0.85

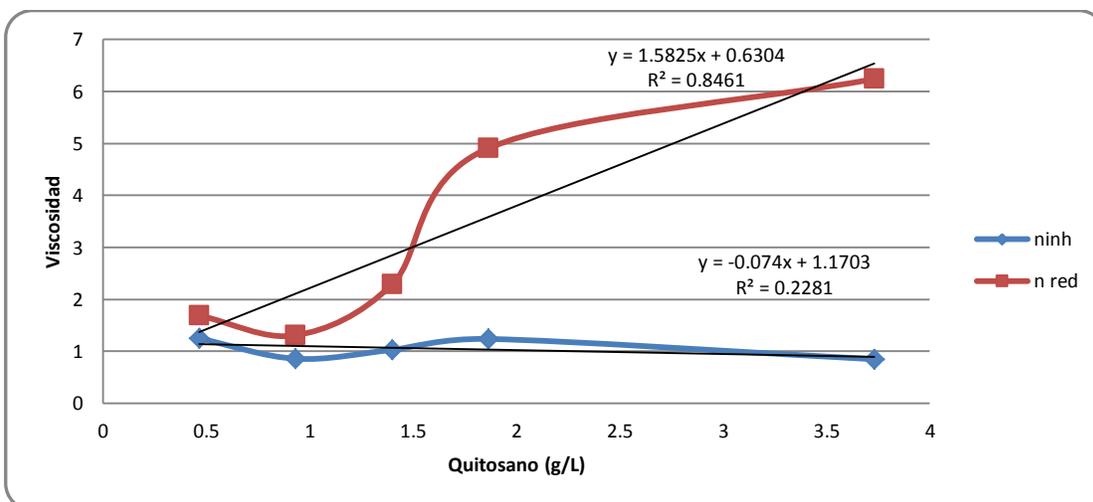


Figura 40.- Viscosidad reducida e inherente con respecto a la concentración de quitosano.

El promedio de las ordenadas es la viscosidad intrínseca. Despejando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada (ecuación 3) podemos calcular el peso molecular (ecuación 22):

$$[\eta] = KM_w^a \quad (3) \quad \left(\frac{\eta}{K}\right)^{\frac{1}{a}} = M_v \quad (21)$$

Donde K es  $1.38 \times 10^{-5}$  L/g; a es 0.85;  $\eta$  es viscosidad intrínseca (Kjoniksen y col., 1997)

$$M_w = 461271.86 \text{ daltons} = 461.3 \text{ kilodaltons}$$



### 13.3 Determinación del grado de acetilación por HRMN

El grado de acetilación fue calculado de acuerdo a la ecuación 1 descrita por Hirai (1991) y Pacheco (2007):

$$DA(\%) = \left( \frac{\frac{1}{3}A_{CH_3}}{\frac{1}{6}\sum_{i=2}^6 A_{Hi}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$A_{CH_3}$  = Área bajo la curva de grupos acetilados

$A_{Hi}$  = Área bajo la curva de los protones H<sub>2</sub>-H<sub>6</sub>

Utilizando el siguiente espectro obtenido para quitosano, calculamos el grado de acetilación (fig. 41).

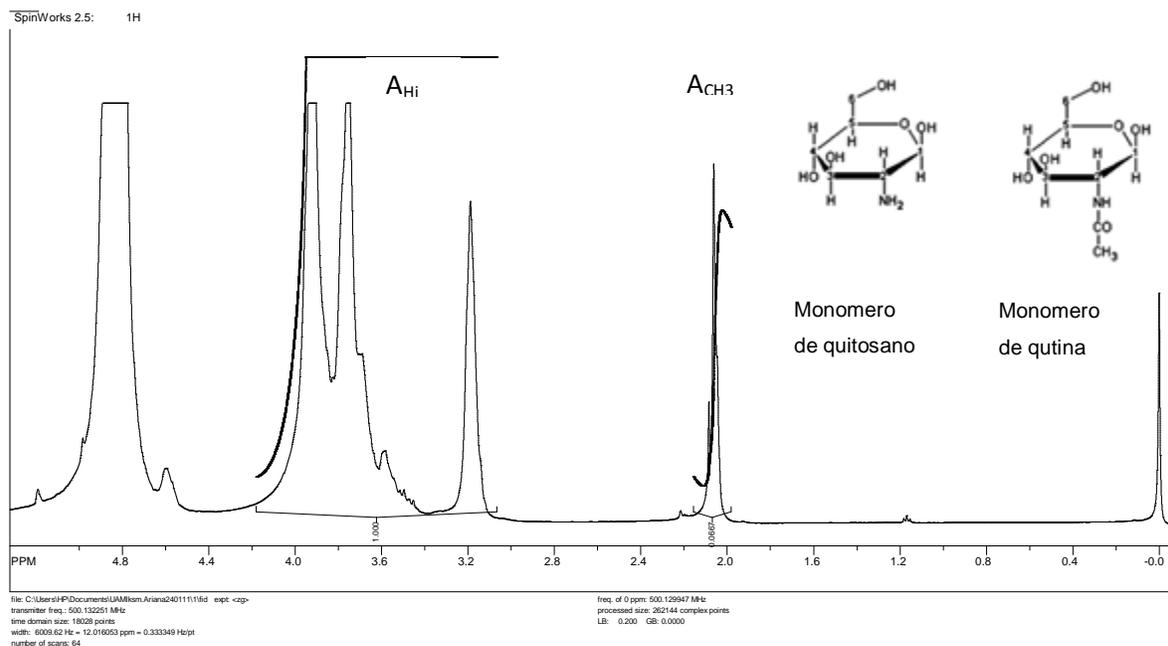


Figura 41.- Espectro de quitosano. HRMN



Por lo tanto:

