



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE NANORRECUBRIMIENTOS CONTENIENDO
 α -TOCOFEROL SOBRE LOS CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y FISIOLÓGICOS DE
MANZANA FRESCA CORTADA”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

I.A. MOISES JOB GALINDO PÉREZ

TUTOR

Dr. DAVID QUINTANAR GUERRERO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MÉXICO, D.F. JUNIO 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: M. en C. María de los Ángeles Valdivia López

Vocal: Dr. Humberto Hernández Sánchez

Vocal: Dra. Susana Elisa Mendoza Elvira

Vocal: Dra. María de los Ángeles Cornejo Villegas

Secretario: Dr. Arturo Navarro Ocaña

El trabajo experimental se realizó en:

- 1.- Laboratorio de Investigación y Posgrado en Tecnología Farmacéutica (L-323) en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, UNAM.
- 2.- Laboratorio de Procesos de Transformación de Alimentos y Tecnologías Emergentes en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria L-16, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, UNAM.

TUTOR DE TESIS

Dr. David Quintanar Guerrero

PRESENTACIONES EN CONGRESOS

1.- Parte de este trabajo fue presentado en la modalidad cartel en el XXXV Encuentro Nacional de la Academia Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química (AMIDIQ) 2014, con el título “Preparación y estabilidad de nanocápsulas conteniendo α -tocoferol y nanoesferas, y su aplicación como recubrimientos en frutas”.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNAM** y a los profesores que han forjado mi educación académica.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**, por la beca otorgada para realizar los estudios de maestría (**Becario: 288847**).

A los proyectos **PAPITT: IT231511** (Desarrollo de sistemas nanoparticulados alimenticios para incrementar la vida útil y nutracéutica de frutas frescas cortadas y bebidas de frutas) e **IT201914** (Diseño y caracterización de nuevos sistemas de liberación controlada de fármacos ensamblados por la adsorción de nanopartículas en dispersiones micrométricas).

Al **Dr. David Quintanar** y a la **Dra. Luz Zambrano**, por su confianza y apoyo recibido en todo momento desde el punto de vista académico y personal.

A la **M. en I.Q. Alicia del Real López**, por su asistencia para las evaluaciones de microscopía electrónica de barrido.

Al **jurado asignado**, quienes han incrementado la calidad de este trabajo con sus revisiones, correcciones y sugerencias.

DEDICATORIAS

Este trabajo está dedicado con mucho cariño y amor a mi hijo Emiliano, quien ha sido mi motor, mi motivación y mi maestro en esta etapa. ¡Te amo hijito!

Para mis padres Humberto y Georgina y a mis hermanos Isaac y Ezel, por su apoyo brindado en los momentos difíciles cuando más los necesitaba y porque siempre me han motivado a continuar estudiando. Soy afortunado por tener esa familia.

A Vero, que ha estado presente en cada momento durante los últimos años, quién me ha escuchado y apoyado para lograr la culminación de este trabajo, además que hemos logrado formar una familia a pesar de nuestras grandes diferencias. ¡Te amo Vero!, estoy infinitamente agradecido contigo, juntos podemos con todo.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	3
1.1 Frutas frescas cortadas	3
1.2 Factores de calidad de las frutas frescas cortadas.....	4
1.3 Firmeza.....	4
1.3.1 Las enzimas pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG).....	7
1.3.2 Mecanismo de acción de la PME y la PG	8
1.3.3 Métodos de inhibición de la PME y la PG	9
1.4 Apariencia	10
1.4.1 Compuestos fenólicos	11
1.4.2 Oscurecimiento enzimático	14
1.4.3 Métodos para minimizar el oscurecimiento enzimático	16
1.5 Recubrimientos comestibles	20
1.5.1 Goma xantana como recubrimiento comestible	24
1.6 Nanotecnología.....	26
1.6.1 Métodos de preparación de las nanopartículas poliméricas	28
1.6.2 Nanoemulsiones.....	31
1.6.3 Caracterización de las nanopartículas	32
1.6.4 Nanotecnología para la conservación de frutas	33
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	36
2.1 Objetivos	36
2.1.1 Objetivo general	36
2.1.2 Objetivos particulares	36
2.2 Materiales	38
2.3 Material biológico.....	38
2.4 Preparación de las nanopartículas.....	38
2.4.1 Nanocápsulas conteniendo dl- α -tocoferol (nanocápsulas-Toc) y nanoesferas 38	
2.4.2 Nanoemulsión de dl- α -tocoferol.....	39

2.5	Caracterización de los sistemas submicrónicos formadores de película	39
2.5.1	Evaluación del tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersidad (IPD) .	39
2.5.2	Potencial Zeta (ζ).....	40
2.6	Aplicación de las dispersiones formadoras de película en manzana	40
2.7	Caracterización morfológica de los recubrimientos sobre la manzana.....	40
2.8	Pérdida de peso	41
2.9	Color	41
2.10	Determinación de fenoles totales	42
2.11	Actividad PFO.....	42
2.12	Determinación de la firmeza.....	43
2.13	Actividad PME.....	43
2.14	Actividad PG.....	44
2.15	Análisis estadístico	45
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		46
3.1	Caracterización física de las nanopartículas.....	46
3.1.1	Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersidad (IPD)	46
3.1.2	Potencial zeta (ζ)	49
3.2	Caracterización morfológica de recubrimientos sobre la superficie de las manzanas	52
3.3	Pérdida de peso	55
3.4	Cambios en los parámetros de color de las manzanas recubiertas con los diferentes tratamientos	59
3.4.1	Evolución de los valores de L* en la superficie cortada de las manzanas.....	59
3.4.2	Cambio en el valor de a* de las manzanas recubiertas.....	61
3.4.3	Cambios en los valores de b* de las manzanas cortadas y recubiertas.	64
3.4.4	Diferencias totales del color (ΔE^*) de las manzanas recubiertas.....	65
3.5	Fenoles totales en las manzanas tratadas con los diferentes sistemas	71
3.6	Actividad PFO de las manzanas recubiertas	75
3.7	Firmeza de las manzanas recubiertas con los diferentes sistemas	80
3.8	Actividad PME de las manzanas cortadas y recubiertas con las dispersiones	84
3.9	Actividad PG de las manzanas cortadas y tratadas con los diferentes sistemas....	88
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....		92
REFERENCIAS.....		94
ANEXOS		111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Reacción de desmetoxilación y despolimerización catalizadas por la PME y PG respectivamente y el entrecruzamiento de las cadenas desmetoxiladas por la adición de iones Ca^{2+}	6
Figura 2	Rutas biosintéticas de compuestos fenólicos en manzana	12
Figura 3	Estructura conformacional de la PFO de tubérculos de camote (<i>Ipomea batata</i>) con la coordinación de los centros Cu A y Cu B con los residuos de histidina	15
Figura 4	Mecanismo simplificado para la transformación de o-difenoles a melaninas	16
Figura 5	Estructura primaria de la goma xantana	24
Figura 6	Características de las nanopartículas	27
Figura 7	Representación esquemática para la formación de nanopartículas poliméricas usando el método de emulsificación- evaporación	29
Figura 8	Representación esquemática para la formación de nanopartículas poliméricas mediante el método de desplazamiento de disolvente	30
Figura 9	Representación esquemática del proceso de emulsificación-difusión para la formación de nanopartículas poliméricas	31
Figura 10	Esquema general de la metodología para el desarrollo del proyecto de investigación	37
Figura 11	Distribución de los ζ para las dispersiones de nanocápsulas-Toc y nanocápsulas-Toc/xantana	50
Figura 12	Distribución de los ζ de la nanoemulsión-Toc y la nanoemulsión-Toc/xantana	50
Figura 13	Micrografías de la superficie de las manzanas recubierta con los diferentes tratamientos	54
Figura 14	Porcentaje de pérdida de peso de las manzanas recubiertas con las dispersiones	55
Figura 15	Diferencias totales de color (ΔE^*) de las manzanas recubiertas	66
Figura 16	Concentración de fenoles totales en la superficie de las manzanas	

	recubiertas con las diferentes dispersiones	71
Figura 17	Actividad PFO de las manzanas cortadas y tratadas con los diferentes sistemas	76
Figura 18	Cambios en la firmeza de las manzanas recubiertas con las dispersiones durante 14 días de almacenamiento refrigerado	80
Figura 19	Evolución de la actividad PME de las manzanas recubiertas con los diferentes sistemas coloidales	85
Figura 20	Actividades enzimáticas PG para las manzanas recubiertas con las diferentes dispersiones en función al tiempo de almacenamiento	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Tratamientos físicos, químicos y sus combinaciones empleados para la preservación de manzana fresca cortada	17
Tabla 2	Recubrimientos comestibles a base de biopolímeros usados para mantener la calidad de diferentes variedades de manzanas frescas cortadas	22
Tabla 3	Caracterización física de las nanopartículas con y sin goma xantana como dispersiones formadoras de recubrimientos	46
Tabla 4	Valores de L* en la superficie recubierta de las manzanas con los diferentes tratamientos	59
Tabla 5	Valores de a* obtenidos en la superficie recubierta de las manzanas con los diferentes tratamientos	62
Tabla 6	Valores de b* obtenidos de la superficie cortada de las manzanas recubiertas	64
Tabla 7	Fotografías de las manzanas tratadas con los diferentes tratamientos durante 14 días en almacenamiento refrigerado	68

RESUMEN

Se prepararon partículas submicrónicas conteniendo dl- α -tocoferol (nanocápsulas-Toc, nanocápsulas-Toc/xantana, nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana) y sin dl- α -tocoferol (nanoesferas y nanoesferas/xantana). Los sistemas submicrónicos presentaron tamaños de partícula (TP) entre 150 y 260 nm, mostrando los mayores tamaños las nanocápsulas-Toc/xantana (259 nm) y las nanocápsulas-Toc (242 nm). En todos los casos los índices de polidispersidad (PDI) fueron menores a 0.3 y los potenciales zeta (ζ) $>|35|$ mV sugiriendo buena estabilidad física de las dispersiones. Los sistemas submicrónicos se utilizaron como recubrimientos comestibles sobre manzana ‘Red Delicious’ fresca cortada, evaluando su efecto sobre los cambios en la pérdida de peso, en los valores de L^* , a^* , b^* y en las diferencias totales de color (ΔE^*), los fenoles totales, la firmeza y las actividades enzimáticas polifenoloxidasa (PFO) pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG) de la superficie cortada de las manzanas durante 14 días a 4°C. Todos los sistemas presentaron una reducción en la pérdida de peso siendo más evidente con el tratamiento de nanocápsulas-Toc y nanoemulsión-Toc. Con la mayoría de los nanosistemas la máxima expresión de la actividad enzimática PFO se observó varios días después respecto al control, siendo retardada en mayor medida por el recubrimiento nanocápsulas-Toc/xantana y nanocápsulas-Toc; mientras que con las nanoemulsiones-Toc la actividad PFO fue similar al control. Con los sistemas nanoparticulados la actividad PFO se correlacionó mejor con los cambios en los valores de ΔE^* que con la concentración de fenoles totales ya que en la mayoría de los casos su concentración permaneció casi inalterada. También, las partículas submicrónicas tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0.05$) sobre las actividades PME y PG de las manzanas, en especial las nanoemulsiones-Toc y las nanocápsulas-Toc con y sin goma xantana, lo que se correlacionó con una menor pérdida de firmeza del producto. En términos generales los recubrimientos de nanocápsulas-Toc y nanocápsulas-Toc/xantana presentaron los mejores resultados respecto a las variables estudiadas, lo que hace posible el uso de la nanotecnología como herramienta para la conservación de alimentos.

INTRODUCCIÓN

Dentro de las principales ventajas de las frutas y vegetales frescos cortados se encuentran la comodidad y el ahorro de tiempo, ya que en la mayoría de los casos los productos están listos para su consumo; además, aportan una gran cantidad de vitaminas, minerales y otros fitonutrientes como carbohidratos, proteínas y grasas (Lintas, 1992). Entre los compuestos bioactivos más abundantes destacan los antioxidantes tales como el ácido ascórbico, el β -caroteno y los compuestos fenólicos; los cuales, tienen múltiples propiedades fisiológicas *in vivo* e *in vitro* como actividades antialérgicas, anti-caries e inhibidores contra algunas enzimas (Shoji et al, 2004); también, reducen el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares, algunos cánceres, asma y diabetes. Se ha demostrado que las manzanas de la variedad 'Red Delicious' son una fuente importante de compuestos fenólicos, encontrándose diferentes grupos como ácidos hidroxicinámicos, antocianinas, flavonoides, dihidrochalconas y procianidinas (Tsao et al, 2003; Wojdylo et al, 2008).

Entre las principales problemáticas de las frutas frescas cortadas incluida la manzana 'Red Delicious' se encuentran el rápido deterioro del aspecto natural y funcional, lo que afecta en gran medida las características sensoriales y su comercialización. En este aspecto, el oscurecimiento de la superficie cortada es promovido por la enzima (PFO) que cataliza la oxidación de los compuestos fenólicos, disminuyendo la funcionalidad y la aceptabilidad del producto. Además, el corte de los tejidos induce la pérdida de agua y se incrementan las actividades de las enzimas pectinmetilesterasas (PME) y poligalacturonasas (PG), promotoras de la degradación de las pectinas de la pared celular vegetal lo que conlleva a la pérdida de firmeza del fruto (Jolie et al., 2010).

Para mantener la calidad de las manzanas cortadas, se han utilizado los recubrimientos comestibles que sirven como barrera al intercambio de O_2 y CO_2 entre el fruto y el ambiente, inhibiendo las reacciones enzimáticas y disminuyendo la velocidad de respiración. Además, pueden limitar la pérdida de agua y servir como acarreadores de otros aditivos alimenticios como antimicrobianos, agentes antioscurecimiento, nutraceuticos etc., para favorecer la conservación del alimento. Los recubrimientos de segunda generación consisten en la incorporación de los aditivos usando técnicas de microencapsulación o

nanoencapsulación para generar una liberación controlada del compuesto encapsulado (Dhall, 2013).

La nanotecnología ha tenido un gran impacto en diferentes áreas de la ciencia y la tecnología, donde el procesamiento de alimentos no ha sido la excepción. Esta tecnología ha contribuido a generar nuevas técnicas y formas de incrementar la vida útil de alimentos. Los sistemas submicrónicos para uso alimenticio son formados utilizando compuestos generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) y polímeros biodegradables como poli(ϵ -caprolactona), ácido poliláctico-co-glicólico, etc., (Zambrano-Zaragoza et al., 2011). Recientemente, se publicó el uso de nanopartículas lipídicas sólidas en un soporte de goma xantana para incrementar la vida útil de guayabas (Zambrano-Zaragoza et al., 2013). Actualmente se han preparado nanocápsulas conteniendo dl- α -tocoferol para recubrir manzana 'Red Delicious' fresca cortada, indicando que el sistema tiene un importante potencial al incrementar la vida útil, disminuyendo los cambios en el índice de oscurecimiento, textura y manteniendo por más tiempo la calidad de las manzanas (Zambrano-Zaragoza et al., 2014). Sin embargo, el efecto de los nanosistemas sobre las actividades enzimáticas PFO, PME y PG de las manzanas frescas cortadas ha sido poco explorado a pesar de ser criterios muy importantes para establecer y correlacionar su influencia con los cambios que afectan la calidad sensorial y funcional. En base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la aplicación de recubrimientos con base en nanosistemas con dl- α -tocoferol (nanoemulsión y nanocápsulas) y nanoesferas sin dl- α -tocoferol, sobre la pérdida de peso y las actividades enzimáticas PFO, PME y PG, para correlacionarlas con el color, la textura y la concentración de compuestos fenólicos de manzana 'Red Delicious' fresca cortada.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1 Frutas frescas cortadas

Las frutas son fuente importante de fitonutrientes necesarios para las diferentes funciones del organismo. El contenido de carbohidratos en las frutas varía entre 1.5% y 26% teniendo un valor energético moderado, contienen fibra dietética y ácidos orgánicos. Además, proporcionan nutrimentos esenciales como vitaminas y provitaminas (vitamina E, vitamina C y β -carotenos), minerales (Ca, Fe y K), entre otras sustancias bioactivas incluyendo a los compuestos fenólicos, los cuales tienen múltiples propiedades en la prevención de diferentes enfermedades cardiovasculares, asma, diabetes y algunos cánceres (Lintas, 1992). Además, Hsu y Yen, (2008), indicaron que una dieta rica en compuestos fenólicos puede tener un efecto en la disminución de la obesidad, debido a que pueden inducir la apoptosis de los adipocitos, inhibir la pre-adiposis y la acumulación de adipocitos. Se ha demostrado que las manzanas ‘Red Delicious’ contienen gran cantidad de compuestos fenólicos, encontrándose diferentes familias como ácidos hidroxicínámicos, procianidinas, flavonoides y dihidrochalconas (Tsao et al., 2003), siendo las procianidinas y el ácido clorogénico los compuestos que aportan la mayor capacidad antioxidante y en menor medida los glicósidos de quercitina y las dihidrochalconas (Tsao et al., 2005).

Durante las últimas décadas el mercado de las frutas frescas cortadas se ha expandido e incrementado de manera significativa. En 1999 la Asociación Internacional de Productos Frescos cortados (IFPA, por sus siglas en inglés), informó que las ventas anuales ascendían a 3.3 billones de dólares (Olivas y Barbosa-Cánovas, 2005), mientras que para el año 2007 se tuvieron ganancias por 15.5 billones de dólares (James y Ngarmak, 2010) y se ha estimado que tendrá un crecimiento del 20 al 25% durante los siguientes años (Siddiqui et al, 2011). Esta tendencia ha sido promovida por el cambio en el estilo de vida y por la demanda de alimentos saludables y nutritivos. De acuerdo con la IFPA, las frutas frescas cortadas son definidas como “cualquier fruta fresca que ha sido físicamente modificada de su forma original (por pelado o cortado) para obtener un producto 100% comestible que es subsecuentemente embolsado o empacado y almacenado en refrigeración” (Garrett, 2002; Rojas-Graü et al., 2011). La ventaja de estos productos son la comodidad y la conveniencia, ya que en la mayoría de los casos se encuentran listos para su consumo.

1.2 Factores de calidad de las frutas frescas cortadas

La calidad de las frutas frescas cortadas en términos generales, es una combinación de atributos, propiedades o características que determinan su valor para los consumidores. Dentro de estos parámetros se incluyen la textura, la apariencia, el sabor y el valor nutrimental. La calidad de las frutas frescas cortadas está en función de diferentes factores intrínsecos a las materias primas, a la manipulación del producto desde las prácticas agrícolas, en el procesado y durante el almacenamiento (Rico et al., 2007). Por ejemplo, la calidad de las frutas intactas depende en gran medida de la variedad, las prácticas agrícolas, las condiciones climáticas, la madurez de la cosecha y el método de cosechado. Durante el procesado, los factores importantes son los procedimientos en la manipulación, el tiempo entre la cosecha y el procesamiento, los métodos de preparación como las herramientas de corte, el tamaño y el área superficial de la pieza cortada, el lavado, los procedimientos adecuados de saneamiento, la eliminación de la humedad de la superficie etc., y las condiciones de almacenamiento incluyendo la velocidad de enfriamiento, el mantenimiento de los rangos óptimos de temperatura y humedad relativa y la comercialización acelerada (Kader, 2002). Sin embargo, los atributos de calidad de las frutas frescas cortadas tienden a modificarse a lo largo del almacenamiento, estimando la vida útil de este tipo de productos como el tiempo antes de que los atributos de calidad caigan por debajo del límite de aceptación, en las condiciones de almacenamiento estandarizadas (Beaulieu, 2011). La pérdida de calidad en muchos casos es atribuida a los cambios físicos, químicos, bioquímicos, fisiológicos y microbiológicos que han sido promovidos por los procesamientos mínimos de elaboración. Por lo cual, el conocimiento de los factores que provocan el deterioro de la calidad de las frutas frescas cortadas, son esenciales para desarrollar alternativas que minimicen su degradación e incrementar la vida útil de estos productos (Taivonen y Brummell, 2008).