$$DA(\%) = \left( \frac{\frac{1}{3}(0.0667)}{\frac{1}{6}(1)} \right) \times 100 = 13.34$$

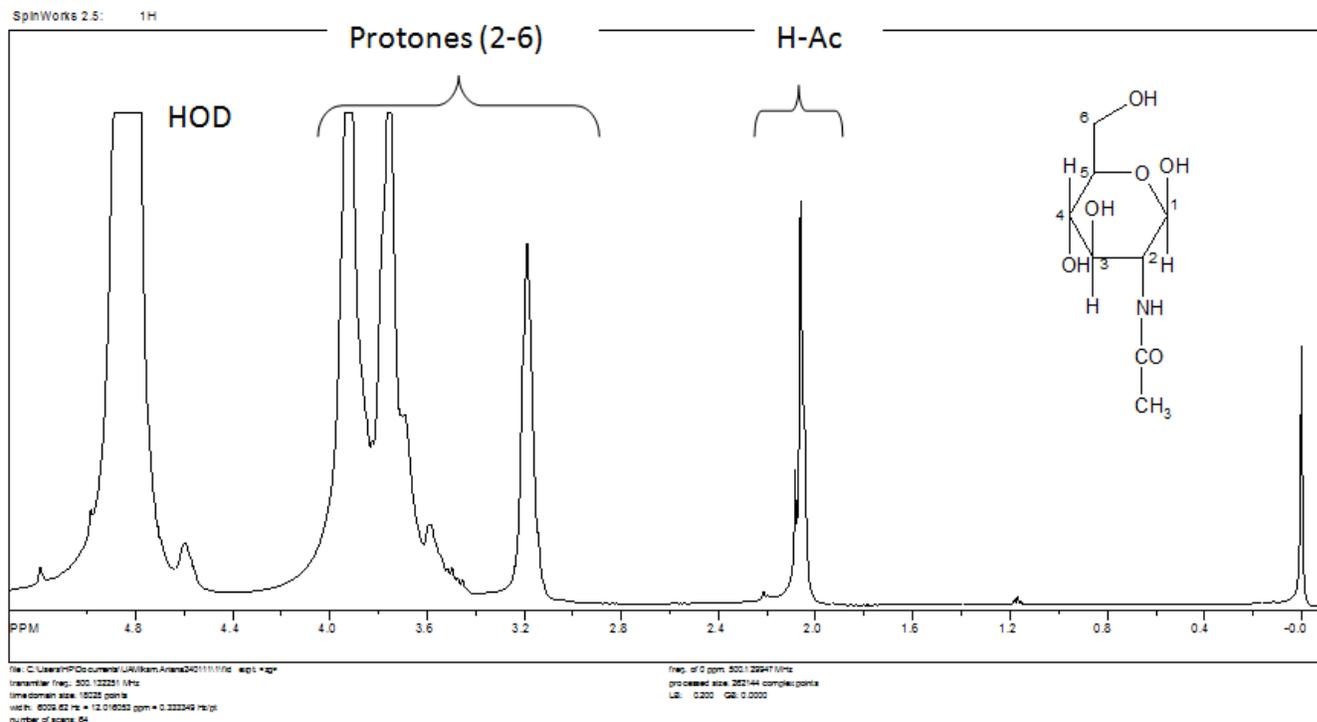
$$D_{deac}(\%) = 86.66$$

Esta determinación se realizó por triplicado a fin de tener un valor promedio y una desviación estándar.



**13.4. Resonancia magnética nuclear de protón del quitosano, el ácido cítrico, la HPMC y la película Q-C-HPMC purificada. Ecuaciones de relación molar y porcentaje de incorporación.**

En las siguientes figuras se muestran los espectros obtenidos para el



**Figura 42.- Espectro de resonancia magnética de quitosano de calamar (*Dosidicus gigas*) quitosano, el HPMC y el ácido cítrico.**

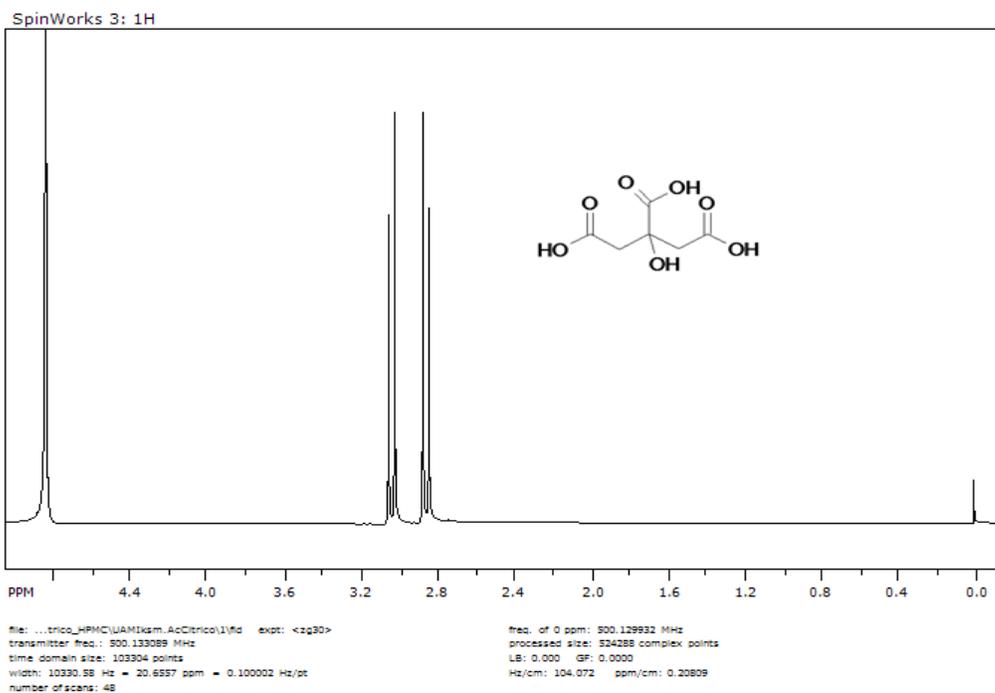


Figura 43.- Espectro de resonancia magnética del ácido cítrico

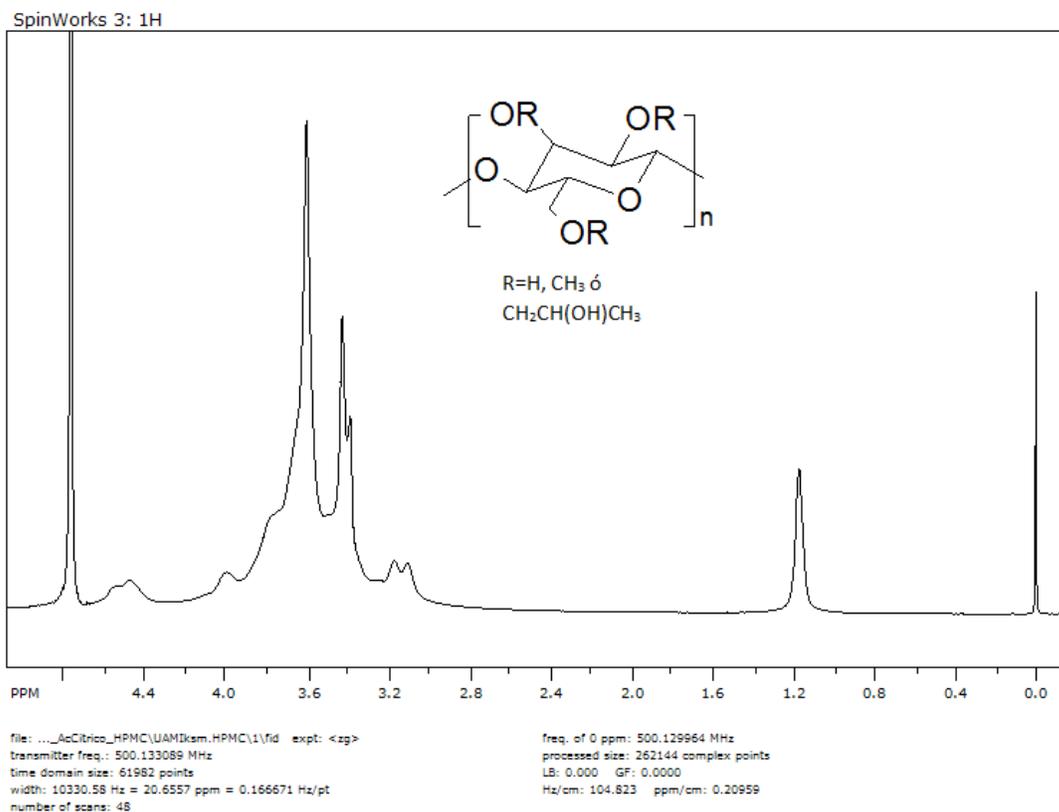


Figura 44.- Espectro de resonancia magnética de la HPMC

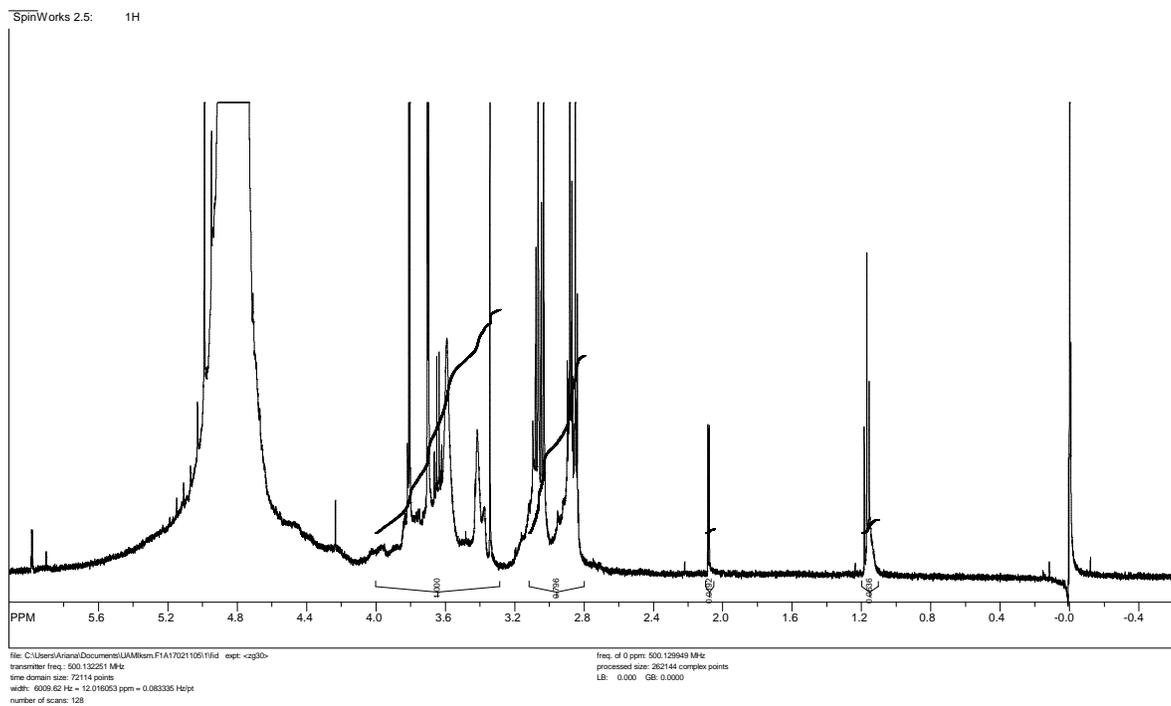


Figura 45.- Espectro de resonancia magnética del quitosano purificado de la formulación 1.



### 13.5 Propiedades mecánicas de las películas.

#### 13.5.1. Señal primaria carga-tiempo

Los datos primarios registrados