1.3 Firmeza

Dentro de los parámetros texturales, la firmeza y jugosidad son los factores que más influyen sobre la sensación de las frutas frescas cortadas (Toivonen y Brummell, 2008). La

firmeza está determinada en gran parte por la anatomía física del tejido, particularmente el tamaño de la célula, la forma, el espesor de la pared celular, su fuerza, y la adhesión célula-célula. Muchos de estos factores están relacionados entre sí; por ejemplo, los tejidos con células pequeñas tienden a tener un gran contenido de paredes celulares, una cantidad relativamente menor de citoplasma, una gran área de contacto célula-célula, y bajas cantidades de espacios intercelulares, haciendo que el tejido sea más firme y aparentemente menos jugoso. Aunque el grosor de la pared celular y la fuerza son los principales contribuyentes a la firmeza, son características individuales de cada tejido y son determinadas por los factores genéticos. Las células de la pulpa de los frutos en su mayoría son más frágiles que la de los vegetales; además, las paredes celulares son sometidas a una degradación natural durante la maduración del fruto, reduciendo la firmeza de la pared celular y la adhesión (Rico et al., 2007).

La pérdida de agua y los cambios osmóticos también pueden provocar la pérdida de firmeza. La eliminación de agua está asociada a la pérdida de turgencia de las células; la cual, es acelerada en los frutos frescos cortados debido a la ausencia de una cutícula y capas sub-cutáneas y por la exposición al ambiente de los tejidos internos. Además, la senescencia acelerada debido al aumento de los procesos respiratorios, puede provocar el deterioro de la membrana por la acumulación de lipoxigenasas y fosfolipasas. La falta de integridad de la membrana celular propicia el movimiento osmótico de los solutos contenidos en el citoplasma hacia el espacio intercelular resultando en la pérdida de la turgencia (Toivonen y Brummell, 2008).

En las frutas frescas cortadas, otros factores que influyen en la pérdida de firmeza son las actividades de las enzimas pécticas como la PME y la PG que están correlacionadas con el deterioro de la pared celular vegetal, actuando específicamente sobre las pectinas, resultando en la disminución de las fuerzas cohesivas intracelulares como se muestra en la Figura 1. Las enzimas PME catalizan la desmetilación de las cadenas de homogalacturonanos, mientras que las PG hidrolizan los enlaces $\alpha(1-4)$ que une a los ácidos galacturónicos provocando la solubilización de las pectinas y la pérdida de firmeza. Una manera de controlar las actividades enzimáticas PME y PG en las manzanas frescas cortadas es el uso de tratamiento con sales de calcio, los iones de calcio interactúan con los

polímeros pécticos desesterificados para formar una red entrecruzada, incrementando la fuerza mecánica (Jolie et al., 2010).

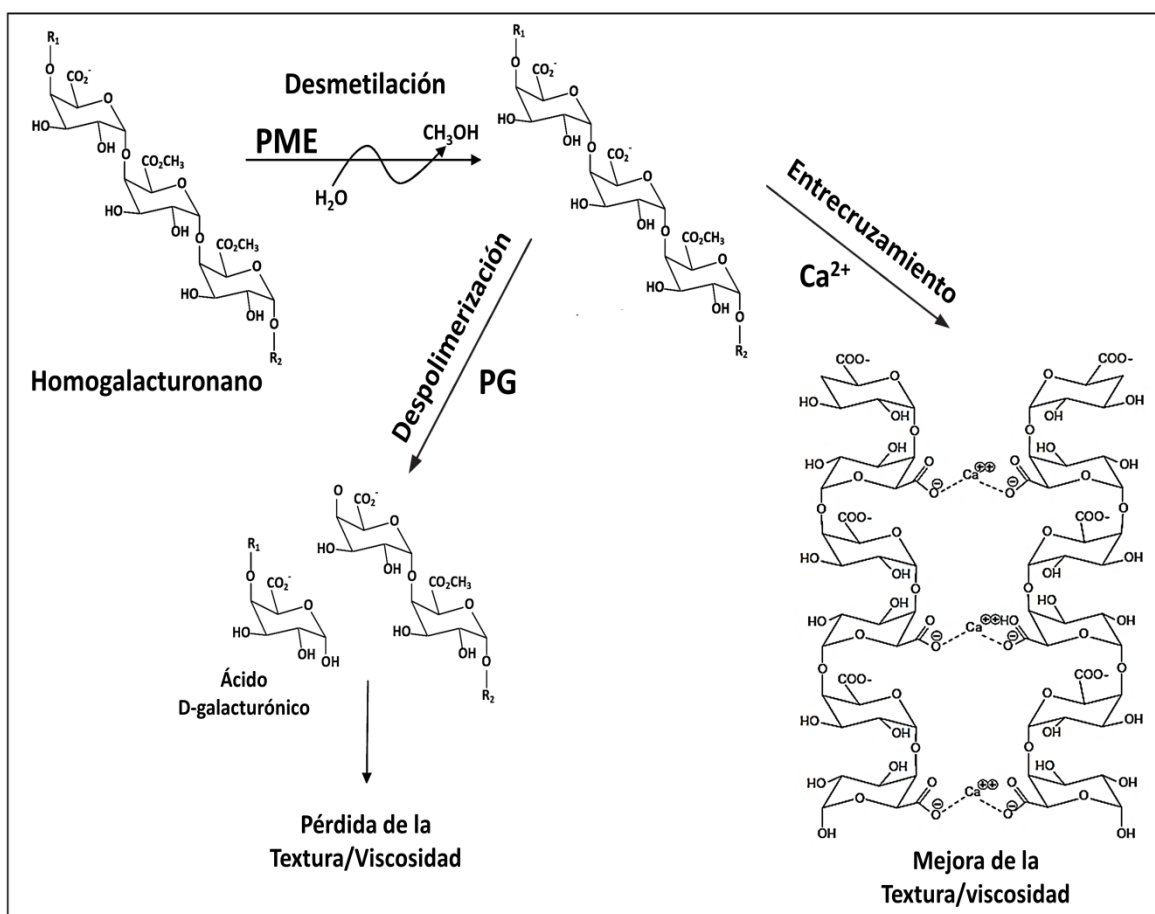


Figura 1: Reacción de desmetoxilación y despolimerización catalizadas por la PME y PG respectivamente y el entrecruzamiento de las cadenas desmetoxiladas por la adición de iones Ca^{2+} (Jolie et al., 2010).

Así mismo se ha observado que la activación controlada de la PME y la adición de iones Ca^{2+} resulta en un mejoramiento de la textura, retardando con ello la senescencia y controlando los desórdenes fisiológicos de las frutas frescas cortadas (García y Barrett, 2002). En manzanas frescas cortadas de la variedad ‘Fuji’ inmersas en una solución de 5 g/L de lactato de calcio se observó un incremento de las actividades PME y PG durante tres semanas en almacenamiento refrigerado a 4°C ; sin embargo, se logró la estabilidad textural y estructural de los trozos cortados (Alandes et al., 2006). De manera similar, Alandes et al. (2009) observaron que las manzanas ‘Fuji’ frescas cortadas sumergidas en una solución

compuesta por lactato de calcio, glutatión, *N*-acetil-L-cisteína y ácido málico, mantuvieron la rigidez estructural de las paredes celulares; además, disminuyeron los cambios en los valores de L^* y a^* por 4 semanas en almacenamiento refrigerado. También, Guang y Fan (2010) evaluaron la aplicación en combinación de propionato de calcio y cloruro de sodio (0.5% y 1% respectivamente) sobre los cambios texturales, visuales y microbiológicos en manzanas ‘Gala’ frescas cortadas, indicando que la mezcla puede ser utilizada para inhibir el oscurecimiento enzimático, disminuir las poblaciones microbiológicas y para mantener la textura.

1.3.1 Las enzimas pectinmetilesterasa (PME) y poligalacturonasa (PG)

Las pectinas son los mayores componentes en la pared celular de las plantas, contribuyendo a la integridad del tejido, la rigidez y a la adhesión entre las células. Las cadenas pécticas pueden estar compuestas de más de 17 diferentes monosacáridos y pueden contener poco más de 20 enlaces diferentes. Generalmente tres polímeros pécticos son encontrados, los homogalacturonanos, los rhamnogalacturonanos I y los rhamnogalacturonanos II. Los homogalacturonanos son homopolímeros lineales donde cada ácido D-galacturónico se encuentra ligado mediante enlaces α (1-4). La cadena se encuentra parcialmente metilesterificada en el grupo carboxilo del C-6 y dependiendo de la fuente, puede estar *o*-acetilada en el C-2 o C-3. Este polímero es considerado el polisacárido péctico más abundante en la pared celular vegetal, encontrándose en una proporción mayor al 60% del total de la pectina. El grado de esterificación en particular ha ganado mucha atención debido a que de ello dependen las propiedades funcionales de la pectina tanto mecánicamente como en los productos que se elaboran a partir de las pectinas (Sila et al., 2009).

Las enzimas pécticas consisten en un diverso grupo de enzimas incluyendo esterasas e hidrolasas, que actúan sobre las cadenas principales de las pectinas (Benen et al., 2003a). Las metilesterasas como las PME's e hidrolasas como la PG's, son enzimas producidas por microorganismos patógenos, bacterias, hongos, insectos, vegetales y por microorganismos simbióticos durante su interacción con las plantas (Benen, 2003b). Las enzimas pécticas han sido identificadas en plantas superiores y examinadas en frutas, hojas, flores y raíces

(Benen et al., 2003c). Estas se encuentran mayormente asociadas con la pared celular vegetal, unidas mediante interacciones iónicas (Micheli, 2001). Las PME's están involucradas en el metabolismo o remodelación de las pectinas de la pared celular, participando en los procesos fisiológicos asociados con el desarrollo vegetativo y reproductivo de la planta; como la extensión de la pared celular y la rigidez, la adhesión celular y la separación, en los procesos de maduración, en la elongación de los tallos, en el crecimiento de las hojas, en la producción de semillas y en el crecimiento del tubo polínico (Benen et al., 2003c). Igualmente, están implicadas en los mecanismos de defensa, bajo estrés biótico y abiótico. Por otra parte, las PG's están clasificadas dentro de una familia de 28 glicosilhidrolasas y se encuentran involucradas principalmente en los procesos de maduración y senescencia de las frutas; por lo cual las PG's son enzimas que están reguladas por el etileno (Pickersgill et al., 1998; Toivonen y Brummell, 2008).

1.3.2 Mecanismo de acción de la PME y la PG

Las PME's catalizan la hidrólisis específica de los ésteres metílicos en el C-6 de los ácidos galacturónicos que componen a la cadena de homogalacturonanos en la pectina, resultando en la formación de un ácido carboxílico, liberando una molécula de metanol y H_3O^+ . Son requeridos grupos carboxilo libres en la vecindad donde actúa la PME, esto hace que la enzima prefiera las pectinas parcialmente desmetoxiladas. El mecanismo de acción de la PME ha sido propuesto a partir de la estructura de la enzima de la zanahoria obtenida mediante cristalografía de rayos X. En este mecanismo, los grupos carboxilatos cargados negativamente en el residuo de ácido aspártico encontrado en el sitio activo, son estabilizados mediante un enlace con un hidrógeno de la arginina, realizando un ataque nucleofílico en un carbonilo del metilester del homogalacturonano, con ello se forma un intermediario tetraédrico negativamente cargado que es estabilizado por un oxianión creado por una o dos cadenas de glicina conservadas. Subsecuentemente, un segundo residuo de ácido aspártico actúa como un donador de protón en el proceso de separación donde el metanol es liberado. El sitio activo vuelve a su forma original por la extracción de un protón de una molécula de agua entrante, resultando en la formación del grupo carboxilato del segundo ácido aspártico y liberando el enlace covalente entre el sustrato y el ácido aspártico. Este reacomodo estructural de las cadenas de homogalacturonanos afecta la

susceptibilidad de la molécula a las subsecuentes reacciones de conversión enzimática (despolimerización) y no enzimáticas (gelificación) (Jolie et al., 2010). Para la PME de manzanas se han obtenido algunas propiedades, por ejemplo la PME de manzana ‘Golden Delicious’ tiene un peso molecular entre 34.5 y 36 kDa con un punto isoeléctrico de 9, con parámetros cinéticos de $k_m=0.098 \text{ mg mL}^{-1}$ y $V_{max}=3.86 \text{ } \mu\text{molmin}^{-1}\text{mL}^{-1}$, usando pectina como sustrato, con un pH óptimo por arriba de 7.5 y una temperatura óptima de 63°C (Denes et al., 2000).

Posteriormente, las PG's hidrolizan los enlaces glicosídicos α (1-4) que se encuentran entre los dos residuos de ácido D-galacturónico, provocando la despolimerización y la solubilización de las pectinas (Benen et al, 2003c). Palanivelu (2006) propuso un mecanismo de acción para las poligalacturonasas basándose en la información disponible sobre los estudios en las modificaciones de los aminoácidos encontrados en el sitio activo, en la secuencia de las proteínas y en los datos cristalográficos por rayos X. En primer lugar se posicionan los aminoácidos del sitio activo en el enlace glucosídico susceptible a hidrolizar, envolviendo a la cadena desesterificada e interaccionando el sitio activo por ambos lados del sustrato mediante múltiples enlaces de hidrógeno para producir la suficiente tensión y distorsión del enlace glucosídico. Posteriormente, los aminoácidos de histidina (His₂₂₃) y de ácido aspártico (Asp₂₀₁) son posicionados en el enlace glucosídico. Un protón es transferido desde la His₂₂₃ catalítica al enlace glucosídico, lo que provoca la ruptura del enlace con la liberación del primer producto y la formación simultánea de un enlace covalente entre el sustrato y el nucleófilo Asp₂₀₁ del sitio catalítico. Otro residuo del ácido aspártico (Asp₂₀₂) posiciona una molécula de agua para provocar un ataque nucleofílico; resultando en la liberación del segundo producto y la restauración del sitio activo de la enzima.

1.3.3 Métodos de inhibición de la PME y la PG

Se han descrito diferentes compuestos para disminuir las actividades PME y PG, siendo el método más utilizado el calentamiento, que ha sido de gran importancia en la elaboración de jugos (Denes et al., 2000); sin embargo, para las frutas frescas cortadas se han propuesto otros métodos químicos para inactivar las enzimas y prolongar la vida útil del producto. Se

ha descrito que la PME puede ser inhibida por diferentes compuestos tanto protéicos y no protéicos. También puede haber inhibición por la presencia de productos finales como ácido poligalacturónico y un número de sustancias como la iodina, los detergentes, los taninos, ácidos fenólicos (ácido gálico y cumárico), azúcares (sacarosa y galosa) y glicerol (Jolie et al., 2010). Los inhibidores protéicos (PMEI) descubiertos inicialmente en kiwis han mostrado inhibir a la enzima, encontrándose la forma activa en frutos completamente maduros, siendo indetectable en frutos no maduros. Este inhibidor protéico es específico para la PME y no actúa sobre otras enzimas degradadoras de polisacáridos, como la PG, la amilasa o la invertasa. La PMEI inhibe un amplio rango de enzimas PME incluyendo las encontradas en naranjas, manzanas, tomates, kiwis, papas, chabacanos, pepinos y fresas, pero es inefectiva para inhibir la actividad PME de hongos, así como de bacterias (Giovane et al., 2004; Pelloux et al., 2007).

En cambio las enzimas PG son inhibidas por iones metálicos u oligogalacturónidos. Las PG de plátanos son inhibidas por iones como Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{1+} y Pb^{2+} , pero es activada por Na^+ , K^+ , Mn^{2+} , Mg^{2+} y Ca^{2+} (Pathak y Sanwal, 1998). Otros compuestos como los polifenoles y los taninos han sido sugeridos para inhibir la actividad enzimática de la PG y se ha demostrado que también puede ser inhibida por pectina y por un exceso de productos como el ácido galacturónico (Niture, 2008).

1.4 Apariencia

La apariencia es la primera característica que define la aceptabilidad de las frutas frescas cortadas, se puede incluir la forma, el color, la brillantez y que se encuentren libres de defectos. Muchos de estos problemas pueden haberse originado antes del cosechado como resultado del ataque por insectos, enfermedades, aves, granizo, etc., o por fallas en la manipulación como deficiencias en las temperaturas recomendables de preparación o almacenamiento. Sin embargo, el mayor defecto de algunas frutas frescas cortadas es el oscurecimiento enzimático, que es provocado por el despedazamiento celular durante el corte de los tejidos, lo que pone en contacto a las enzimas PFO con sus sustratos, dando como resultado el oscurecimiento del tejido a una velocidad que se incrementa con el

aumento de la temperatura. El oscurecimiento enzimático es un problema en frutas como las manzanas y las peras, pero también es un factor importante a considerar en otras frutas y vegetales cortados (Ramírez y Whitaker, 2003). Las reacciones de oscurecimiento son fundamentales para la comprensión de los mecanismos bioquímicos que afectan la calidad de este tipo de alimentos; por lo cual, es importante conocer la localización a nivel intracelular de las enzimas y los sustratos involucrados en este proceso.

1.4.1 Compuestos fenólicos

Las plantas tienen la capacidad de producir una gran variedad de moléculas químicas conocidas como metabolitos secundarios, que no son esenciales en los procesos fotosintéticos o respiratorios pero son requeridos para su supervivencia. Dentro de esta gran clasificación se encuentran los compuestos fenólicos que son caracterizados en su forma fundamental por poseer un anillo de benceno ligado a un grupo hidroxilo (-OH), el término polifenol comprende a compuestos con más de un anillo fenólico (Kefeli et al., 2003). Los compuestos fenólicos poseen actividades bactericidas y fungicidas relacionándose con los mecanismos de protección de las plantas y en algunos casos sirven en la estructuración mediante procesos de lignificación (Cheynier et al., 2013). También actúan como reguladores internos o mensajeros químicos dentro de las plantas. Pueden modular procesos fisiológicos como la regulación de la transcripción, la permeabilidad de las membranas, la transducción de señales y el tráfico vesicular, inhiben el estrés oxidativo y afectan la respiración y la velocidad fotosintética. Esto significa que los fenoles de alguna manera están relacionados en los diferentes procesos como el desarrollo, adaptación, simbiosis y el control de enfermedades en las plantas (Rice-Evans et al., 1996; Williams et al., 2004; Cheynier et al., 2013).

1.4.1.1 Biosíntesis de los compuestos fenólicos

La biosíntesis de los compuestos fenólicos se realiza en los cloroplastos y se encuentra ligada a la ruta del ácido shikímico/fenilpropanoide y en menor medida a la ruta acetato/malonato (Vermerris y Nicholson, 2006). Estas rutas producen compuestos fenólicos monoméricos y poliméricos. En la Figura 2 se muestra un esquema general de la

biosíntesis de los polifenoles en manzanas, incluyendo las enzimas más importantes en el proceso de transformación. Las proteínas involucradas en este proceso son incorporadas dentro de la membrana de los cloroplastos. En este aspecto, la enzima fenilalanina amonioliasa (FAL) tiene un papel fundamental entre la ruta del ácido shikimico y la ruta fenilpropanoide, catalizando la conversión de L-fenilalanina a ácido trans-cinámico, precursor de una amplia variedad de compuestos fenólicos (Choi et al., 2005). La FAL pertenece a la familia de isoenzimas o complejos multienzimáticos que no requieren un cofactor para actuar siendo dependientes de la luz. Sus niveles pueden ser regulados mediante inducción genética o bien por modificación en su actividad (Treutter, 2001).