por la máquina de pruebas son fuerza (lbf) y tiempo (min). Las señales típicas obtenidas son como la mostrada en la figura 46 en la cual se observan las principales zonas de la curva durante la evaluación del comportamiento de una película sometida a punción o extensión (tensión).

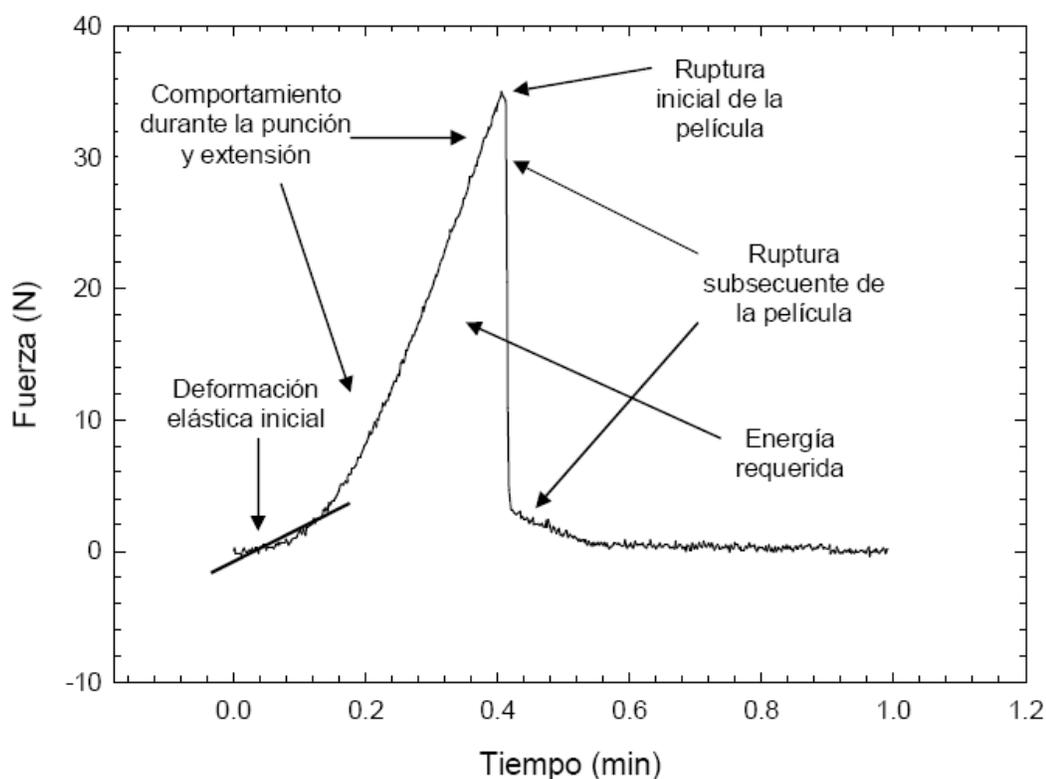


Figura 46.- Señal típica carga-tiempo durante la fuerza de fractura en la punción y en la extensión de una película (Orendain, 2008).