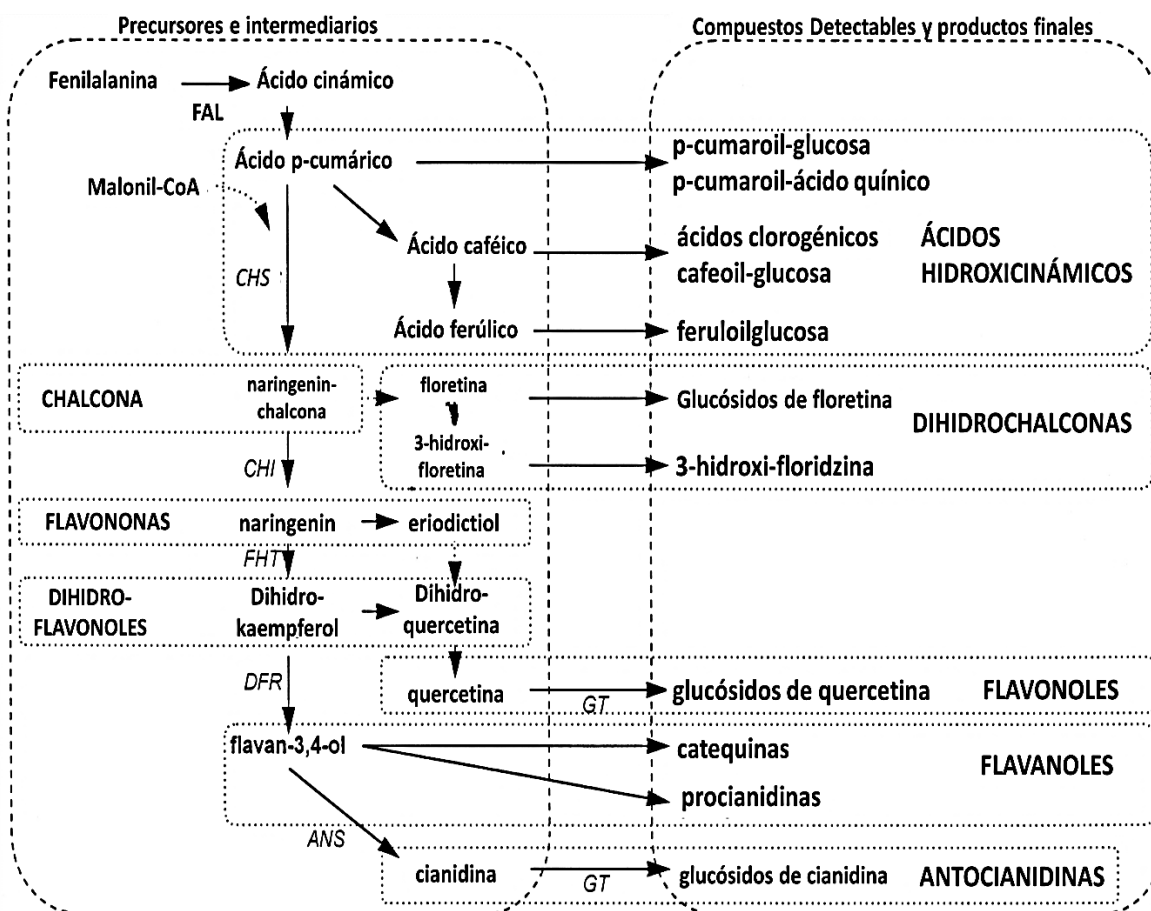


Figura 2: Rutas biosintéticas de compuestos fenólicos en manzana. FAL: fenilalanina amonioliasa; CHS: chalconasintasa; CHI: chalcona flavononaisomerasa; DFR: dihidroflavonolreductasa; ANS: antocianidinsintasa; GT: glicosiltransferasa (Treutter, 2001).

También, las enzimas implicadas en la formación de los compuestos fenólicos finales son dependientes de la luz, lo que hace que sea un factor abiótico promotor de la síntesis de *novo* de los compuestos fenólicos (Treutter, 2001). Las glucosiltransferasas tienen una alta especificidad de sustratos, siendo la dihidrochalcona el principal compuesto glucosidado y las antocianinas el principal flavonol glucosidado. La galactosiltransferasa usa la quercitina y la cianidina como sustratos. Así mismo, la dihidroflavonolreductasa cataliza la formación de leucocianidina que es un precursor para las antocianidinas y los flavan-3-oles (catequinas y epicatequinas) (Treutter, 2001).

Una vez sintetizados, los compuestos fenólicos son transportados a la vacuola donde se encuentra cerca del 97% de los productos fenólicos o bien dentro de otros compartimentos como los apoplastos de la pared celular, cromoplastos, citoplasma y la mitocondria, pero normalmente son cantidades diminutas que están asociadas con funciones metabólicas especializadas (Toivonen y Brummell, 2008).

El evento inicial del proceso de oscurecimiento se produce cuando las membranas se degradan o se rompen, debido a los procesos metabólicos propios de las frutas y vegetales o por las operaciones de procesamiento mínimo, que en consecuencia, genera la mezcla de la PFO y sus sustratos (Kang y Saltveit, 2003; Toivonen y Brummell, 2008). El estrés inducido provocado por el corte de los tejidos propicia un incremento significativo de la actividad FAL; con lo cual, se sintetizan y acumulan compuestos fenólicos en el sitio dañado; a su vez, los fenoles generados son oxidados por la PFO aumentando con ello el oscurecimiento del producto cortado (Treutter, 2001).

Las señales químicas como respuesta al corte de los tejidos aparecen y se mueven a través de las células adyacentes no dañadas a una velocidad cercana a los 0.5 cm h^{-1} (Ke y Saltveit, 1989). Estas señales inducen la transcripción de mRNA (ej. mRNA de la fenilalanina amonioliasa inducida por los cortes), la síntesis de la FAL, la síntesis y acumulación de compuestos fenólicos y el oscurecimiento del tejido alrededor del sitio dañado. Aún no es clara la naturaleza exacta de estas señales, pero se han aislado diferentes compuestos que están implicados en los procesos de señalización de otras plantas como el

ácido abscísico, el etileno, el ácido jasmónico, el metiljasmonato y el ácido salicílico (Ke y Saltveit, 1989; Klessig y Malamy, 1994; Cheynier et al., 2013).

1.4.2 Oscurecimiento enzimático

Las reacciones de oscurecimiento son resultado directo de la interacción de la enzima PFO y los polifenoles; sin embargo, algunos autores han atribuido un rol parcial de la enzima peroxidasa, catalizando directamente la oxidación de los compuestos fenólicos o indirectamente reaccionando con el subproducto H_2O_2 de la oxidación enzimática de los fenoles (Rico et al., 2007). Esta afirmación aún continúa en discusión; por lo cual, sólo se discutirá el papel de la PFO como enzima clave en el desarrollo del oscurecimiento enzimático en frutas frescas cortadas.

1.4.2.1 La enzima polifenoloxidasa (PFO)

Se ha asumido que las PFO de las plantas se encuentran localizadas mayoritariamente en las membranas tilacoidales de los cloroplastos (Ramírez y Whitaker, 2003), pero puede haber cantidades pequeñas en otros organelos y se ha encontrado en el citoplasma de la célula vegetal (Mayer y Harel, 1978). A nivel fisiológico vegetal la PFO está implicada en la formación de pigmentos y la eliminación del oxígeno en los cloroplastos. También, se ha propuesto que está ligada a los mecanismos de defensa de las plantas, oxidando los compuestos fenólicos para producir *o*-quinonas que pueden ligarse con moléculas que poseen nucleófilos como los grupos $-NH_2$ y $-SH$ de los aminoácidos, péptidos y proteínas, con lo cual se reduce su valor nutrimental, haciéndolos poco atractivos para insectos herbívoros (Gooding et al., 2001). Además, Felton y Duffey, (1990) encontraron que las *o*-quinonas generadas por la oxidación del ácido clorogénico tienen el potencial de inhibir la actividad del virus de la poliedrosis nuclear de larvas de *Heliothis zea*. Esto hace que las PFO de frutas y vegetales sean indispensables para la supervivencia de la planta.

La PFO es una metaloproteína que contiene un centro dinuclear de cobre en su centro activo (Whitaker y Lee, 1995). El centro activo de las PFO de diferentes especies como mamíferos, plantas y hongos tienen una característica en común, los átomos de cobre en el centro catalítico son soportados por seis residuos de histidina, tres residuos están ligados al

CuA y el resto al CuB (Marusek et al., 2006). Mediante cristalografía de rayos X sobre la PFO de camotes (*Ipomea batata*) se pudo observar los acoplamientos entre los residuos de histidina y los átomos de cobre como se muestra en la Figura 3. En el estudio realizado por Klabunde et al., (1998) se encontró que la enzima está compuesta por un monómero de 39 kDa de masa molecular y tiene una forma elipsoidal con dimensiones de 55 x 55 x 45 Å. La estructura secundaria es principalmente α -helicoidal con el centro enzimático formado por un paquete de cuatro hélices. Cada uno de los dos sitios activos de cobre están coordinados por tres residuos de histidina, contribuyendo a formar las cuatro hélices. El CuA es coordinado por los residuos His 88, His 109 e His 118, mientras que el segundo centro catalítico, el CuB está coordinado por la His 240, His 244 y la His 274.

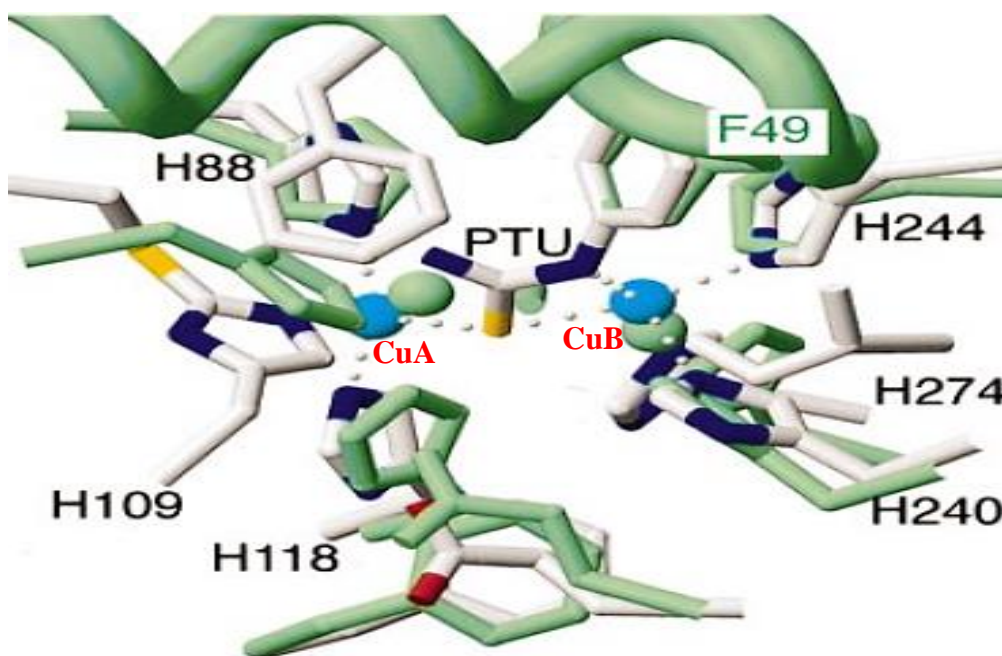


Figura 3: Estructura conformacional de la PFO de tubérculos de camote (*Ipomea batata*) con la coordinación de los centros Cu A y Cu B con los residuos de histidina (Klabunde et al., 1998).

1.4.2.2 Mecanismo de acción de la PFO

El mecanismo que genera el oscurecimiento enzimático involucra la interacción de los sustratos fenólicos con la PFO. Es de resaltar la importancia del oxígeno como molécula

esencial durante el proceso enzimático de oxidación de los fenoles. La PFO cataliza dos reacciones, en primer lugar puede hidroxilar a los monofenoles y convertirlos en difenoles, y en segunda instancia, la oxidación de los difenoles a quinonas como se muestra en la Figura 4. La reacción de hidroxilación es relativamente lenta ($V_{\max} = 1.8 \mu\text{M min}^{-1}$) resultando en productos incoloros. Mientras que la reacción de oxidación es más rápida ($V_{\max} = 24.5 \mu\text{M min}^{-1}$) y el resultado son quinonas coloridas. Las reacciones subsiguientes entre las quinonas generadas provocan la acumulación de melaninas, que son pigmentos rojos, cafés o negros asociados con el oscurecimiento en los tejidos dañados de las frutas. La secuencia de reacciones que provocan los diversos complejos coloridos depende de la estructura específica del sustrato polifenólico (Martínez y Whitaker, 1995).

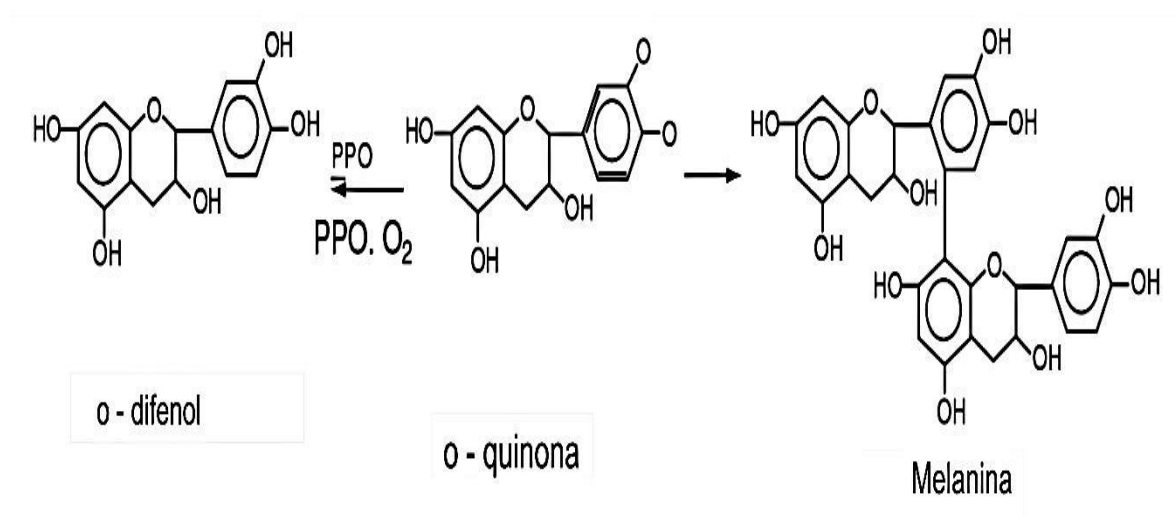


Figura 4: Mecanismo simplificado para la transformación de o-difenoles a melaninas (Lozano, 2006).

1.4.3 Métodos para minimizar el oscurecimiento enzimático

Para disminuir el desarrollo de los compuestos oscuros en las superficies de las frutas y vegetales cortados, se han desarrollado diferentes métodos químicos, físicos y en muchos casos ambos son empleados. En la Tabla 1 se enlistan algunos de los tratamientos químicos, físicos y sus combinaciones que han sido útiles para el control del oscurecimiento enzimático en diferentes variedades de manzanas frescas cortadas.

Tabla 1: Tratamientos físicos, químicos y sus combinaciones empleados para la preservación de manzana fresca cortada.

Método	Variedad de manzana	Tratamiento	Resultados	Referencia
Químico	'Golden Delicious'	10 g/L ácido ascórbico + 2 g/L ácido cítrico; 10 g/L ácido ascórbico + 0.5 g/L cloruro de sodio.	Entre 90 y 100% de inhibición de la PFO, en cubos de manzana inmersos 5 minutos en los sistemas.	Pizzocaro et al., 1993.
Químico	'Red Delicious'	4-hexilresorcinol, ácido isoascórbico, N-acetilcisteína, propianato de calcio.	Conservación de la cantidad de ácido málico y azúcares. Control del oscurecimiento enzimático.	Buta et al., 1999.
Químico	'Liberty'	36 compuestos antioscurecimiento (ácidos carboxílicos, derivados del ácido ascórbico, aminoácidos conteniendo sulfuros, ácidos fenólicos y otros).	Acido oxálico, ácido oxalacético, ácido ascórbico-2-fosfato, cisteína, glutatión, N-acetilcisteína, ácido kójico y 4-hexilresorcinol mostraron inhibición de la PFO y reducción del oscurecimiento.	Son et al., 2001.
Químico	'Red Delicious'	Cysteína, glutatión y productos de la reacción de Maillard,	Inhibición del oscurecimiento enzimático de los compuestos -tiol comparable con el efecto proporcionado por el 4-hexilresorcinol.	Eissa et al., 2006.
Químico	'Red Delicious'	β -ciclodextrinas, 4 hexilresorcinol y metiljasmonato.	Inhibición de la PFO por los tres compuestos teniendo un efecto sinérgico la β -ciclodextrina y el 4-hexilresorcinol	Alvarez-Parrilla et al., 2007.
Físico	'Golden Delicious'	Atmósfera modificada de 90.5% N ₂ + 7% CO ₂ + 2.5% O ₂ en bolsa plástica con permeabilidad de 30 cm ³ /cm ² ·bar·24h.	Vida útil extendida por varias semanas, con la disminución de la PFO hasta del 62% y baja evolución del color.	Soliva-Fortuny et al., 2001.

Físico	‘Granny Smith’	10 µL de Óxido nítrico por litro de aire.	Inhibición del oscurecimiento en la superficie cortada. En otras variedades no se observó el mismo efecto.	Pristijono et al, 2006.
Físico	‘Fuji’	Altas presiones (150 MPa) + Argón	Disminución de la velocidad de respiración y producción de etileno, disminución del oscurecimiento y del crecimiento microbiano.	Wu, et al, 2012.
Físico	‘Red Chief’	Tratamiento de luz UV-C a 1.2 KJ/mol	Reducción de la carga microbiológica y del oscurecimiento, los tratamientos mayores a 1.2 KJ/m ² causan deterioro de la membrana y mayor oscurecimiento.	Manzocco, et al, 2011.
Físico y Químico	‘Golden Delicious’	65% N ₂ O + 25% Ar + 5% O ₂ + 5% CO ₂ ; con pretratamiento de 0.5% ácido ascórbico + 0.5% ácido cítrico + 0.5% cloruro de calcio.	La atmósfera con argón y óxido nitroso mostraron efectos benéficos en el control de la calidad del producto durante 10 días en almacenamiento.	Rocculi et al, 2004.
Físico y Químico	‘Fuji’	20% de jarabe de maíz o 1% HPMC + 0.4 dl- α -tocoferol + 7.5% gluconal + 0.04% lactato de cinc incorporados por impregnación al vacío	Incremento del contenido de vitamina E, calcio y cinc. Retención de las características fisicoquímicas.	Zhao et al., 2005.
Físico y Químico	‘McIntosh’	Recubrimiento comestible a base de: 5% proteína (caseinato de calcio o proteína de suero) + 2.5% glicerol + 2.5% CMC + 0.125 CaCl ₂ .	Disminución del oscurecimiento, la adición de CMC al recubrimiento mejoró el poder antioxidativo.	Tien et al, 2006.
Físico y Químico	‘Granny Smith’ y ‘Pink Lady’	0% a 50% (v/v) de jugo de piña + proceso de alta presión (600 MPa) durante 1 -5 min.	No se observaron cambios en el color. La combinación de los tratamientos reduce significativamente la actividad PFO sin efecto en la actividad PME.	Perera et al, 2010.
Físico y Químico	‘Fuji’	Ultrasonido + ácido ascórbico.	Inactivación de las actividades monofenolasa, difenolasa y peroxidasa	Jang y Moon, 2011.

Entre los métodos físicos la aplicación de calor es capaz de desnaturalizar las enzimas que provocan la pérdida de calidad de muchas frutas frescas cortadas, teniendo varios inconvenientes como el ablandamiento de los tejidos, la pérdida del aspecto fresco y de compuestos termolábiles como las vitaminas, por lo cual se han desarrollado otras alternativas que remplacen a los tratamientos térmicos. Las atmósferas modificadas se han usado para disminuir el oscurecimiento ya que se reduce la concentración de O₂ entre 2 y 5% dentro del empaque inhibiendo las reacciones de oscurecimiento sin provocar la hipoxia del alimento (Rojas-Graü et al., 2011). Las altas presiones también pueden desnaturalizar a las enzimas pero esta tecnología no es aplicable a alimentos con estructuras suaves, si se desea conservar las características de un producto fresco (Perera et al., 2010). La irradiación con longitudes de onda dentro del ultravioleta (UV-C; 200-283 nm), han sido utilizadas para inhibir a la PFO de la superficie cortada de manzanas ‘Red Chief’; pero altos periodos de exposición provocan la destrucción de las membranas celulares produciendo un oscurecimiento mayor (Manzocco, et al, 2011). Los recubrimientos comestibles pueden limitar el transporte de gases entre la fruta fresca cortada y el ambiente externo, generando una atmósfera modificada dentro del alimento; sin embargo, la permeabilidad a los gases de cada recubrimiento comestible es dependiente de las características químicas de los polisacáridos, proteínas o lípidos utilizados para la formación del recubrimiento (Morillon et al., 2002).

Los tratamientos químicos y físicos por si solos tienen deficiencias en el control del oscurecimiento enzimático, por lo cual se han propuesto combinaciones de los métodos para potencializar el efecto sobre las características sensoriales y alargar la vida útil de las manzanas cortadas. Por ejemplo, en manzanas frescas cortadas ‘Golden Delicious’ se han utilizado atmósferas modificadas compuestas por 65% N₂O + 25% Ar + 5% O₂ + 5% CO₂, con pretratamiento mediante inmersión en 0.5% de ácido ascórbico + 0.5% de ácido cítrico + 0.5% cloruro de calcio, con lo cual se mantuvo la calidad de las manzanas por 10 días (Rocculi et al., 2004.). En manzanas ‘Macintosh’ se ha evaluado un recubrimiento con base en 5% proteína como caseinato de calcio o proteína de suero de leche, incluyendo 2.5% glicerol + 2.5% CMC + 0.125% CaCl₂, inhibiendo la producción de compuestos oscuros en las superficies cortadas (Tien et al., 2006). En manzanas de la variedad ‘Fuji’ frescas

cortadas, se han adicionado nutrientes como dl- α -tocoferol, cinc y calcio para fortificar las manzanas mediante infiltración a vacío, encontrando claras diferencias nutrimentales en comparación con las manzanas sin tratamiento; además, se logró mantener las características físicas y fisicoquímicas de las manzanas en por lo menos 14 días en almacenamiento refrigerado a 2 °C y 85% H.R.

1.5 Recubrimientos comestibles

En las últimas dos décadas se ha incrementado el diseño y desarrollo de materiales novedosos que sirvan como recubrimientos comestibles para frutas, vegetales y productos frescos cortados (Falguera et al., 2011). Se han utilizado para prevenir los diferentes desordenes asociados al procesamiento mínimo en frutas frescas cortadas y mantener su calidad durante el almacenamiento del producto. Los recubrimientos comestibles son capas delgadas de un material comestible aplicadas en la superficie del producto, en adición o remplazo de los tejidos protectores naturales (Baldwin et al., 1995; García y Barrett, 2003). Pueden aplicarse directamente en la superficie del alimento por inmersión, atomización o cepillado. Debido a que será consumido junto con el alimento, los ingredientes usados para la preparación de los recubrimientos deben estar aceptados en la lista de aditivos GRAS (Generalmente Reconocidos como Seguros) por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés) de acuerdo a las regulaciones vigentes. Un recubrimiento ideal debe extender la vida útil de las frutas frescas cortadas sin causar anaerobiosis y reducir el decaimiento de las características sensoriales de las frutas frescas cortadas (Lin y Zaho, 2007).

Las ventajas del uso de recubrimientos comestibles incluyen (Dhall, 2013):

- 1.- Mejora la apariencia externa, dando brillo adicional a la superficie recubierta.
- 2.- Reduce la pérdida de peso y mantiene a la fruta firme, manteniendo la frescura.
- 3.- Reduce la velocidad de respiración y la producción de etileno que provoca la senescencia.
- 4.- Se pueden reducir las actividades enzimáticas relacionadas con el deterioro.
- 5.- Previene a las frutas frescas cortadas de los daños por frío y los desórdenes durante el almacenamiento.

- 6.- Actúa como barrera al intercambio de gases y retiene a los compuestos volátiles.
- 8.- Proporciona un soporte para los tratamientos químicos durante la postcosecha.
- 9.- Puede encapsular compuestos aromáticos, antioxidantes, pigmentos, iones etc., para detener las reacciones de oscurecimiento, reducir la carga microbiana y mantener las sustancias nutritivas y funcionales como las vitaminas y los compuestos fenólicos.
- 10.- Reduce el uso de materiales sintéticos de empaque.

Los recubrimientos comestibles pueden ser producidos con materiales que tengan la habilidad de formar películas. Durante su fabricación, los materiales deben ser dispersos en un disolvente como agua, alcohol, mezcla agua-alcohol o una mezcla de otros disolventes. Los plastificantes, agentes antimicrobianos, minerales, vitaminas, colores o saborizantes pueden ser añadidos durante este proceso. El ajuste del pH o el calentamiento de la disolución pueden facilitar la dispersión de los polímeros y los demás aditivos (Dhall, 2013; Falguera et al., 2011). Los recubrimientos comestibles pueden estar compuestos de polisacáridos, proteínas, lípidos y compositos (Lin y Zaho, 2007). Sin embargo, ninguno de los constituyentes por sí solos pueden proveer todas las necesidades de protección; por lo cual, se han utilizado en combinación para mejorar los resultados (Dhall, 2013). En la Tabla 2 se condensan los materiales que han sido utilizados recientemente para fabricar recubrimientos comestibles utilizados en la conservación de diferentes variedades de manzana. Se han usado biopolímeros como proteínas (gelatina, zeína, proteína de suero de leche, caseínas) y polisacáridos (alginato, carrageninas, gellan, quitosano, pululano, xantana, almidones etc) para producir recubrimientos comestibles e incrementar la vida útil de las manzanas frescas cortadas. También se han utilizado polímeros insolubles en agua como el quitosano, logrando disminuir la velocidad de respiración de manzanas ‘Fuji’ frescas cortadas; con ello las reacciones de oxidación (Qi et al., 2011). Se ha observado que los polímeros hidrosolubles nos son buenas barreras a la transmisión de vapor de agua con lo cual se exhiben mayores pérdidas de peso en comparación con recubrimientos hidrófobos o mezclas con componentes lipídicos como ceras o aceites, que en cierta medida han mejorado las propiedades de barrera y la disminución en el porcentaje de pérdida de peso (Perez-Gago et al., 2006; Rojas-Graü et al., 2007a). También, los recubrimientos comestibles han sido usados para acarrear aditivos como antioxidantes, lípidos, vitaminas, nutraceuticos, saborizantes, entre otros aditivos para potencializar el efecto protector.

Tabla 2: Recubrimientos comestibles usados para mantener la calidad de diferentes variedades de manzanas frescas cortadas

Variedad de manzana	Formulación del Recubrimiento	Efecto del recubrimiento	Referencia
'Bravo de Esmolfe'	2% p/p alginato + 50% p/p glicerol; 5% p/p gelatina + 50% p/p glicerol; 5% p/p gelatina + 20% p/p glicerol	Reducción de la pérdida de peso y se mantuvo la firmeza.	Moldao-Martins et al., 2003.
'Fuji'	0.5 % p/v κ-carragenina + 50% p/p glicerol + agentes antioscurecimiento ¹ ; 5% p/p proteína de suero + 2.5% v/v glicerol + 0.25% p/v CMC + 0.125% p/v CaCl ₂ + agentes antioscurecimiento ¹	Disminución de la velocidad de respiración inicial, se prolongó la vida útil por dos semanas, se inhibió la pérdida de firmeza.	Lee et al., 2003.
'Golden Delicious'	Emulsión conteniendo 10% p/p proteína de suero + glicerol en la fase acuosa y cera de abeja fase lipídica	Disminución en el índice de oscurecimiento, sin efecto en la pérdida de peso	Perez-Gago et al., 2005.
'Golden Delicious'	10% p/p proteína de suero + 20% p/p cera de abeja + glicerol + antioxidantes ²	Reducción en el oscurecimiento, sin efecto en la pérdida de peso.	Perez-Gago et al., 2006.
'Fuji'	2% p/v alginato + glicerol + antioxidante ³ + aceite de girasol; 0.5% p/v gellan + glicerol + antioxidante ³ + aceite de girasol	Incremento de la resistencia al vapor de agua por la adición de lípidos y se mantuvo el color por la adición del antioxidante.	Rojas-Graü et al., 2007a.
'Fuji'	26% p/p puré de manzana + 2% p/p alginato + 1.5% p/p glicerol + aceites esenciales ⁴ + antioxidantes ⁵	Reducción de la velocidad de respiración, se mantuvo el color y la textura, se inhibió el crecimiento microbiano.	Rojas-Graü et al., 2007b.
'Fuji'	2% p/v alginato + 1.5% p/v glicerol 0.5% p/v gellan + 0.6% p/v glicerol	Mantuvieron la firmeza y el color, retardando el deterioro microbiológico.	Rojas-Graü et al., 2008.
'Gala'	2 g/L Quitosano	Disminución en el crecimiento de <i>Penicillium sp.</i> y <i>Alternaria sp.</i>	Garrido y De Brito, 2011.
'Braeburn'	1% p/v alginato + oligofructosa/inulina	Disminución de los cambios en el índice de oscurecimiento, acidez y firmeza.	Rößle et al., 2011.

‘Fuji’	1% quitosano + 0.5% CaCl ₂ + 2% ácido ascórbico	Disminución de la velocidad de respiración inicial, retardaron el oscurecimiento enzimático y la pérdida de textura.	Qi et al., 2011.
‘Gala’	Emulsión o/w compuesta por almidón de yuca + glicerol en la fase acuosa con cera de carnauba + ácido estéarico en la fase lipídica	Disminución de la velocidad de respiración y la permeabilidad de vapor de agua	Chiumarelli y Hubinger, 2012.
‘Taaptimjaan’	1% p/v Goma konjac + glicerol + extracto de piña	Reducción de la pérdida de peso, se retardó el oscurecimiento y se inhibió la actividad PFO.	Supapvanich et al, 2012.
‘Fuji’	1% pululano + 0.8 glutatión + 1% quitooligosacáridos	Retardo del oscurecimiento enzimático, se mantuvo la firmeza, decreció la pérdida de peso y se inhibió el crecimiento microbiano y la respiración.	Wu y Chen, 2013.
‘Gala’	0.5 % xantana + 1% glicerol + 1% CaCl ₂ + 1% ácido ascórbico + 0.25% ácido cítrico	Reducción de la pérdida de peso y el oscurecimiento enzimático, se incrementó la firmeza y se disminuyó el crecimiento de microorganismos.	Freitas, et al, 2013.
‘Gala’	3% p/p almidón de yuca + 1.5 % p/p glicerol + 0.2 p/p carnauba + 0.8% p/p ácido estéarico	Películas con una matriz cohesiva con mejores propiedades mecánicas, de barrera a la humedad y al intercambio de gases.	Chiumarelli y Hubinger, 2014.

¹ Ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido oxálico

² Ácido ascórbico, Cisteína, 4-hexilresorcinol

³ N-acetilcisteína

⁴ Orégano, hierba de limón, vanilina

⁵ N-acetilcisteína o CaCl₂

1.5.1 Goma xantana como recubrimiento comestible

La goma xantana, es un polisacárido subproducto del metabolismo de microorganismos del genero *Xanthomonas* obtenida por fermentación. Su cadena principal está formada por unidades de β (1 \rightarrow 4) D-glucosa, en cada unidad de glucosa alternada hay un trisacárido en la cadena lateral conteniendo un ácido D-glucurónico entre dos D-manosas. La manosa más cercana a la cadena principal tiene un éster de ácido acético, mientras que la manosa final en el trisacárido tiene un ácido pirúvico enlazado entre los carbonos 6 y 4 (Figura 5) (Sworn, 2009). Los trisacáridos de las cadenas laterales parecen estar alineadas con respecto a la cadena principal. Resultando en una cadena rígida que puede existir como una sola hélice, doble o triple, que interactúan con otras cadenas poliméricas para formar complejos. Se han encontrado pesos moleculares que varían de 2106 a 20106 Da. Diversos factores pueden influenciar la distribución de los pesos moleculares de la goma xantana como la asociación entre las cadenas, la formación de agregados por varias cadenas individuales y las condiciones usadas durante la fermentación en la producción del polisacárido (García-Ochoa et al., 2000 y Sworn, 2009).

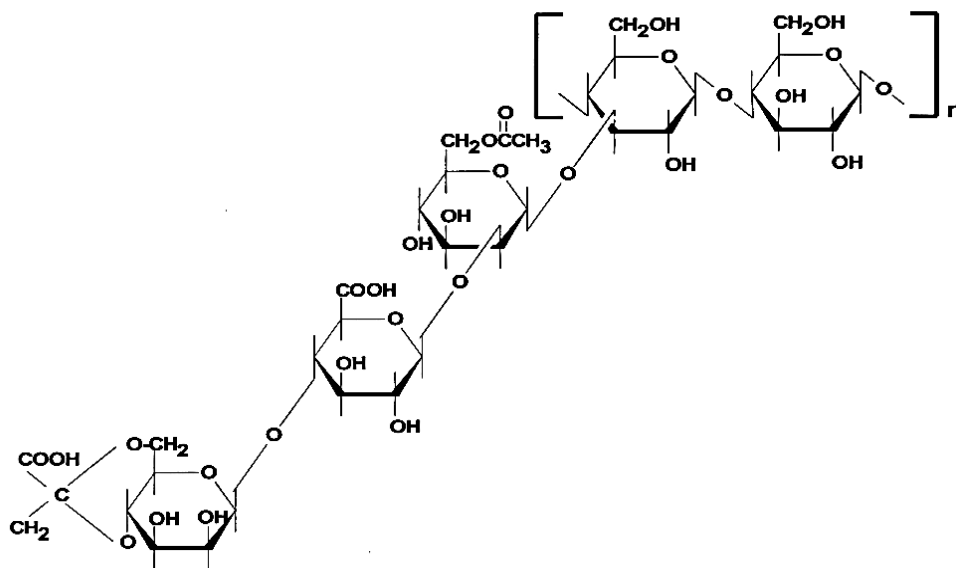


Figura 5: Estructura primaria de la goma xantana

Los efectos toxicológicos y de seguridad de la goma xantana han sido estudiados ampliamente en las áreas farmacéuticas y alimentarias. La xantana es un polisacárido no tóxico, no inhibe el crecimiento y no causa irritación en piel y ojos. Ha sido aprobado por la FDA como aditivo alimenticio sin ninguna limitación específica. En 1980, la Comunidad Económica Europea enlistó a la goma xantana dentro de los emulsificantes/estabilizantes para uso alimenticio etiquetándolo como E-415 (García-Ochoa et al., 2000).

Las soluciones de xantana obtenidas por dispersión a temperaturas moderadas tienden a ser altamente viscosas. La temperatura de dispersión generalmente afecta a la viscosidad por control de la conformación molecular, observándose dos conformaciones, helicoidal y en forma desplegada aleatoria, que son dependientes de la temperatura de disolución. La goma xantana ha sido usada en una amplia variedad de alimentos para diferentes razones incluyendo la estabilización de emulsiones y partículas en suspensión, la estabilización de la temperatura, la compatibilidad con ingredientes alimenticios y por sus propiedades reológicas pseudoplásticas (Kim y Yoo, 2006).

Los recubrimientos de goma xantana mantienen la brillantez aun cuando se mezcla con diferentes compuestos (Ward y Nussinovitch, 1997), no forman geles en soluciones acuosas y producen coberturas con buena uniformidad y adhesión; por lo cual, se han utilizado para mejorar la funcionalidad de recubrimientos comestibles a base de emulsiones de cera de carnauba y fungicidas para mandarinas (Chen y Nussinovitch, 2000), Asimismo como acarreador de nutraceuticos para fortificar zanahorias *baby* con calcio y α -tocoferol (Mei et al., 2002), para disminuir la pérdida de ácido fólico en arroz (Shrestha et al., 2003), para mantener las características fisicoquímicas de ajo por disminución de la velocidad de respiración (Yu, 2008), para incrementar la vida útil de peras cortadas (Mohamed et al., 2013) y como portador de agentes antioscurecimiento preservando las características físicas y fisicoquímicas de duraznos (Pizato et al., 2013) y manzanas ‘Gala’ frescas cortadas (Freitas et al., 2013).

Los recubrimientos comestibles pueden servir como acarreadores de otros aditivos, agentes antioscurecimiento, antimicrobianos, colorantes, saborizantes, nutraceuticos etc. (Rojas-Graü et al., 2009). Los aditivos alimentarios que han sido añadidos al recubrimiento para

reducir las reacciones de deterioro en frutas frescas cortadas, pueden sufrir descomposición química, física o enzimática debido a su interacción con el medio o el alimento, disminuyendo su capacidad protectora. La encapsulación, protege a los ingredientes sensibles (ej. sabores, aceites poliinsaturados, vitaminas) contra el calor, la humedad y el pH hasta que son liberados. Además, puede enmascarar los sabores de nutrimentos como las sales minerales que son añadidas a los alimentos para propósitos de fortificación (Agustin y Hemar, 2009).

La nueva generación de recubrimientos comestibles está comenzando a diseñarse para incrementar sus funcionalidades mediante la incorporación de ingredientes naturales o funcionales como prebióticos, minerales y vitaminas, buscando también el mejoramiento de la calidad del producto recubierto. Por lo cual, los recubrimientos de segunda generación consisten en la incorporación de los aditivos utilizando técnicas de microencapsulación o nanoencapsulación con la finalidad de obtener una liberación controlada de los compuestos encapsulados, proteger al aditivo de los factores externos y potencializar su funcionalidad para la conservación de alimentos (Falguera et al., 2011).

1.6 Nanotecnología

La nanotecnología ha tenido un gran impacto en diferentes áreas de la ciencia y el procesado de alimentos no ha sido la excepción, generando nuevas técnicas y materiales para incrementar la vida útil de los productos alimenticios. La habilidad de manipular los componentes alimenticios en escala nanométrica ha permitido el desarrollo de ingredientes encapsulados para mejorar la calidad de los alimentos; así mismo, mejorar la salud de los consumidores. Las nanopartículas se definen como partículas sólidas o coloidales incluyendo nanocápsulas y nanoesferas, teniendo como característica principal el tamaño, que de manera estricta se encuentra en el rango de entre 1 y 100 nm donde las propiedades físicas de los materiales pueden cambiar; sin embargo, debido a otros fenómenos de las dispersiones como la transparencia o turbidez, la estabilidad de las dispersiones etc., comúnmente se considera incrementar el límite superior, por lo cual el prefijo 'nano' es también aceptado para dimensiones menores a los 500 nm.

La diferencia principal entre las nanocápsulas y las nanoesferas radica en su arquitectura, donde las primeras están compuestas por una barrera sólida rodeando una cavidad, que se encuentra disponible para incluir sustancias, como se muestra en la Figura 6(a). En cambio las nanoesferas están compuestas por una densa matriz sin membranas o capas externas donde la sustancia o el activo, puede estar permanentemente o temporalmente embebido, disuelto o enlazado covalentemente como se observa en la Figura 6(b) (Vert et al., 2012). Los sistemas submicrónicos para uso alimenticio son formados utilizando compuestos GRAS y polímeros biodegradables naturales (polisacáridos, proteínas y lípidos) o sintéticos (ej. poli(ϵ -caprolactona), ácido polilactico-co-glicólico) (Zambrano-Zaragoza et al, 2011). Los polímeros sintéticos tienen mayor pureza y mejor reproducibilidad que los polímeros naturales (Mora-Huertas et al., 2010).