La zona inicial de la señal corresponde a la deformación elástica inicial de la película. Es en esta zona donde el esfuerzo y la deformación relativa son lineales tal como lo establece la ley de Hooke. El comportamiento elástico de la película se manifiesta en esta zona, la pendiente de la gráfica de esfuerzo vs deformación



relativa es el módulo de elasticidad o módulo de Young (E). La siguiente parte de la señal corresponde al comportamiento de la película durante la punción o extensión. Una vez que se ha excedido la zona donde el esfuerzo y la deformación relativa tienen una relación lineal, el material continúa deformándose de una forma no lineal hasta alcanzar su límite máximo de elasticidad, si el material es perfectamente elástico, teóricamente una vez suspendido el esfuerzo antes de alcanzar su límite máximo el material recuperaría su forma inicial. En la práctica, esto no necesariamente ocurre debido a que ha ido ocurriendo una disipación de energía durante dichos esfuerzos, así que el material puede recuperar sólo parcialmente su forma original. Finalmente la zona del punto máximo corresponde al momento de ruptura de la película y la caída que se observa corresponde a la ruptura subsecuente de la misma. En este punto ya no es posible que el material recupere su forma puesto que la ha perdido por completo (Vázquez-Gil, 2008).

### 13.5.2. Tratamiento de datos.

Para la realización de estas determinaciones, se utilizó una máquina de pruebas mecánicas Sintech 1/S (MST, EUA) con una celda de carga de 100 N. Los datos primarios obtenidos de este equipo fueron fuerza (lbf) y tiempo (min). Con los datos de fuerza (lbf) se calculó la fuerza en N y se prosiguió a calcular el esfuerzo nominal mediante la siguiente ecuación:

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (22)$$

donde:

**F** = fuerza aplicada a la película

**A**= Área de la película sobre la que se aplicó la fuerza. Área transversal (diámetro de la punta = 0.013 m y área =  $1.33 \times 10^{-4} \text{ m}^2$ ) para las pruebas de punción y el producto del espesor de la película por el ancho de los listones (1cm) en las pruebas de extensión.



Se calculó la longitud final y la deformación relativa nominal de la película para un tiempo  $t$  de la prueba con las ecuaciones 23,24 y 25:

$$v = \frac{L}{t} \rightarrow L = v \cdot t \quad (23)$$

$$\Delta L = L - L_0 \quad (24)$$

$$t = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (25)$$

donde:

$L$ = Longitud de la película al tiempo ( $t$ )

$L_0$ = Longitud inicial de la película

$t$ = Tiempo

$v$ = 100 mm/min para la fuerza de fractura en la punción y en la extensión.

Se determinó la deformación de Cauchy ( $\epsilon_C$ ) mediante las ecuaciones 26 y 27:

$$\epsilon_C = \frac{\Delta L}{L} = \frac{L_0 - L}{L_0} \quad (26) \quad \text{En la compresión}$$

$$\epsilon_C = \frac{\Delta L}{L} = \frac{L - L_0}{L} \quad (27) \quad \text{En la extensión}$$

Se obtiene la deformación de Hencky ( $\epsilon_H$ ):

$$\epsilon_H = -Ln(1 - \epsilon_C) \quad (28) \quad \text{En la compresión}$$

$$\epsilon_H = Ln(1 + \epsilon_C) \quad (29) \quad \text{En la extensión}$$



Se calcula el esfuerzo normal verdadero ( $\sigma_v$ ) en pascales con los valores obtenidos del esfuerzo nominal ( $\sigma$ ):

$$\sigma_v = \sigma(1 - \varepsilon_H) \quad (30) \text{ En la compresión}$$

$$\sigma_v = \sigma(1 + \varepsilon_H) \quad (31) \text{ En la extensión}$$

Para el cálculo del módulo de Young se grafica el esfuerzo normal verdadero en función de la deformación de Hencky y se obtiene solamente la parte lineal, se calcula regresión lineal y se obtiene la pendiente de la recta.

*13.5.3. Esfuerzos de fractura, deformación de fractura y módulo de Young de películas de quitosano-cítrico-HPMC.*

**Tabla 19.- Esfuerzo de ruptura  $\sigma_v$  (MPa), deformación de fractura  $\varepsilon_H$  y módulo de Young (MPa) en la punción.**

Formulación	Esfuerzo de ruptura $\sigma_v$ (MPa)	Deformación de fractura $\varepsilon_H$	Módulo de Young
2.1	37±2.4	0.73±0.92	57.60±1.65
2.2	74.52±4.23	0.56±0.11	119.96±12.16
2.3	No comparable	No comparable	No comprable

**Tabla 20.- Esfuerzo de ruptura  $\sigma_v$  (MPa), deformación de fractura  $\varepsilon_H$  y módulo de Young (MPa) en la tensión.**

Formulación	Esfuerzo de ruptura $\sigma_v$ (MPa),	Deformación de fractura $\varepsilon_H$	Módulo de Young
2.1	864.31±105.8	0.11±0.01	5335.83±322.12
2.2	2443.28±124.8	0.29±0.14	7961.50±551.25
2.3	No comparable	No comparable	No comparable



### **13.6. Tratamiento de datos. Permeabilidad al vapor de agua (WVP)**

La permeabilidad al vapor de agua (WVP por sus siglas en inglés) se evaluó de acuerdo con el método gravimétrico sugerido por la ANFOR (Asociación Francesa de Normalización, ANFOR H00-030 y reportado por Martín-Polo y col. (1992) y Debeaufort y col. (1993). Este método es similar al método de la ASTM E-96-80 (Association of Standard Testing Methods, USA) reportado por McHugh y col., (1993). Con el incremento de peso de las celdas de prueba evaluando periódicamente, se trazó una gráfica de ganancia de peso (g) vs tiempo (t) y se determinó la pendiente (g/h) de la mejor línea que pasa a través de los datos. La transmisión al vapor de agua (WVT, g/h·m<sup>2</sup>) fue calculada mediante la pendiente obtenida y el área de transmisión de la película (m<sup>2</sup>) como se observa en la ecuación 32. Por último a partir de WVT se calculó la permeancia (g/Pa·s·m<sup>2</sup>) y WVP mediante la ecuación 33 y 34.

$$WVT = \frac{g}{tA} = m/A \quad (32)$$

$$\text{Permeancia: } \frac{WVT}{\Delta p} = WVT/s(R_1 - R_2) \quad (33)$$

$$WVP: \text{Permeancia} \times l \quad (34)$$

Donde: l: Espesor, R1: HR de la cámara (desecador) %, R2: HR de la celda de prueba %, S: presión de vapor de agua (Pa) a la temperatura de prueba.



### 13.7. Análisis estadístico de varianza (ANOVA) de tratamientos aplicados a litchi.

#### 13.7.1. Pérdida de peso

Para determinar si existe diferencia significativa entre los tratamientos de quitosano aplicados al Litchi se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{01}$ =La pérdida de peso es igual para todos los tratamientos y  $H_{02}$ = La pérdida de peso es igual en todos los tiempos.

Tabla 21.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
<b>A: Tratamiento</b>	4	18.34361	4.585901	36.17	0.000000*	1.000000
<b>B: Tiempo</b>	6	848.4493	141.4082	1115.32	0.000000*	1.000000
<b>AB</b>	24	10.40181	0.4334086	3.42	0.000033*	0.999868
<b>Error</b>	70	8.875134	0.1267876			
<b>Total(Adjusted)</b>	104	886.0698				
<b>Total</b>	105					
* Term significant at ( $\alpha<0.05$ )						

#### 13.7.2. Luminosidad

Para determinar si existe diferencia significativa entre la luminosidad de los tratamientos de quitosano aplicados al Litchi se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{01}$ =La luminosidad es igual para todos los tratamientos ,  $H_{02}$ = La luminosidad es igual en todos los tiempos y  $H_{03}$ =La luminosidad es igual durante la interacción tratamiento-tiempo.



Tabla 22.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L.	S.C.	C.M.	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	5	608.8352	121.767	4.82	0.000232*	0.980585
B: Tiempo	2	105864.1	52932.04	2093.90	0.000000*	1.000000
AB	10	589.1552	58.91552	2.33	0.010240*	0.936638
Error	1062	26846.42	25.27912			
Total(Adjusted)	1079	133908.5				
Total	1080					

\* Term significant at alpha = 0.05

En base a estos resultados realizó un análisis de varianza para determinar si existe diferencia significativa entre la luminosidad de los tratamientos de quitosano incluyendo un tiempo 17 únicamente para el tratamiento 1 y los controles 4 y 5, así como una prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{01}$ =La luminosidad es igual para todos los tratamientos y  $H_{02}$ = La luminosidad es igual en todos los tiempos.

Tabla 23.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L.	S.C.	C.M.	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	449.1354	224.5677	10.89	0.000022*	0.990794
B: Tiempo	3	64702.75	21567.58	1045.88	0.000000*	1.000000
AB	6	257.3574	42.89289	2.08	0.053496	0.753258
Error	708	14600	20.62147			
Total(Adjusted)	719	80009.24				
Total	720					

\* Term significant at alpha = 0.05

### 13.7.3. Parámetro cromático $a^*$

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{01}$ = parámetro  $a$  igual para todos los tratamientos,  $H_{02}$ = parámetro  $a$  igual en todos los tiempos y  $H_{03}$ = parámetro  $a$  es igual durante la interacción tratamiento-tiempo.