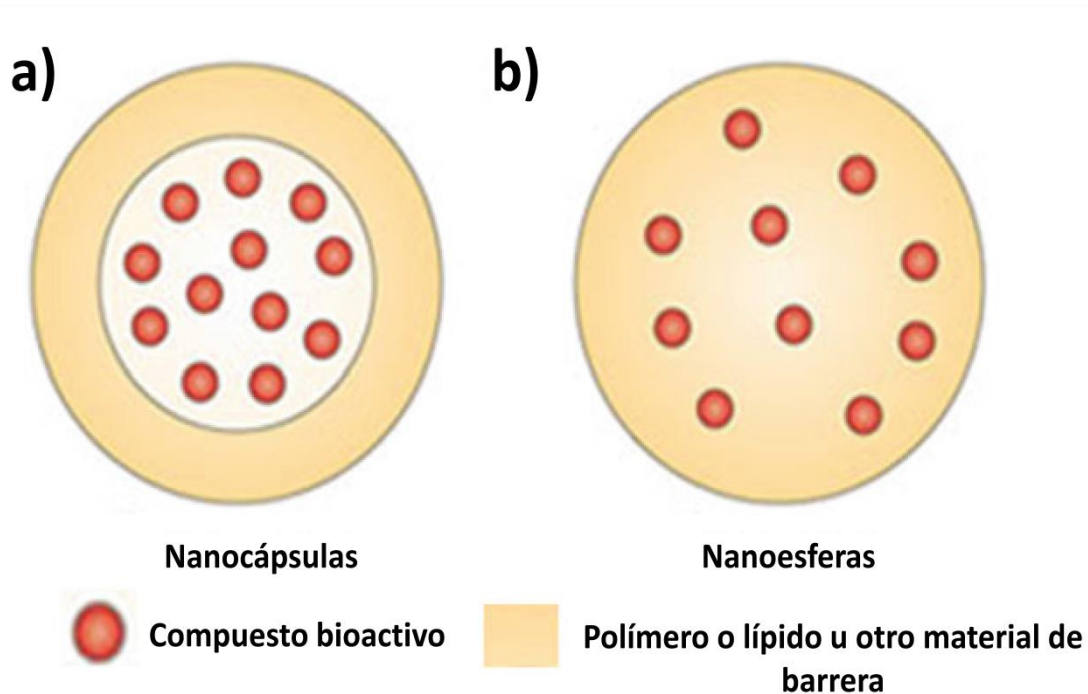


Figura 6: Características de las nanopartículas. (a) Nanocápsulas; (b) Nanoesferas.

(Adaptado de Anandharamakrishnan, 2014).

1.6.1 Métodos de preparación de las nanopartículas poliméricas

En la literatura se han descrito diferentes métodos que se han propuesto para formar en particular nanocápsulas conteniendo activos oleosos a partir de polímeros preformados. De acuerdo con Mora-Huertas et al. (2010), hay seis métodos para la preparación de nanocápsulas, estos son: desplazamiento de disolvente, emulsión-difusión, doble emulsificación, emulsión coacervación, recubrimiento de polímero y capa por capa. Sin embargo, los más utilizados y de sencillo escalamiento se presenta a continuación.

1.6.1.1 Emulsión-evaporación

El método de emulsificación-evaporación involucra dos etapas. La primera etapa requiere la emulsificación de la solución polimérica dentro de la fase acuosa. En la segunda etapa el disolvente es evaporado, induciendo la precipitación del polímero (Pinto Ries et al., 2006). El polímero preformado y el compuesto activo son disueltos en un disolvente orgánico insoluble en agua, que es emulsificado en una solución acuosa. Esta emulsión cruda es expuesta a una fuente de alta energía con dispositivos ultrasónicos o empleando homogeneizadores, molinos coloidales o microfluidizadores, con el fin de disminuir el tamaño del glóbulo de aceite y formar una nanoemulsión. La posterior eliminación del disolvente orgánico, por calentamiento, vacío o ambos, resulta en la formación de una dispersión acuosa de nanopartículas. El paso de homogeneización es el factor determinante en la obtención de las partículas submicrónicas (Quintanar et al., 1998a). Sin embargo, Mora-Huertas et al. (2010) indican que la presencia de compuestos de alto peso molecular dificulta la difusión del disolvente y cuando es eliminado durante la etapa de evaporación, hace que la formación de las nanocápsulas se dificulte, debido a la tensión mecánica causada por las burbujas formadas dentro de la suspensión acuosa (Figura 7). Las limitaciones en el escalamiento de este método radica en los altos requerimientos energéticos durante la etapa de homogeneización (Pinto Ries et al., 2006).

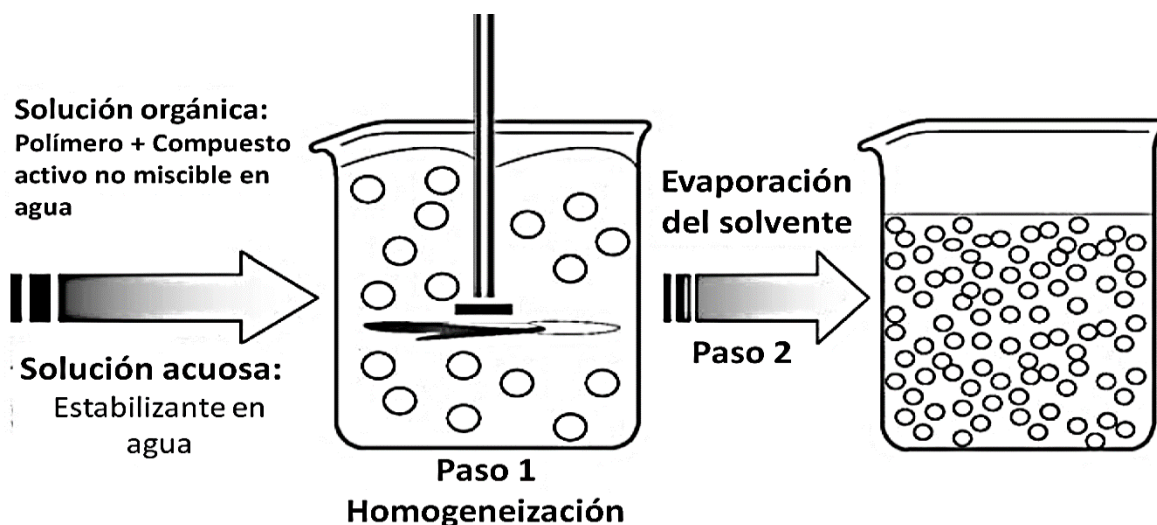


Figura 7. Representación esquemática para la formación de nanopartículas poliméricas usando el método de emulsificación- evaporación.

1.6.1.2 Nanoprecipitación o desplazamiento de disolvente

Este proceso involucra la precipitación de un polímero preformado desde una solución orgánica por la difusión del disolvente orgánico hacia el medio acuoso en presencia o ausencia de surfactantes (Pinto Ries et al., 2006). El polímero, el compuesto activo y opcionalmente un estabilizante lipofílico son disueltos en un disolvente semipolar miscible en agua, como acetona o etanol. Esta solución es posteriormente inyectada dentro de una solución acuosa conteniendo un estabilizante bajo agitación magnética. Las nanopartículas son formadas instantáneamente por la difusión del disolvente que es eliminado de la suspensión bajo reducida presión (Figura 8). El uso de esta técnica es limitada a disolventes miscibles en agua, a pesar de esto, algunos disolventes producen una cierta inestabilidad cuando son mezclados con agua (Quintanar et al., 1998a). Con este método se obtienen partículas de tamaño entre 150-200 nm en escala laboratorio (Mora-Huertas et al., 2010) y es básicamente aplicable para compuestos lipofílicos debido a la miscibilidad del disolvente en la fase acuosa, con baja eficiencia para encapsular compuestos solubles en agua. Además, es difícil seleccionar el sistema activo/polímero/disolvente/no disolvente, en donde las partículas puedan ser formadas y el compuesto activo eficientemente encapsulado, debido a que el polímero puede ser soluble en el disolvente y en el no disolvente (Pinto Ries et al., 2006).

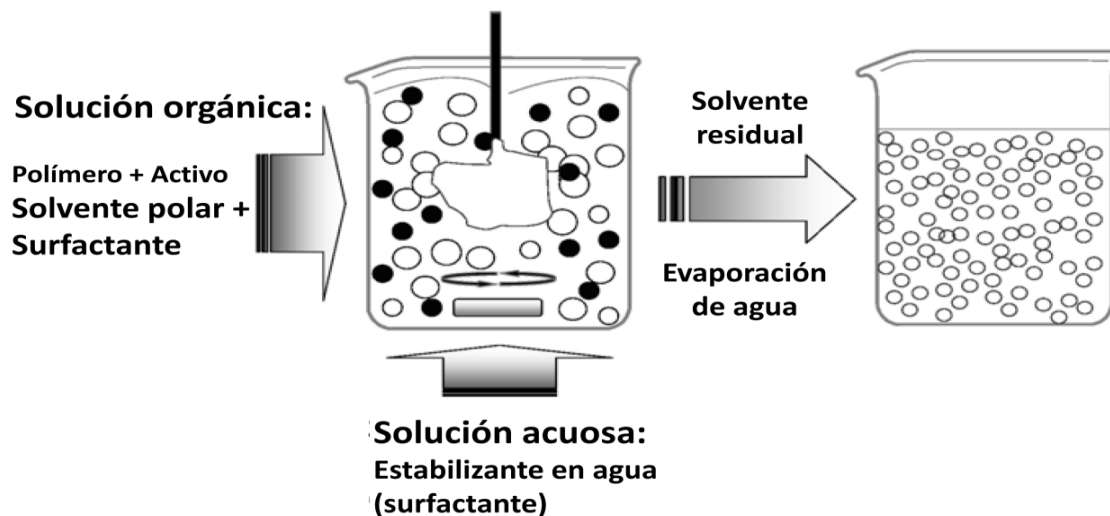


Figura 8. Representación esquemática para la formación de nanopartículas poliméricas mediante el método de desplazamiento de disolvente.

1.6.1.3 Emulsificación-difusión

La preparación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión requiere tres fases: la orgánica, la acuosa y la dilución (Mora-Huertas et al., 2010). La técnica consiste en emulsificar una solución orgánica conteniendo un aceite, un polímero y el compuesto activo en una solución acuosa con un agente estabilizante (Figura 9). La subsecuente adición de agua al sistema induce la difusión del disolvente dentro de la fase externa, resultando en la formación de partículas coloidales (Quintanar et al., 1998b). El exceso de disolvente después de la formación de las nanocápsulas puede ser eliminado por destilación dependiendo del punto de ebullición del disolvente o por filtración tangencial. Se ha demostrado que el tamaño de las nanopartículas está relacionado con la velocidad de cizalla usada en el proceso de emulsificación, de la composición de la fase orgánica, la concentración del polímero, de la relación polímero-aceite, y del tamaño de las gotas de la emulsión primaria. El tamaño de las nanocápsulas generadas por este método varía entre 150-200 nm (Mora-Huertas et al, 2010). Esta técnica presenta diversas ventajas como las altas eficiencias de encapsulación (generalmente >70%), no se necesita homogeneización, se obtiene alta reproducibilidad lote a lote, es fácil de escalar, simple y se obtienen estrechas distribuciones de tamaño. Dentro de las desventajas se encuentran los altos volúmenes de agua necesarios para llevar a cabo la difusión del disolvente, esto hace que se

obtingan bajas eficiencias de encapsulación para compuestos solubles en agua (Pinto Ries et al., 2006).

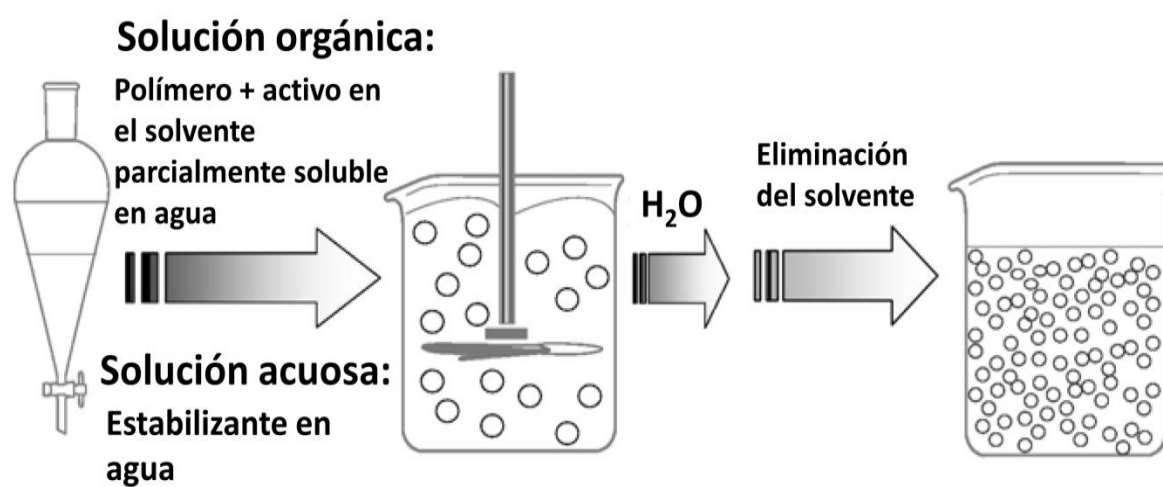


Figura 9: Representación esquemática del proceso de emulsificación-difusión para la formación de nanopartículas poliméricas.

1.6.2 Nanoemulsiones

Los coloides de asociación como micelas, vesículas, bicapas, micelas inversas y cristales líquidos han sido usados por muchos años para encapsular y liberar ingredientes funcionales polares, no polares o anfifílicos. La mayor ventaja de estos sistemas es su formación, son termodinámicamente favorables, y son típicamente soluciones transparentes. La mayor desventaja que poseen estas estructuras, son las grandes cantidades de surfactantes requeridas para su formación que pueden producir problemas en sabores, costos o legalidad (Weiss et al, 2006). Las nanoemulsiones, siendo sistemas no equilibrados, no se pueden formar espontáneamente; consecuentemente, se necesita energía para formarlas con el uso de dispositivos mecánicos o por potenciales químicos. La formación de nanoemulsiones por dispersión o también llamado dispersión o emulsificación de alta energía, generalmente se logra mediante dispositivos de alto cizallamiento, homogeneizadores de alta presión y generadores ultrasónicos. Los homogeneizadores de alta presión trabajan en un rango de presiones entre 50 y 100 MPa (Solans et al., 2005). Estos dispositivos pueden formar emulsiones con diámetros de gotas menores de 100 nm a 500 nm (Weiss et al., 2006).

1.6.3 Caracterización de las nanopartículas

Las características de las nanopartículas determinan sus funciones. Las principales características incluyen, a) el tamaño de las nanopartículas (TP), que puede ser medido usando el método de dispersión dinámica de luz, por microscopía electrónica de barrido o microscopía de transmisión de electrón; b) el índice de polidispersidad (IPD), indica la distribución de los tamaños de las nanopartículas; c) el potencial zeta (ζ), indica la carga superficial de las nanopartículas y puede ser medido usando un analizador de potencial zeta, la técnica más común de medición de éste parámetro es respecto a la movilidad electroforética de las partículas; d) la estabilidad física y química, indica la perdurabilidad de las nanopartículas y de los compuestos encapsulados respectivamente; e) la eficiencia de la encapsulación, es determinada como la masa de compuesto encapsulado dividida por la masa total del compuesto multiplicado por 100%; y f) la capacidad de encapsulación, que es determinada como la masa del compuesto encapsulado dividido por la masa de las nanopartículas multiplicado por 100 (Anandharamakrishnan, 2014).

El instrumento más sofisticado para la medición del tamaño de partícula y el potencial zeta es el Zetasizer[®] desarrollado por Malvern Instruments Ltd. Dos haces de luz se hacen intersecar entre si en una posición particular dentro de una celda de medición de manera que ellas formen un patrón de interferencia que consisten en regiones de alta y baja energía. Las partículas dispersas (por ejemplo, gotas de emulsión) cargadas, se hacen mover a través del patrón de interferencia aplicando un campo eléctrico en la celda. Las gotas se mueven a través del patrón de interferencia, ellas dispersan la luz en las regiones brillantes pero no en las oscuras. Cuanto más rápido se mueva una gota a través del patrón de interferencia, mayor será la frecuencia de la intensidad de las floclaciones. Por la medida y análisis de la frecuencia de estas floclaciones, es posible determinar la velocidad de las partículas, que puede ser matemáticamente relacionada con el potencial zeta. El signo de la carga se comprueba mediante la dirección en que se mueven en el campo eléctrico. El mismo instrumento se puede utilizar para determinar la concentración de gotas y la distribución de tamaño (de 10 nm a 3 μ m) de una emulsión por una técnica dinámica de dispersión de luz (McClements, 1999).

1.6.4 Nanotecnología para la conservación de frutas

Los métodos antes descritos han servido para formar nanopartículas que pueden ser aplicadas para la conservación de alimentos. Por ejemplo, con el método de emulsificación-difusión se han encapsulado fármacos como la indometacina, progesterona y vitamina E con eficiencias de encapsulación mayores al 90% (Quintanar-Guerrero, 1998b). Para aplicaciones alimenticias, Zambrano-Zaragoza et al. (2011), han optimizado el método de emulsificación-difusión para preparar nanopartículas cargadas con aditivos oleosos, evaluando bajo la metodología de superficie de respuesta las condiciones óptimas de obtención de las nanocápsulas, teniendo como variables la velocidad de cizalla del homogeneizador ($3070-18920\text{ s}^{-1}$), la concentración del polímero encapsulante (poli(ϵ -caprolactona); 100-300 mg) y la concentración de estabilizante (polivinil alcohol; 25-100 g/L), encontrando que con 256 mg de poli(ϵ -caprolactona), 50 g/L de polivinil alcohol a una velocidad de cizalla de 10917 s^{-1} se pueden obtener nanocápsulas con un TP promedio de 250 nm, con un IPD de 0.045 y un ζ de -20.02, sugiriendo que el método es una excelente herramienta para preparar nanocápsulas que funcionen en aplicaciones alimenticias.

También, Zambrano-Zaragoza et al. (2013) han preparado nanopartículas lipídicas solidas (NLS) utilizando agitación de alta energía mediante un sistema rotor/estator para preparar una nanoemulsión aceite-agua (O/W). La fase lipídica consistió en cera de Carnauba[®] previamente fusionada a una temperatura de 90°C , posteriormente se agregó agua a la misma temperatura conteniendo Pluronic F-127[®] como estabilizante, la mezcla se sometió a tres ciclos de agitación a una velocidad de 10000 rpm teniendo reposos de 5 minutos entre cada ciclo, obteniendo de esta forma la nanoemulsión que posteriormente fue enfriada para permitir la solidificación de la cera y la formación de las NLS. El sistema generado fue aplicado como recubrimiento comestible sobre guayabas (*Psidium guajava L.*) a diferentes concentraciones de NLS (60, 65, 70, 75 y 80 g/L) y utilizando goma xantana como soporte de las dispersiones coloidales. Dentro de los resultados obtenidos se observó que a concentraciones de 60 y 65 g/L de NLS se obtienen los mejores resultados respecto a la pérdida de peso, la textura y el color, preservando por más tiempo la calidad de las

guayabas; por el contrario, las concentraciones mayores a 65 g/L de NLS causaron daños fisiológicos en el fruto.