Tabla 24.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	5	2645.102	529.0204	33.10	0.000000*	1.000000
B: Tiempo	2	13289.46	6644.731	415.76	0.000000*	1.000000
AB	10	2231.395	223.1395	13.96	0.000000*	1.000000
Error	1062	16972.89	15.982			
Total(Adjusted)	1079	35138.85				
Total	1080					

\* Term significant at alpha = 0.05

Al tiempo 17

Tabla 25.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L.	S.C.	C.M.	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	2304.904	1152.452	70.58	0.000000*	1.000000
B: Tiempo	3	10965.24	3655.081	223.85	0.000000*	1.000000
AB	6	906.4548	151.0758	9.25	0.000000*	0.999993
Error	708	11560.63	16.32857			
Total(Adjusted)	719	25737.23				
Total	720					

\* Term significant at alpha = 0.05

#### 13.7.4. Parámetro cromático $b^*$

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $Ho_1$  parámetro “b” igual para todos los tratamientos,  $Ho_2$ = parámetro “b” igual en todos los tiempos y  $Ho_3$ = parámetro “b” es igual durante la interacción tratamiento-tiempo.



Tabla 26.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	5	185.6792	37.13583	4.01	0.001304*	0.951879
B: Tiempo	2	1419.669	709.8345	76.69	0.000000*	1.000000
AB	10	275.4518	27.54518	2.98	0.001049*	0.981756
Error	1062	9829.928	9.256052			
Total(Adjusted)	1079	11710.73				
Total	1080					

\* Term significant at alpha = 0.05

Al tiempo 17

Tabla 27.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L.	S.C.	C.M.	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	51.76713	25.88357	2.94	0.053404	0.573251
B: Tiempo	3	1339.424	446.4747	50.75	0.000000*	1.000000
AB	6	30.67934	5.113224	0.58	0.745514	0.234545
Error	708	6228.886	8.797862			
Total(Adjusted)	719	7650.757				
Total	720					

\* Term significant at alpha = 0.05

### 13.7.5. Análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Determinación de antocianinas

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{0_1}$  Concentración de Cianidina-3-rutinósido igual para todos los tratamientos,  $H_{0_2}$  Concentración de Cianidina-3-rutinósido igual en todos los tiempos y  $H_{0_3}$  Concentración de Cianidina-3-rutinósido igual durante la interacción tratamiento-tiempo.



Tabla 28.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	6.664133	3.332066	0.41	0.674063	0.101350
B: Tiempo	3	185.0852	61.69508	7.55	0.004244*	0.936292
AB	6	6.756793	1.126132	0.14	0.988276	0.071978
Error	12	98.07778	8.173148			
Total(Adjusted)	23	296.584				
Total	24					

\* Term significant at alpha = 0.05

### 13.7.6. Determinación de antocianinas totales por absorbancia

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{01}$ = Concentración de antocianinas igual para todos los tratamientos,  $H_{02}$ = Concentración de antocianinas igual en todos los tiempos y  $H_{03}$ = Concentración de antocianinas igual durante la interacción tratamiento-tiempo.

Tabla 29.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	6.664133	3.332066	0.41	0.674063	0.101350
B: Tiempo	3	185.0852	61.69508	7.55	0.004244*	0.936292
AB	6	6.756793	1.126132	0.14	0.988276	0.071978
Error	12	98.07778	8.173148			
Total(Adjusted)	23	296.584				
Total	24					

\* Term significant at alpha = 0.05

### 13.7.7. Determinación de fenoles

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{01}$ = Concentración de fenoles igual para todos los tratamientos,  $H_{02}$ = Concentración de fenoles igual en todos los tiempos y  $H_{03}$ = Concentración de fenoles igual durante la interacción tratamiento-tiempo.



Tabla 30.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	1.339858E-02	6.699292E-03	1.01	0.392026	0.186351
B: Tiempo	3	0.048419	1.613967E-02	2.44	0.114633	0.466302
AB	6	6.336575E-02	1.056096E-02	1.60	0.230404	0.403874
Error	12	0.079324	6.610333E-03			
Total(Adjusted)	23	0.2045073				
Total	24					

\* Term significant at alpha = 0.05

### 13.7.8. Determinación de pH de la cáscara

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{0_1}$  pH de la cáscara igual para todos los tratamientos,  $H_{0_2}$  pH de la cáscara igual en todos los tiempos y  $H_{0_3}$  pH de la cáscara igual durante la interacción tratamiento-tiempo.

Tabla 31.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	3.943333E-01	1.971667E-01	1.36	0.294605	0.236797
B: Tiempo	3	0.1536125	5.120417E-01	3.52	0.048902*	0.631581
AB	6	0.4471	7.451667E-01	5.12	0.007928*	0.921164
Error	12	0.17455	1.454583E-01			
Total(Adjusted)	23	0.8146958				
Total	24					

\* Term significant at alpha = 0.05

### 13.7.9. Índice de daño

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{0_1}$  Índice de daño igual para todos los tratamientos,  $H_{0_2}$  Índice de daño igual en todos los tiempos y  $H_{0_3}$  Índice de daño es igual durante la interacción tratamiento-tiempo.