Kim et al. (2013) han encapsulado palmitato de ascorbilo usando quitosano como polímero mediante el proceso de nanoprecipitación. De acuerdo con los autores, para la formación de las nanocápsulas se disolvieron 2 mL de una solución de quitosano (3.5 g/L) en 1% ácido acético o ácido cítrico conteniendo 0.1% de Tween 20 y 0.5 mL de palmitato de ascorbilo bajo agitación magnética a 1000 rpm por 10 min. Posteriormente sobre la mezcla de quitosano se adicionaron 4.5 mL de una solución de politrifosfato de sodio (0.78 mg/mL) para provocar la precipitación del quitosano y la formación de las nanocápsulas. Las nanocápsulas preparadas fueron evaluadas como inhibidores de la enzima PFO extraída de plátanos. De acuerdo con los resultados obtenidos, el sistema de palmitato de ascorbilo nanoencapsulado presentó los mejores resultados en la inhibición de la actividad PFO de plátanos en comparación con el palmitato de ascorbilo no encapsulado.

Recientemente nuestro grupo ha propuesto la preparación nanocápsulas conteniendo dl- α -tocoferol preparadas por el método de emulsificación-difusión, aplicadas como recubrimiento comestible en manzana 'Red Delicious' fresca cortada. Se ha observado que el sistema tiene buen potencial para disminuir las reacciones de deterioro en la manzanas como el oscurecimiento enzimático, mejorando las propiedades texturales, disminuyendo la pérdida de peso y teniendo un efecto significativo en el control de los cambios en las propiedades fisicoquímicas como los sólidos solubles, la acidez y el pH (Zambrano-Zaragoza et al, 2013).

La finalidad por la cual se eligió encapsular α -tocoferol fue debido a que en estudios previos se observó que una forma química hidrosoluble del tocoferol (α -tocoferol polietilenglicol 1000 succinato; TPGS) fue eficaz en disminuir las reacciones de oscurecimiento de las manzanas frescas cortadas, encontrándose que la concentración óptima para disminuir la oxidación enzimática por 7 días fue de 2000 ppm a comparación de las muestras no tratadas, que presentaron oscurecimiento enzimático a partir del primer día (Contreras, 2010). Posteriormente se corroboró que la solución de TPGS a pesar de disminuir las reacciones de oxidación durante los primeros días de almacenamiento, no es

tan efectiva para retardar el oscurecimiento en comparación con la nanoemulsión de dl- α -tocoferol (Sánchez, 2011). Partiendo de esas evidencias, los estudios subsecuentes estuvieron ligados a evaluar el efecto de nanopartículas con dl- α -tocoferol, incluyendo nanocápsulas y nanoemulsiones conteniendo α -tocoferol liposoluble sobre los cambios fisicoquímicos de las manzanas frescas cortadas (Zambrano-Zaragoza et al., 2014). Se utilizó la forma liposoluble ya que durante el proceso de nanoencapsulación los compuestos hidrosolubles tienden a ser poco encapsulables, lo cual es provocado por las características químicas de la molécula y por el método utilizado para encapsular en especial con el método de emulsificación-difusión donde se han observado muy bajas eficiencias de encapsulación para compuestos hidrosolubles (Pinto Ries et al., 2006). Además la adición de α -tocoferol también puede tener un efecto nutracéutico para frutas frescas cortadas como ha sido evaluado en manzanas ‘Fuji’ (Zhao et al, 2005) y peras ‘d’Anjou’ (Lin et al., 2006) incorporando dl- α -tocoferol mediante impregnación al vacío, encontrando que la adición de dl- α -tocoferol incrementa el valor nutrimental de las frutas y disminuye las reacciones de deterioro, con lo cual se concluyó que la incorporación de α -tocoferol mejora los beneficios de las frutas frescas cortadas.

Por lo cual, al observar que los nanorrecubrimientos conteniendo dl- α -tocoferol tienen un efecto significativo en el control de las características físicas y fisicoquímicas, en este trabajo se propone evaluar la aplicación de recubrimientos con base en nanopartículas con dl- α -tocoferol (nanoemulsión y nanocápsulas) y nanoesferas sin dl- α -tocoferol, utilizando goma xantana como biopolímero soporte, sobre pérdida de peso y las actividades enzimáticas PFO, PME y PG, para correlacionarlas con el color, la concentración de compuestos fenólicos y la textura de manzana ‘Red Delicious’ fresca cortada, ya que las actividades enzimáticas que están relacionadas con los cambios sensoriales del fruto han sido poco exploradas a pesar de ser criterios muy importantes para establecer y correlacionar su influencia con los cambios que afectan la calidad sensorial y funcional de las manzanas.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de nanorrecubrimientos conteniendo dl- α -tocoferol sobre los cambios fisicoquímicos y fenoles totales de manzana ‘Red Delicious’ fresca cortada almacenada a 4°C por catorce días, para correlacionarlos con la evolución de las actividades enzimáticas polifenoloxidasas, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa de la fruta.

2.1.2 Objetivos particulares

Objetivo particular 1

Caracterizar los sistemas de talla submicrónica con y sin goma xantana, mediante la medición de tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta para inferir sobre su estabilidad y distribución.

Objetivo particular 2

Evaluar los cambios físicos y químicos: pérdida de peso, color (parámetros L*, a*, b* y ΔE^*), el contenido de fenoles totales y la textura de manzana ‘Red Delicious’ fresca cortada y recubierta con las nanodispersiones, para establecer su efecto en la conservación de las características de calidad.

Objetivo particular 3

Determinar el efecto de los nanorrecubrimientos sobre las actividades enzimáticas polifenoloxidasas, pectinmetilesterasa y poligalacturonasa para correlacionarlas con los cambios en el color, la concentración de fenoles totales y la textura de las manzanas ‘Red Delicious’ frescas cortadas.

Desarrollo metodológico

En la Figura 10 se muestra el esquema general que se utilizó para el desarrollo del proyecto de investigación, en el cuál se indican las metodologías generales para lograr los objetivos del proyecto.

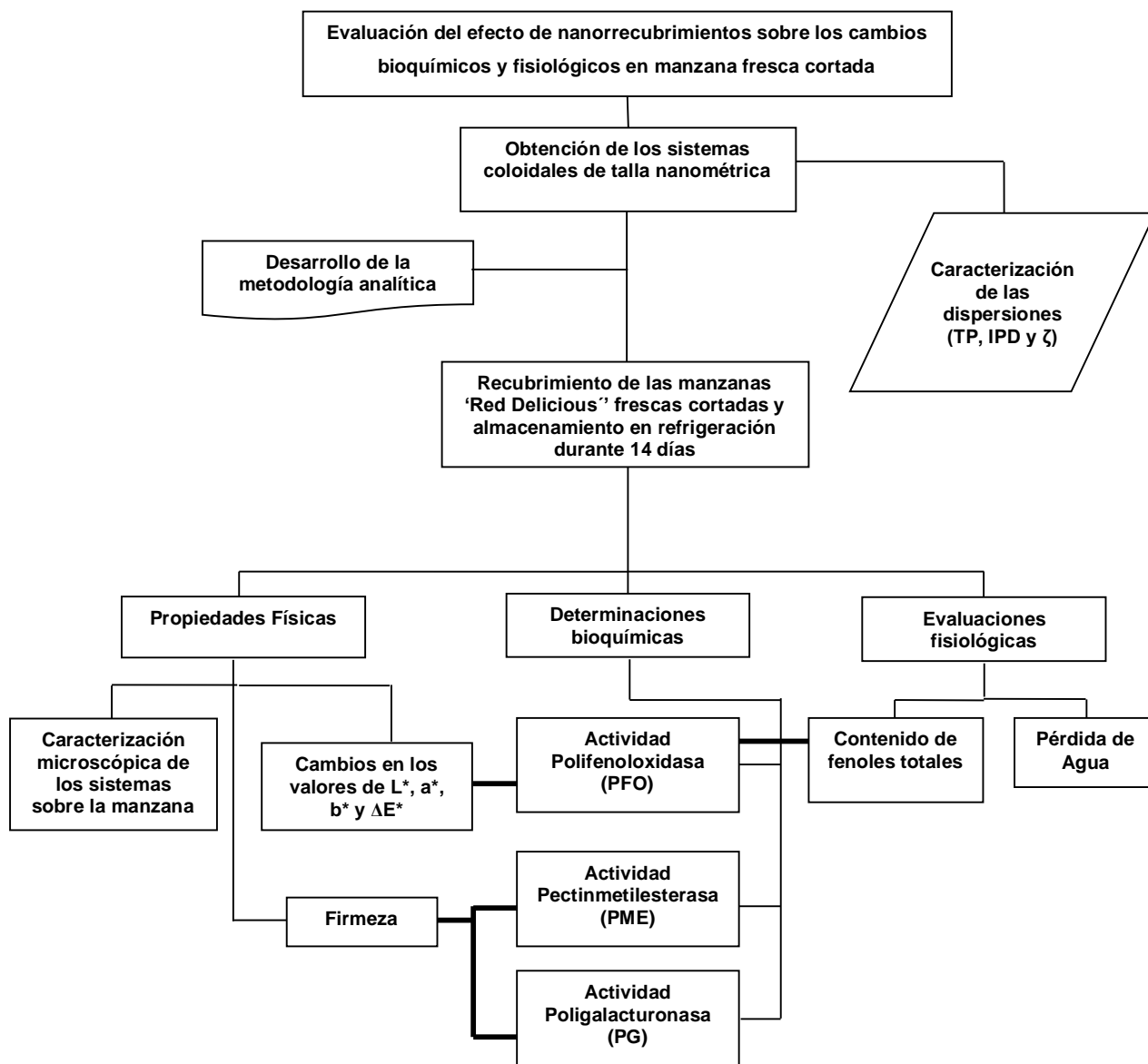


Figura 10: Esquema general de la metodología para el desarrollo del proyecto de investigación.

2.2 Materiales

Acetato de dl- α -tocoferol, monoleato de sorbitan 80 (Span® 80), polysorbato 80 (Tween® 80), poloxámero 407 (Pluronic® F-127), poli(ϵ -caprolactona) (PCL; PM ~ 80 000), pectina cítrica (70-75% grado de esterificación), polivinilpirrolidona, ácido poligalacturónico, ácido D-glucurónico y ácido dinitrosalicílico (DNS) fueron adquiridos de Sigma Aldrich® (St. Louis, EU). El acetato de sodio, HCl, NaOH, fenol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), NaCl, sulfito de sodio y acetato de etilo se obtuvieron de Fermont® (Distrito Federal, México). La goma xantana, polietilenglicol, sorbato de potasio, NaClO y CaCl₂ fueron comprados en Droguería Cosmopolita (Distrito Federal, México). El agua destilada fue calidad Milli-Q® (Millipore®, Massachusetts, EU). Todos los reactivos empleados fueron al menos grado analítico.

2.3 Material biológico

Las manzanas ‘Red Delicious’ fueron obtenidas de un centro de distribución de frutas (Cuautitlán Izcalli, Estado de México). Se seleccionaron utilizando pruebas subjetivas en función al aspecto superficial, tamaño y color considerando un contenido de sólidos solubles expresado en °Brix entre 11-14, y una resistencia a la penetración de 7 N aproximadamente. Las manzanas así seleccionadas fueron almacenadas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y 90-95% de H.R. previo a su utilización por no más de 3 días en cada periodo experimental.

2.4 Preparación de las nanopartículas

2.4.1 Nanocápsulas conteniendo dl- α -tocoferol (nanocápsulas-Toc) y nanoesferas

Las nanocápsulas conteniendo dl- α -tocoferol (nanocápsulas-Toc) y nanoesferas sin dl- α -tocoferol fueron preparadas por el método de emulsificación-difusión (Quintanar-Guerrero et al., 1998). Brevemente, se saturó manualmente acetato de etilo y agua en un embudo de separación y se dejó reposar hasta alcanzar el equilibrio termodinámico entre ambas fases. En la fase acuosa saturada con acetato de etilo (120 mL) se solubilizó el poloxamero 407 (50 g/L) y en la fase orgánica saturada con agua (60 mL) se disolvió el biopolímero PCL (~ 800 mg), en el caso de las nanocápsulas se adicionó dl- α -tocoferol a una concentración de 2 g/L, procediéndose a preparar los sistemas submicrónicos de acuerdo a las condiciones

optimizadas por Zambrano-Zaragoza et al., (2011): 4000 rpm durante 10 minutos y 360 mL de agua. Finalmente, el exceso de disolvente fue eliminado mediante evaporación a 30°C y vacío de 50 cm de Hg (RV10, IKA® Labortechnik, Staufen, Alemania). De esta forma se prepararon 2 lotes de nanocápsulas-Toc y 2 lotes de nanoesferas, un lote de cada sistema fue mezclado con una dispersión de goma xantana a una concentración final de 3 g/L conteniendo 5 g/L de propilenglicol y 10 g/L de sorbato de potasio. En cambio, los lotes de nanocápsulas-Toc y nanoesferas sin goma xantana no tuvieron un tratamiento posterior.

2.4.2 Nanoemulsión de dl- α -tocoferol

Se preparó una emulsión (O/W) por el método de emulsificación convencional. La fase dispersa estuvo compuesta por 2 g de acetato de dl- α -tocoferol y 42 g de surfactante lipofílico (Span® 80). La fase continua fue formada por 600 mL de agua desionizada y 8 g de surfactante hidrofílico (Tween® 80). La solución lipofílica se adicionó a la fase acuosa la cual se mezcló con un agitador de velocidad variable tipo RZR1 (Heidolph® Instruments, Schwabach, Alemania) a 2,500 rpm por 10 min. La emulsión así formada se sometió a 5 ciclos de homogenización a 10000 rpm por 5 minutos con un agitador rotor/estator de alta velocidad (Ultra-Turrax® T18, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) con un reposo de 5 min entre cada ciclo. De la misma forma como se describió anteriormente, un lote de nanoemulsión (nanoemulsión-Toc) fue mezclada con la dispersión de goma xantana.

2.5 Caracterización de los sistemas submicrónicos formadores de película

2.5.1 Evaluación del tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersidad (IPD)

La distribución del TP y del IPD de los sistemas coloidales fueron determinados mediante la técnica de dispersión de luz láser con un ángulo fijo de 90° usando un equipo Zetasizer® 4 (Malvern Instruments® ZEN NS 3600, Worcestershire, UK). Con la finalidad de contar con el número de partículas necesarias para la medición, las dispersiones fueron diluidas con agua Mili-Q®. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, obteniendo la distribución de tamaños de partícula con su correspondiente IPD (Zambrano-Zaragoza et al., 2014).

2.5.2 Potencial Zeta (ζ)

El ζ de las dispersiones se determinó con un equipo Zetasizer 4 (Malvern Instruments® ZEN NS 3600). Para este fin se utilizaron soluciones diluidas de las dispersiones en agua Milli Q® midiendo el ζ en relación a su movilidad electroforética, tomando como referencia dispersiones de poliestireno ($\zeta = -55$ mV). El ζ es una medida del grado de repulsión entre las nanopartículas adyacentes, de tal manera que un ζ es alto cuando es $>|30\text{mV}|$ y describe un sistema físicamente estable (Bala et al., 2005).

2.6 Aplicación de las dispersiones formadoras de película en manzana

Las manzanas seleccionadas se lavaron y sanitizaron por inmersión en una solución de 10 g/L de NaClO durante 2 min para posteriormente descorazonarlas y córtalas en ocho gajos. Con el fin de determinar la influencia del polisacárido matriz se recubrieron manzanas con una dispersión de goma xantana (0.3 g/L + 5 g/L propilenglicol + 1 g/L sorbato de potasio); además, se consideraron dentro del plan experimental los siguientes tratamientos: control, nanoemulsión-Toc, nanoemulsión-Toc/xantana, nanocápsulas-Toc, nanocápsulas-Toc/xantana, nanoesferas, nanoesferas/xantana. Previo a la inmersión de las manzanas en cada dispersión, se llevó a cabo un pretratamiento con CaCl_2 (10 g/L) por 2 minutos, después de escurrirse, se sumergieron en los sistemas durante 2 min a 10°C, colocándose aproximadamente 90 g de manzana en envases de polipropileno cristalino los cuales fueron almacenados a 4°C durante 14 días. Las muestras control sólo fueron tratadas con CaCl_2 (Zambrano-Zaragoza et al., 2014).

2.7 Caracterización morfológica de los recubrimientos sobre la manzana

Para la caracterización morfológica de la superficie de manzanas recubiertas con las diferentes dispersiones, se tomaron cortes longitudinales del tejido que fueron sumergidos en el sistema correspondiente. Las muestras fueron colocadas en el portamuestras y estabilizadas en un desecador con sílica gel por 24 h, para posteriormente aplicarles un baño de oro (~20nm) utilizando un evaporador catódico Sputter Coater JFC-1100 (Jeol, Tokyo Japan). Los cortes así preparados fueron observados en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío LV-SEM JSM 5600 (resolución de 5 nm), con un voltaje de 20 kV

y 12-20 Pa de presión en la cámara, obteniéndose así las micrografías de la superficie de las manzanas con cada tratamiento (Zambrano et al., 2014).

2.8 Pérdida de peso

Para determinar la efectividad de los recubrimientos como barrera a la humedad, se midió el porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial, el cual se calculó pesando los trozos de manzana sin el contenedor durante los 14 días de almacenamiento y se calculó como se indica en la siguiente relación:

$$\%Pérdida\ de\ peso = \frac{(Peso\ inicial - Peso\ Final)}{Peso\ inicial} \times 100$$

2.9 Color

La medición de los cambios de color se realizó utilizando un colorímetro Minolta CR-300 (Konica Minolta, consola DP-301, Japón). Este fue calibrado empleando un plato blanco ($Y = 94.3$; $x = 0.3142$; $y = 0.3211$) con iluminante C a 2° del observador. Se tomaron 3 gajos de manzana de cada envase, realizando dos mediciones por muestra y registrando los parámetros L^* , a^* y b^* como indicadores en el desarrollo del oscurecimiento de la superficie de las manzanas (Wang et al., 2007). Los cambios se monitorearon durante el periodo de almacenamiento. Además, se calcularon las diferencias totales del color (ΔE^*) usando la siguiente relación:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2}$$

Donde L^* , a^* y b^* son las mediciones colorimétricas de la muestra al tiempo t ; mientras que L_0^* , a_0^* y b_0^* son los parámetros colorimétricos al tiempo cero.

2.10 Determinación de fenoles totales

La extracción de los compuestos fenólicos de las superficies tratadas se realizó de acuerdo con el método descrito por Supapvanich, et al. (2011). Se utilizó el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Waterhouse, 2005) para la determinación de fenoles totales. Brevemente, 20 μ L de extracto fenólico o testigo se mezclaron con 1.58 mL de agua destilada y 100 μ L de reactivo comercial Folin-Ciocalteu (diluido 1:10); después de 4 minutos se adicionaron 300 μ L de carbonato de sodio (200 g/L), la mezcla se agitó ligeramente manteniéndose a temperatura ambiente durante 2 horas, la absorbancia se midió a 765 nm (UV-Vis Cintra 10e, GBC Scientific Equipment Ltd. Dandenong Victoria, Australia). Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico (mgEAG) por gramo de peso fresco, obteniéndose a partir de una curva patrón de ácido gálico a concentraciones de 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L bajo las condiciones antes descritas, obteniéndose la siguiente ecuación:

$$y = 0.00082x + 0.0071; R^2 = 0.995$$

Donde y representa la absorbancia obtenida a 765 nm y x la concentración de ácido gálico en mg/L.

2.11 Actividad PFO

La extracción de la enzima PFO se realizó siguiendo la metodología propuesta por Soysal (2008) con algunas modificaciones. Brevemente, 20 g de superficie recubierta fueron molidos con 20 mL de buffer citrato-fosfato de sodio frío (0.2 M; pH 6.5) conteniendo 5 g/L de polivinilpirrolidona usando un UltraTurrax[®] T18 a 7000 rpm por 1 min, la mezcla se agitó magnéticamente durante 10 minutos en un baño externo de hielo, el homogeneizado obtenido se centrifugó a 10000 rpm por 35 minutos. El sobrenadante fue filtrado a través de papel filtro Whatman no. 42 y por una membrana con tamaño de poro de 0.22 μ m, la disolución obtenida fue considerada como el extracto enzimático utilizado para la determinación de la actividad polifenoloxidasas.

La actividad PFO fue determinada de acuerdo con método propuesto por Zhou et al. (1993). La mezcla de reacción consistió en 0.2 mL de extracto enzimático y 2.8 mL de catecol (50 mM en buffer de citrato-fosfato a pH de 6.5). Los cambios en la absorbancia se midieron a 420 nm (UV-Vis Cintra 10e) cada 10 s durante 3 min en relación a una muestra testigo que no contenía enzima. Se definió una unidad de actividad PFO como el cambio de 0.001 Abs/min a partir de la pendiente inicial de la curva obtenida.

2.12 Determinación de la firmeza

Se evaluó la fuerza requerida para penetrar la superficie recubierta de las manzanas, para ello se cortaron bloques de manzana con dimensiones que se mantuvieron constantes (ancho x largo x profundidad: 15 mm x 55 mm x 10 mm). Se utilizó un analizador de textura (Texture Analyzer CT3, Brookfield[®], EU) acoplado con una celda de carga de 25 kg y con una sonda de acero inoxidable de 6 mm de diámetro. La carga de activación fue de 0.10 N, la velocidad de penetración de 1 mm/s con retorno automático y la profundidad de penetración de 3 mm con la finalidad de evaluar la firmeza superficial de las muestras recubiertas. Las mediciones se realizaron en tres puntos diferentes de cada bloque y se obtuvo un promedio de la firmeza de la muestra.

2.13 Actividad PME

Para la extracción de la enzima PME se tomaron 10 g de la superficie cortada de las manzanas y se homogeneizaron con 20 mL de una disolución que contenía 0.2 M de NaCl y 10 g/L de polivinilpirrolidona usando un UltraTurrax[®] T18 a 7000 rpm por 1 min, la mezcla se agitó magnéticamente por 10 minutos manteniéndose en un baño de hielo externo. El homogeneizado se centrifugó a 10000 rpm por 40 minutos y el sobrenadante se filtró a través de papel Whatman No. 42 y por una membrana de 0.22 μ m para eliminar las nanopartículas remanentes. La disolución así obtenida consistió el extracto enzimático para la determinación de la PME, el cual se ajustó a pH=7.5 con NaOH 2M y NaOH 0.2M.

La actividad PME se determinó de acuerdo a la metodología propuesta por Hagermann y Austin, (1986) con algunas modificaciones. Brevemente, en una celda espectrofotométrica se adicionó 1 mL de pectina cítrica (10 g/L) a 60°C, 200 μ L de azul de bromotimol (0.1

g/L), 200 μ L NaCl (0.2 M) y 580 μ L de agua destilada. Cada solución fue ajustada a pH=7.5 con NaOH 2 M y NaOH 0.2 M. La reacción se inició con la adición de 20 μ L del extracto enzimático a la mezcla, se agitó ligeramente y se midió el decremento de la absorbancia a 640 nm por 3 minutos. La cantidad en μ moles de ácido liberados por acción de la PME, fueron obtenidos a partir de una curva patrón realizada con ácido galacturónico desde 0.1 a 0.8 μ moles de ácido y siguiendo el tratamiento realizado por Hagermann y Austin, (1986) obteniéndose la siguiente expresión:

$$y = 0.2523x + 0.0022; R^2 = 0.995$$

Donde y representa la absorbancia obtenida a 620 nm y x la cantidad de ácido galacturónico en μ moles.

2.14 Actividad PG

Para la extracción de la PG, se molieron y homogeneizaron 10 g de superficie tratada con 20 mL de buffer de fosfatos (0.2 M, pH = 7.0) con un UltraTurrax[®] T18 a 7000 rpm por 1 min, el homogeneizado se agitó magnéticamente por 10 minutos en un baño de hielo externo y se centrifugó a 10000 RPM por 30 minutos, el sobrenadante así obtenido fue filtrado en papel Whatman no. 42 y posteriormente por una membrana de 0.22 μ m. La solución filtrada consistió el extracto enzimático para evaluar la actividad PG.

La actividad PG se determinó como lo describe Luhoani et al. (2004) y Pathak y Sanwal (1998). La mezcla de reacción estuvo compuesta por 0.2 mL de acetato de sodio (0.2 M, pH=4.5), 0.1 mL de NaCl (0.2 M), 0.3 mL de ácido poligalacturónico (PGA, 10 g/L ajustado a pH=4.5) y 0.1 mL de extracto enzimático en un volumen total de 1 mL. La reacción fue iniciada por la adición del sustrato PGA. La mezcla se incubó a 37°C por 1 hora, seguido de la adición de volúmenes iguales de una solución de reactivo DNS (10 g/L) conteniendo fenol (0.2 g/L), sulfito de sodio (0.5 % p/v) e hidróxido de sodio (10 g/L). La reacción fue terminada por el calentamiento de la mezcla de reacción en un baño de agua en ebullición durante 5 min. En los tubos control, el sustrato fue añadido después de la inactivación por el baño de agua hirviendo. La formación de azúcares reductores se estimó midiendo la absorbancia a 540 nm, utilizando una curva de calibración de ácido D-

galacturónico a concentraciones desde 0.1 hasta 1 mg/mL obteniéndose la siguiente ecuación:

$$y = 5.76x - 0.42; R^2 = 0.990$$

Donde y representa la absorbancia obtenida a 540 nm y x la concentración de ácido D-galacturónico.

2.15 Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis ANOVA de dos factores y comparación de medias de tratamientos (Minitab® versión 14, EU) para establecer el efecto de la composición del recubrimiento sobre la actividad PFO, PME, PG, contenido de fenoles y cambios de color durante el almacenamiento de manzana fresca cortada. Las diferencias entre los tratamientos fueron evaluadas para una diferencia entre la media de los tratamientos ($\alpha=0.05$) mediante prueba de Tukey.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Caracterización física de las nanopartículas

Es importante conocer los parámetros físicos y de estabilidad como TP, IPD y ζ de las nanopartículas en dispersión para establecer en principio, si las nanopartículas preparadas se encuentran dentro del rango submicrónico; también, es importante debido a que estos parámetros pueden indicar la estabilidad de los sistemas (Mirhosseini et al., 2008). En la Tabla 3, se presentan los resultados correspondientes a las determinaciones del TP, IPD y ζ de los sistemas nanoparticulados con y sin goma xantana, utilizados para la preparación de los recubrimientos. En el estudio previo realizado por Zambrano-Zaragoza et al. (2014), se encontraron resultados similares respecto a los parámetros físicos de las nanodispersiones.

Tabla 3: Caracterización física de las nanopartículas con y sin goma xantana como dispersiones formadoras de recubrimientos			
Nanopartículas	TP (nm)	IPD	ζ (mV)
Nanocápsulas-Toc	243 \pm 8	0.11 \pm 0.02	-43.60 \pm 1.33
Nanocápsulas-Toc/xantana	259 \pm 2	0.09 \pm 0.03	-43.57 \pm 1.32
Nanoesferas	190 \pm 26	0.17 \pm 0.01	-45.36 \pm 1.4
Nanoesferas/xantana	196 \pm 18	0.26 \pm 0.04	-48.6 \pm 2.93
Nanoemulsión-Toc	156 \pm 2	0.22 \pm 0.08	-42.33 \pm 1.12
Nanoemulsión-Toc/xantana	176 \pm 6	0.19 \pm 0.02	-50.03 \pm 3.0

Los datos representan la media de tres mediciones \pm DE.

3.1.1 Tamaño de partícula (TP) e índice de polidispersidad (IPD)

Se observó que todos los sistemas tuvieron talla submicrónica menor a los 260 nm e índices de polidispersidad <0.3 . La reducción en el tamaño de partícula de los sistemas coloidales ayuda a disminuir la fuerza gravitacional y la sedimentación, además de prevenir la

floculación (McClements y Rao, 2011). Los valores pequeños de IPD implican una distribución normal estrecha del tamaño de partícula; por lo cual, existe una mayor probabilidad de tener el mayor número de partículas con tendencia a la media reportada (Liu y Wu, 2010; Rampino et al., 2013).

Las nanocápsulas-Toc y las nanocápsulas-Toc/xantana preparadas por el método de emulsificación-difusión presentaron los mayores TP, con 243 nm y 259 nm respectivamente, teniendo índices de polidispersidad de 0.11 para las nanocápsulas-Toc y 0.09 para las nanocápsulas-Toc/xantana. Zambrano-Zaragoza et al. (2014), prepararon nanopartículas de PCL y dl- α -tocoferol con el mismo método reportando TP de 239 nm e IPD de 0.086 para las nanocápsulas-Toc y 220 nm e IPD 0.131 para las nanocápsulas-Toc/xantana; encontrándose dentro del intervalo aceptable para este tipo de dispersiones (Weiss et al., 2006; Mora-Huertas et al., 2010). Es importante resaltar que la distribución de tamaños de partícula para nanocápsulas preparadas por el método de emulsificación-difusión los TP reportados oscilan entre los 200 y 500 nm usando diferentes activos oleosos y varios polímeros preformados (Quintanar-Guerrero et al., 1998b; Mora-Huertas et al., 2010). Quintanar-Guerrero et al. (1998b), reportaron TP de 360 nm e IPD de 1 en una escala de 0 a 9 para nanocápsulas poliméricas de PLA conteniendo vitamina E. Mientras que Khayata et al. (2012) y Noronha et al. (2013), obtuvieron TP de 172 nm y 184 nm con IPD 0.25 y 0.114 respectivamente, para nanocápsulas de PCL conteniendo α -tocoferol preparadas por el método de nanoprecipitación usando acetona como disolvente orgánico. Byun et al. (2011), encontraron TP entre 247 y 1070 nm e IPD entre 0.10 y 0.70 para nanopartículas cargadas de α -tocoferol obtenidas mediante el método de emulsificación-evaporación bajo diferentes condiciones (el tipo de disolvente, concentraciones de PCL y tiempo de homogeneización por ultrasonificación). De acuerdo con Mora-Huertas et al. (2011), el tamaño de partícula depende en gran medida del método de preparación, de la naturaleza y concentración de los materiales utilizados (la composición de la fase orgánica, los materiales encapsulantes, los polímeros, los estabilizantes etc.), obteniéndose tallas de partícula mayores con el proceso de emulsificación-difusión que con el de nanoprecipitación para nanocápsulas cargadas con diclofenaco (Mora-Huertas et al., 2012). El proceso de emulsificación-difusión es un método robusto, siendo el tiempo de emulsificación y la velocidad de emulsificación los factores más importantes que influyen

sobre el TP. Una de las ventajas de este proceso son IPD estrechos y la reproducibilidad lote a lote, en comparación con el método de nanoprecipitación donde más parámetros condicionan el TP y el IPD; en este caso, el proceso de mezclado, el volumen y la composición de la fase orgánica, tienen un gran impacto en el TP y en la distribución de tamaños (Mora-Huertas et al., 2011).

Para comparar el efecto del dl- α -tocoferol y el PCL en la conservación de las manzanas, se prepararon nanopartículas sin dl- α -tocoferol (nanoesferas y nanoesferas mezcladas con goma xantana). El TP para las nanoesferas sin dl- α -tocoferol fue de 190 nm y el IPD de 0.17; en tanto que las nanoesferas/xantana sin dl- α -tocoferol tuvieron un TP de 196 nm con un IPD de 0.26, observándose un menor tamaño en comparación con las nanocápsulas-Toc, lo que es atribuido a que en estos sistemas no se encapsuló el material oleoso, por lo cual se obtiene una reducción en el TP. Zambrano-Zaragoza et al. (2014) obtuvieron resultados similares tanto para el TP como en el IPD de las nanoesferas vacías obtenidas por el método de emulsificación-difusión. Mora-Huertas et al. (2011) han señalado que con la técnica de emulsificación-difusión usando PCL de diferentes pesos moleculares (entre 14 y 80 kDa) se obtienen nanoesferas con TP entre 200 y 250 nm, indicando que a mayor peso molecular del polímero se producen partículas con tamaños ligeramente más grandes, provocado por el rearrreglo del polímero durante el proceso de precipitación, incrementando con ello el espesor de la membrana polimérica encapsulante.

La nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana conteniendo dl- α -tocoferol mostraron los menores TP de todos los sistemas preparados con 156 nm y 176 nm respectivamente con IPD de 0.22 y 0.19 en cada caso. Para nanoemulsiones de α -tocoferol preparadas con dispositivos de alta cizalla, se han reportado TP entre 80 y 400 nm, dependiendo de la cantidad de α -tocoferol encapsulado, encontrando que para las partículas más pequeñas, el 99% tienen un diámetro inferior a 150 nm (Hatanaka et al., 2010). Por su parte, Bouchemal et al. (2004) prepararon nanoemulsiones de α -tocoferol sintetizadas por el procedimiento de emulsificación espontánea, encontrando que el TP promedio fue 171 nm y mediante análisis granulométrico a partir de las micrografías de los sistemas, se corroboró que el 94% de las nanogotas tuvieron un TP cercano a 180 nm. Mediante homogeneización de alta presión, se han obtenido nanoemulsiones de α -tocoferol con TP entre 80 y 120 nm con IP

entre 0.2 y 0.4, siendo la presión de trabajo en el equipo el factor más importante que influenciaba la reducción del TP y su distribución (Cheong et al., 2008). Debido a que la obtención de las nanoemulsiones se realiza generalmente mediante dispositivos mecánicos, la energía aplicada para la ruptura de las emulsiones gruesas es la variable más importante para la reducción del TP e IPD (Solans et al., 2005). Así mismo la buena selección de los materiales como los surfactantes es indispensable para la obtención de nanoemulsiones estables y funcionales (Tadros et al., 2004).

3.1.2 Potencial zeta (ζ)

Otro parámetro importante que puede indicar en cierta medida la estabilidad de las nanopartículas es el ζ . Para todos los sistemas preparados los ζ fueron menores a -40 mV; lo que implica, que estos sistemas tienen una buena estabilidad, con menor probabilidad de flocular y coalescer, ya que de acuerdo con Mirhosseini, (2008), los sistemas dispersos que presentan un $\zeta >|25|$ mV son sistemas defloculados con buena estabilidad, pues entre más grande sea el valor absoluto del ζ se tiene una mayor repulsión eléctrica entre las partículas en dispersión (Chee-Teck, et al., 2003).

Las nanocápsulas-Toc y las nanocápsulas-Toc/xantana cargadas con dl- α -tocoferol tuvieron prácticamente el mismo potencial zeta, con -43.6 mV en promedio para ambas dispersiones (Figura 11), sugiriendo una buena estabilidad física. Resultados similares fueron reportados por Zambrano-Zaragoza et al. (2014), para nanocápsulas-Toc con y sin xantana usando PCL como biopolímero barrera. Noronha et al. (2013), también mostraron potenciales zeta <-30 mV para nanopartículas de PCL conteniendo α -tocoferol preparadas por el método de nanoprecipitación. En cambio Khayata et al. (2012), obtuvieron ζ de -16 mV para nanopartículas poliméricas usando PCL para encapsular α -tocoferol y Byun et al, (2011), encontraron ζ entre -7 y -16 mV para nanopartículas de PCL usando mezclas de disolventes durante el proceso de emulsión-evaporación. Por su parte Mora-Huertas et al. (2012), observaron que con el método de emulsificación-difusión se obtienen ζ mucho menores (~ 10 mV) que con el método de nanoprecipitación (~ 50 mV) en nanocápsulas de diclofenaco y PCL (PM ~ 14 kDa) como polímero, indicando que este fenómeno es debido a la conformación de las cadenas poliméricas durante el procedimiento de precipitación,

siendo de gran importancia la naturaleza de la fase acuosa, el grado de disociación de los carboxilatos presentes en el polímero y los aspectos metodológicos de cada procedimiento.

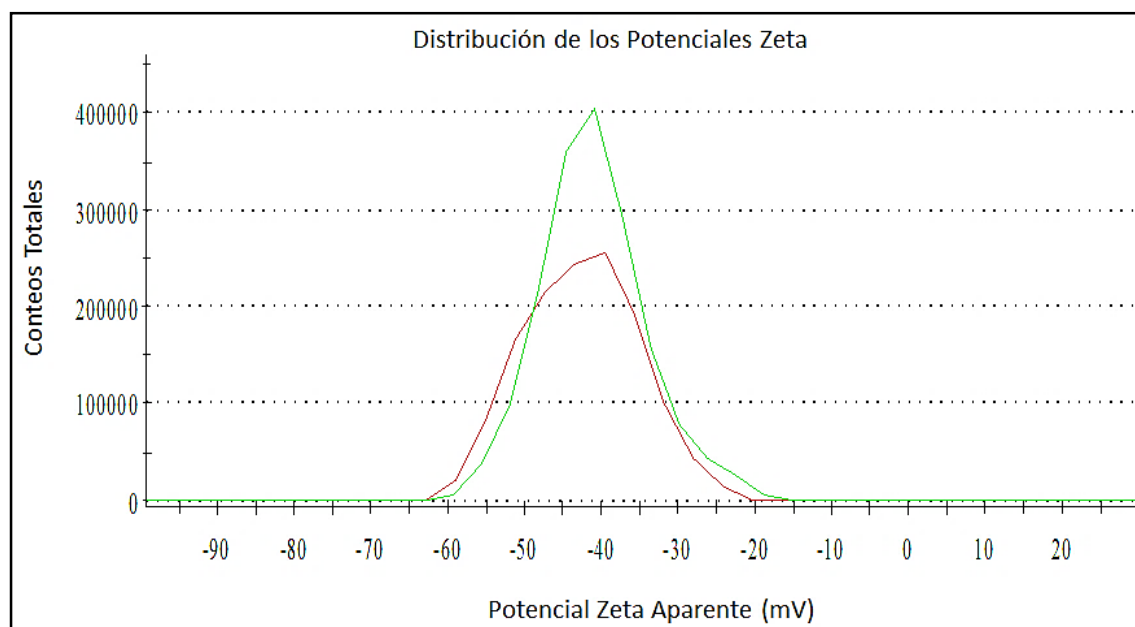


Figura 11: Distribución de los ζ para las dispersiones de nanocápsulas-Toc y nanocápsulas-Toc/xantana. **—** Nanocápsulas-Toc; **—** Nanocápsulas-Toc/xantana.

Para las nanoesferas sin carga se obtuvieron ζ de -45.36 mV, siendo ligeramente mayores que para las nanoesferas/xantana sin activo, que presentaron un valor de ζ de -48.6 mV. Zambrano-Zaragoza, et al. (2014) han reportado ζ para nanoesferas con y sin goma xantana de -45.3 y -47.7 mV respectivamente. Mientras que Mora-Huertas et al. (2011), evidenciaron valores cercanos a cero para nanoesferas preparadas por el método de emulsificación-difusión y diferentes estabilizantes no iónicos. Tanto el polímero como la concentración y tipo de estabilizante tienen un importante papel sobre el comportamiento de la doble capa difusa de las partículas. Mora-Huertas et al. (2011), indican que las altas concentraciones de estabilizantes utilizadas para la formación de las nanoesferas mediante el procedimiento de emulsificación-difusión pueden generar una densa barrera estérica, por lo cual se dificulta la medición de las cargas negativas del polímero.