Tabla 32.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	5	1.774259	0.3548518	1.72	0.155694	0.526236
B: Tiempo	2	17.8137	8.906852	43.1	0.000000*	1.000000
AB	10	2.166296	0.2166296	1.05	0.425317	0.451684
Error	36	7.44	0.2066667			
Total(Adjusted)	53	29.19426				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0.05

Al tiempo 17

Tabla 33.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L.	S.C.	C.M.	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	0.37	0.188125	0.90	0.418801	0.187234
B: Tiempo	3	12.27076	4.090255	19.63	0.000000*	0.999996
AB	6	0.5131944	0.0855324	0.41	0.864762	0.142625
Error	24	5.001667	0.2084028			
Total(Adjusted)	35	18.16187				
Total	36					

\* Term significant at alpha = 0.05

### 13.7.10. Sólidos Solubles Totales (SST)

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{01}$ = SST igual para todos los tratamientos,  $H_{02}$ = SST igual en todos los tiempos y  $H_{03}$ = SST igual durante la interacción tratamiento-tiempo.



Tabla 34.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	5	0.4542592	9.085185E-02	0.68	0.643845	0.216907
B: Tiempo	2	4.193704	2.096852	15.62	0.000013*	0.99882
AB	10	1.248518	0.1248519	0.93	0.517903	0.399825
Error	36	4.833333	0.1342593			
Total(Adjusted)	53	10.72981				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0.05

Al tiempo 17

Tabla 35.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L.	S.C.	C.M.	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	0.2038889	0.1019444	0.73	0.493824	0.158434
B: Tiempo	3	14.51639	4.838796	34.49	0.000000*	1.000000
AB	6	0.4161111	6.935185E-02	0.49	0.806122	0.165264
Error	24	3.366667	0.1402778			
Total(Adjusted)	35	18.50306				
Total	36					

\* Term significant at alpha = 0.05

### 13.7.11. Acidez titulable (AT)

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{01}$  AT igual para todos los tratamientos,  $H_{02}$  AT igual en todos los tiempos y  $H_{03}$  AT igual durante la interacción tratamiento-tiempo.

Tabla 36.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L	S.C	C.M	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	5	5.861064E-03	1.172213E-03	2.91	0.026322*	0.788189
B: Tiempo	2	0.0252825	1.264125E-02	31.37	0.000000*	1.000000
AB	10	5.967629E-03	5.967629E-04	1.48	0.186692	0.626289
Error	36	1.450613E-02	4.029481E-04			
Total(Adjusted)	53	5.161732E-02				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0.05



Al tiempo 17

Tabla 37.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L.	S.C.	C.M.	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	9.291118E-04	4.645559E-04	0.85	0.438566	0.179072
B: Tiempo	3	1.466598E-02	4.88866E-03	8.98	0.000363*	0.987780
AB	6	1.54852E-03	2.580866E-04	0.47	0.820809	0.159678
Error	24	1.306751E-02	5.444795E-04			
Total(Adjusted)	35	3.021112E-02				
Total	36					

\* Term significant at alpha = 0.05

13.7.12. Cociente SST/AT

ANOVA y prueba de comparación múltiple de medias (LSD) con un nivel de significancia del  $\alpha=0.05$ , siendo  $H_{0_1}$  Cociente SST/AT igual para todos los tratamientos,  $H_{0_2}$  Cociente SST/AT igual en todos los tiempos y  $H_{0_3}$  Cociente SST/AT igual durante la interacción tratamiento-tiempo.

Tabla 38.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L.	S.C.	C.M.	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	5	2563.004	512.6008	2.96	0.024378*	0.796407
B: Tiempo	2	7808.295	3904.147	22.55	0.000000*	0.999980
AB	10	2481.896	248.1896	1.43	0.205388	0.608824
Error	36	6231.97	173.1103			
Total(Adjusted)	53	19085.17				
Total	54					

\* Term significant at alpha = 0.05



Al tiempo 17

Tabla 39.- Análisis de varianza para los diferentes tratamientos y tiempos monitoreados en litchi. Donde G.L.: Grados de libertad, S.C.: Suma de cuadrados, C.M.: Cuadrado medio, N.P.: Nivel de probabilidad. Paquete estadístico NCSS (2007) con efectos significativos  $\alpha=0.05$ .

Variable	G.L.	S.C.	C.M.	F-Calculada	N.P.	Power ( $\alpha<0.05$ )
A: Tratamiento	2	356.2039	178.1019	0.83	0.447799	0.175409
B: Tiempo	3	6167.399	2055.8	9.59	0.000240*	0.991893
AB	6	500.6519	83.44199	0.39	0.878565	0.137091
Error	24	5144.259	214.3441			
Total(Adjusted)	35	12168.51				
Total	36					

\* Term significant at alpha = 0.05