En la Figura 12 se observan los ζ obtenidos para la nanoemulsión-Toc y la nanoemulsión-Toc/xantana. Los ζ promedios para la nanoemulsión-Toc y la nanoemulsión-Toc/xantana

fueron de -42.33 y de -50.05 mV respectivamente, en comparación con los resultados obtenidos en este trabajo se ha encontrado que nanoemulsiones de α -tocoferol preparadas mediante microfluidización tienen un ζ de -41 mV, usando triglicéridos de cadena media en la fase oleosa y lecitina, glicerol y decagliceril monooleato componiendo la fase acuosa (Hatanaka et al, 2010). Por su parte, Zambrano-Zaragoza et al. (2014), reportaron ζ de -52.7 mV para la nanoemulsión-Toc y -56.6 mV para la nanoemulsión-Toc/xantana. Por lo cual, existe una alta correlación de los ζ obtenidos en este trabajo y los reportados por otros autores, sugiriendo buena estabilidad de los sistemas.

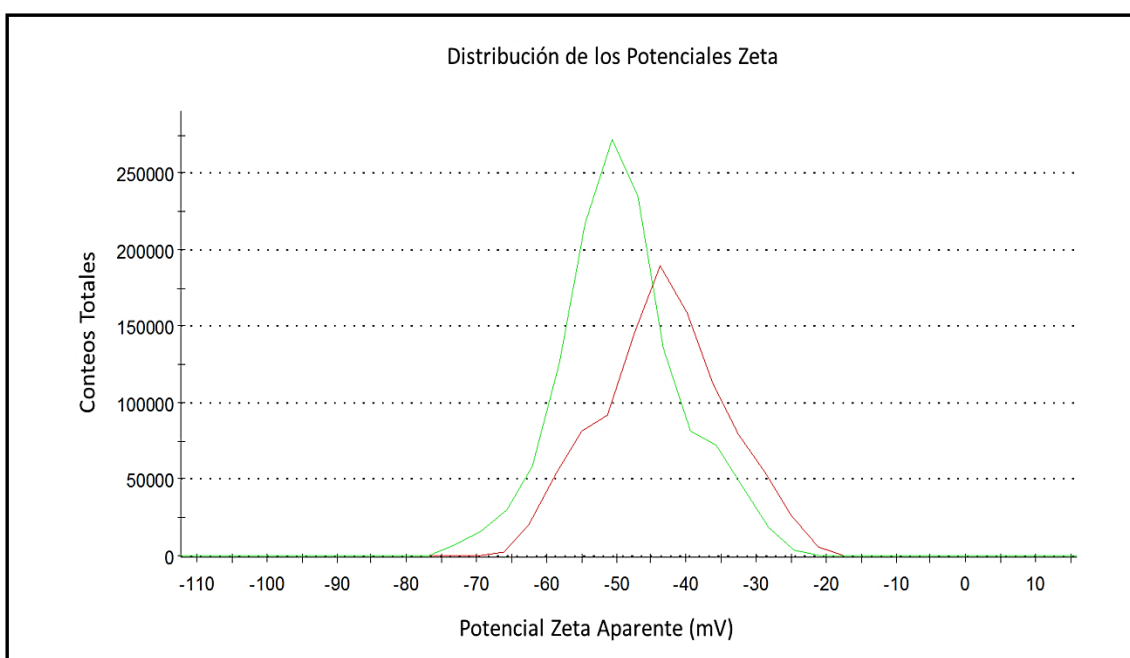


Figura 12: Distribución de los ζ de la nanoemulsión-Toc y la nanoemulsión-Toc/xantana.

— Nanoemulsión-Toc; — Nanoemulsión-Toc/xantana.

Por otra parte, en las Figuras 11 y 12, se observa que la adición de goma xantana a las dispersiones provocó un ligero decremento en el potencial zeta, siendo más evidente en las nanoesferas y en la nanemulsión-Toc. Además, generó un estrechamiento de las curvas, incrementándose el número de partículas con tendencia a la media, ya que probablemente algunas de las cadenas poliméricas de la goma xantana pueden quedar adsorbidas en la superficie de las partículas y debido a que el polisacárido presenta dos grupos carboxilato en los monómeros de ácido D-glucurónico y en el residuo de piruvato encontrados en las

cadena laterales, pueden contribuir a la disminución de la carga superficial negativa (Hennock et al., 1984), provocando un descenso en el potencial zeta (Mirhosseini et al., 2008).

Los parámetros de estabilidad como el TP, IPD y ζ , son altamente dependientes del método de preparación, la cantidad y la naturaleza química de los materiales utilizados como el tipo de polímero, el tipo de estabilizante, la naturaleza del disolvente, el material encapsulado etc. y de otros parámetros como la temperatura, el pH o la fuerza iónica del medio (Mora-Huertas et al., 2011). Las partículas preparadas en este trabajo exhiben tamaños de partícula dentro del rango nanométrico con bajos IPD y ζ ; por lo cual, pueden ser descritos como sistemas con muy buena estabilidad física, lo que es preferible cuando es necesario el almacenamiento de las dispersiones durante periodos de tiempo relativamente largos.

3.2 Caracterización morfológica de recubrimientos sobre la superficie de las manzanas

La Figura 13 (a-h) se muestra la caracterización microestructural de la superficie de manzana cortada con los diferentes recubrimientos empleados en comparación con la estructura del tejido de manzanas control. Resultados similares en la distribución nanopartículas sobre el tejido de manzanas ‘Red Delicious’ frescas cortadas han sido reportados por Zambrano-Zaragoza et al, (2014).

La Figura 13(a) es una muestra representativa de la superficie de manzana control, donde se evidencia el tejido parenquimatoso y otras estructuras celulares propias de la manzana observándose similitudes con las reportadas por Soliva-Fortuny et al. (2003) y Hye-Yeon et al. (2013). En la Figura 13(b) se observa el recubrimiento formado por la goma xantana sobre la superficie de manzana fresca cortada, mostrando una distribución uniforme que cubre la totalidad de las estructuras del tejido con aspecto característico reportado para la formación de recubrimientos de xantana sin presencia de fracturas del recubrimiento. La distribución de la goma xantana es debido a la naturaleza hidrofílica del biopolímero, el cual interacciona con la pared celular del fruto (Ward y Nussinovitch, 1997; Veiga-Santos

et al., 2005). La Figura 13(c) representa el tejido de manzana recubierto por nanocápsulas-Toc, observándose que estas se infiltraron dentro del tejido, mostrándose algunos huecos que sugieren la existencia de estructuras capsulares que fueron destruidas debido a los tratamientos y a las condiciones a las cuales se expuso la muestra. La Figura 13(d) representa el recubrimiento de nanocápsulas-Toc/xantana, evidenciándose claras diferencias con la muestra (c), donde se muestran gotas que probablemente son resultado de la acumulación de agua, lo que puede generar la estabilización de la dispersión pero es una barrera a la infiltración dentro de los espacios intercelulares del fruto. Por otro lado, la Figura 13(e) muestra la distribución de las nanoesferas encontrándose abundantemente en la superficie del fruto, pudiendo también quedar introducidas dentro de los poros del tejido. La Figura 13(f) muestra la distribución de las nanoesferas/goma xantana, de forma similar a la muestra (d) se encuentran agregados de nanopartículas de tamaño micrométrico, debido a la probable acumulación de agua; además, se observan algunos signos de fractura del recubrimiento y de acuerdo con Ward y Nussinovitch (1997), son debido a la fragilidad de la goma xantana; sin embargo, se observa una película continua que cubre el tejido en su totalidad. La Figura 13(g) muestra los glóbulos de la nanoemulsión-Toc distribuidos por toda la superficie del fruto, lo que puede favorecer a la disponibilidad del α -tocoferol. Por último, la Figura 13(h) representa al tejido recubierto por la nanoemulsión-Toc/xantana, observándose conglomerados de tamaño micrométrico como los observados con la muestra d) y f), a lo que se ha hecho mención debido a las características de la xantana, mostrando de igual manera la formación de una película continua que cubre todo el tejido cortado..

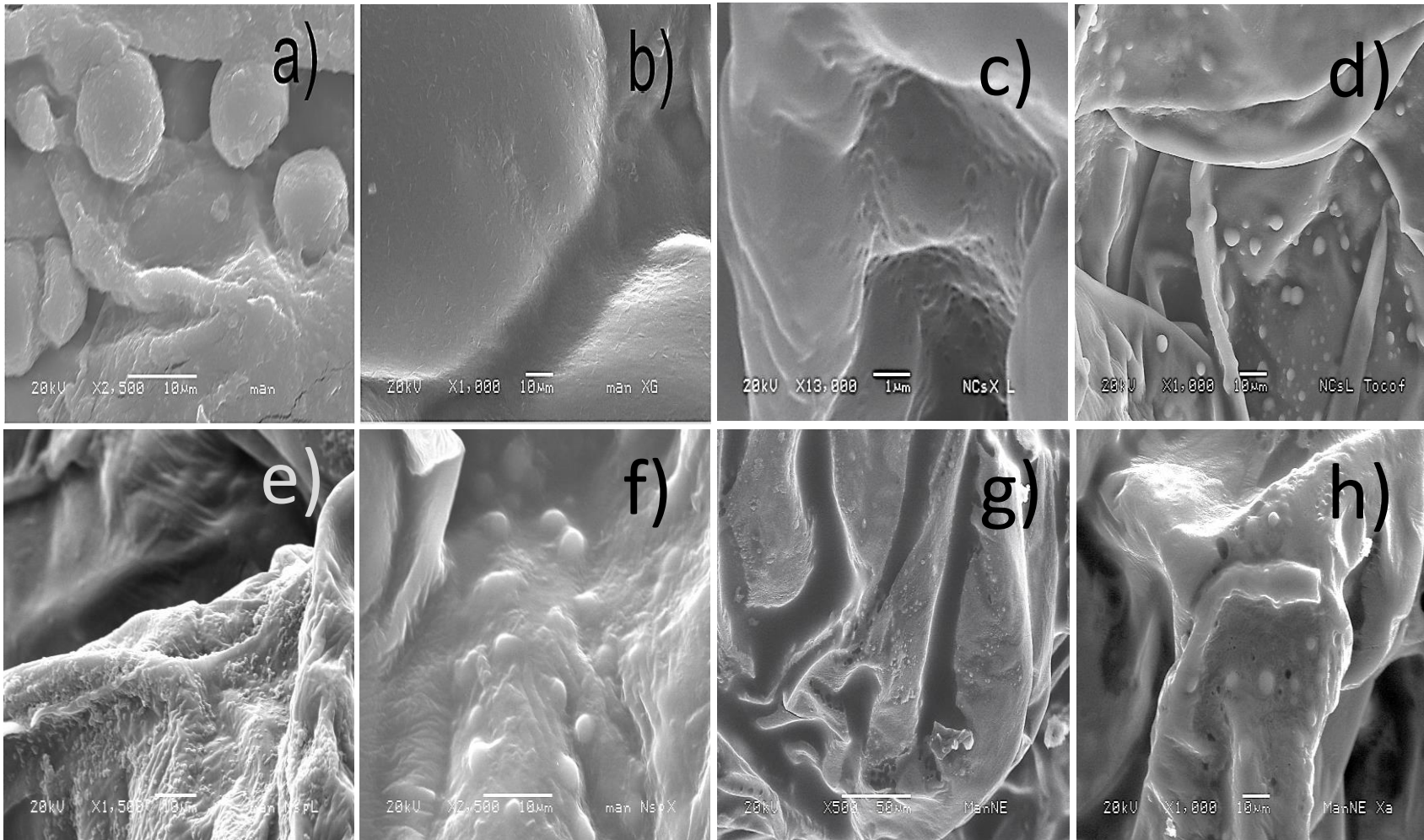


Figura 13: Micrografías de la superficie de las manzanas recubierta con los diferentes tratamientos. a) Control; b) Goma xantana; c) Nanocápsulas-Toc; d) Nanocápsulas-Toc/xantana; e) Nanoesferas; f) Nanoesferas/xantana; g) Nanoemulsión-Toc; h) Nanoemulsión-Toc/xantana.

3.3 Pérdida de peso

Los frutos frescos cortados son altamente susceptibles a la pérdida de agua debido a que los tejidos internos son expuestos al ambiente con baja humedad relativa. La pérdida de las capas protectoras o cutículas, provocan un incremento drástico en la pérdida de agua afectando la turgencia del tejido (Toivonen y Brummell, 2008; Siddiqui et al., 2011). Durante el tiempo de almacenamiento se monitoreó el porcentaje de pérdida de peso de los trozos cortados extraídos del contenedor, obtenido los resultados mostrados en la Figura 14.

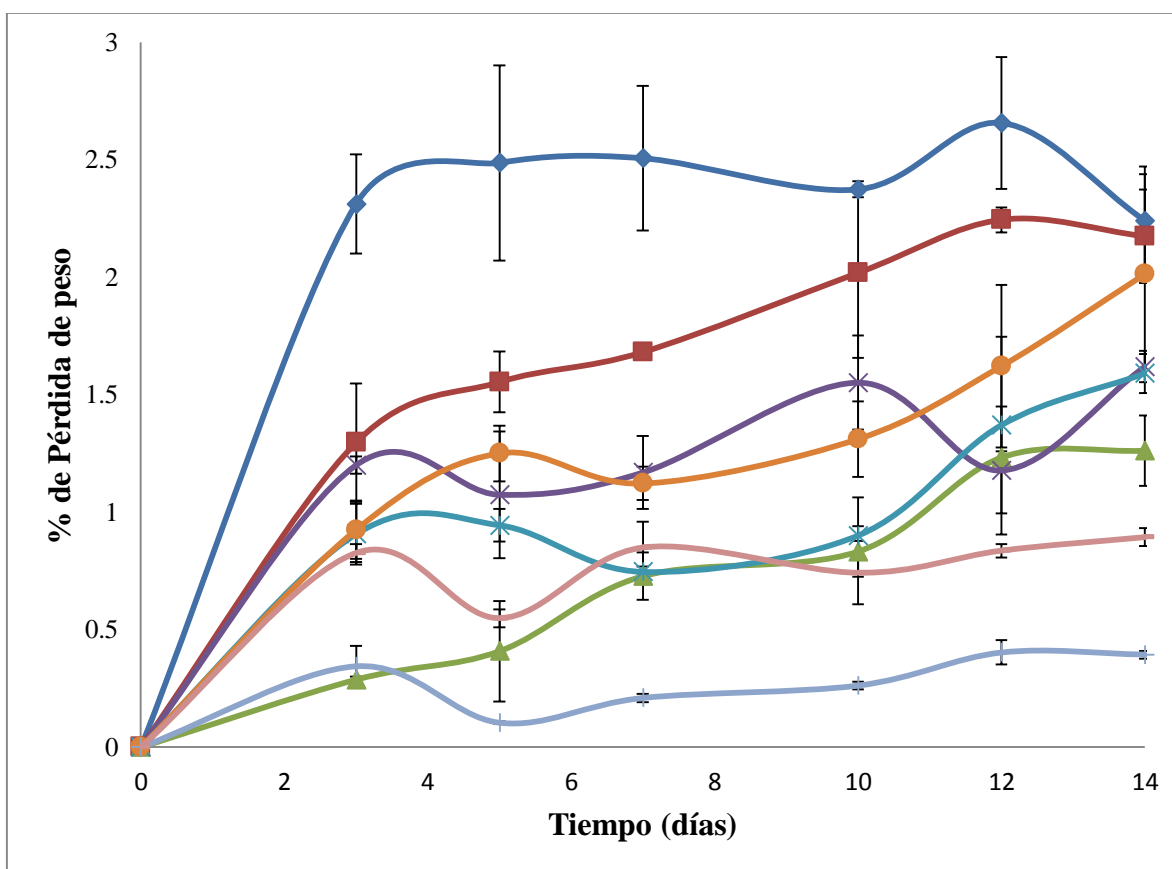


Figura 14: Porcentaje de pérdida de peso de las manzanas recubiertas con las dispersiones.

◆ Control; ■ Xantana; ▲ Nanocápsulas-Toc; ✕ Nanocápsulas-Toc/xantana;
✧ Nanoesferas; ● Nanoesferas/xantana; + Nanoemulsión-Toc;
— Nanoemulsión-Toc/xantana.

Las manzanas control mostraron una mayor pérdida de peso en comparación con las manzanas recubiertas, incrementándose desde los primeros tres días de almacenamiento (2.3%), para después mantenerse durante el resto del periodo de prueba. Resultados similares fueron obtenidos por Freitas et al. (2013), indicando una pérdida de peso de 1.9% en el día dos y del 3.6% en el día doce para manzanas ‘Gala’ tratadas con CaCl_2 . Para manzanas frescas cortadas de la variedad ‘Braeburn’ tratadas con Natureseal® y envasadas en charolas termoselladas, se encontró una pérdida de peso del 3% durante los primeros cuatro días, manteniéndose por los siguientes diez días de prueba (Röbke et al., 2011). Lo que sugiere que la mayor pérdida de agua se produce durante los primeros días de almacenamiento, provocando con ello los diferentes desordenes como la pérdida de firmeza del tejido. Por lo cual, es importante disminuir este parámetro para mantener las características sensoriales de las frutas frescas cortadas.

La goma xantana disminuyó en gran medida la pérdida de peso con respecto a las muestras control, teniendo el tratamiento con el polisacárido diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$; Anexo A.1.1). Durante el día tres, las muestras recubiertas con xantana tuvieron una pérdida de peso de 1.29% aumentando hasta 2.17% en el día catorce. Por su parte Freitas et al. (2013), encontraron para manzanas ‘Gala’ recubiertas con 0.5% goma xantana + 1% CaCl_2 + 1% glicerol, una pérdida de peso de 1.0% y 2.6% en los días tres y doce respectivamente, indicando que el recubrimiento de goma xantana por sí mismo no tiene un efecto significativo en la pérdida de peso en comparación con las muestras control, pero al adicionar sales de calcio, el sistema exhibe un efecto sinérgico. De acuerdo a Pelletier et al. (2001), la adición de altas concentraciones de electrolitos reducen la repulsión electrostática entre las cadenas de xantana, promoviendo su ordenamiento, facilitando la asociación intermolecular y desarrollando una red tridimensional. Este comportamiento de la goma xantana también ha sido observado por Baumgartner et al. (2008), en recubrimientos de xantana y calcio sobre tabletas farmacéuticas, mencionando que los iones Ca^{2+} no causan el entrecruzamiento de las cadenas poliméricas de la xantana, pero producen un apantallamiento de los grupos ionizados en los trisacáridos de las cadenas laterales, promoviendo la disminución de la repulsión intermolecular y el rearrreglo de las cadenas, generando con ello la rigidez y la firmeza de los comprimidos. Debido a lo anterior, se puede suponer que el Ca^{2+} proveniente del pretratamiento y remanente en la

superficie de las manzanas puede interactuar con las cadenas de la xantana, generando un ordenamiento polimérico; así mismo, mejorando las propiedades de transmisión de vapor de agua del recubrimiento.

Los recubrimientos de nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana, ambos sistemas conteniendo dl- α -tocoferol, también mostraron diferencia estadísticamente significativa con respecto al control ($p < 0.05$; Anexo A 1.2), obteniéndose un porcentaje de pérdida de peso de 0.39% para la nanoemulsión-Toc y 0.89% para la nanoemulsión-Toc/xantana en el último día de muestreo. Olivas et al. (2007), reportaron que la pérdida de peso de frutos recubiertos está fuertemente relacionada a la composición del recubrimiento, viéndose en la mayoría de los casos, limitada por la adición de lípidos, por lo cual al adicionar dl- α -tocoferol a las nanoemulsiones este puede mejorar las propiedades de barrera del recubrimiento lo que puede provocar una menor transmisión de vapor de agua y en consecuencia la reducción del porcentaje de pérdida de peso. Se ha reportado que emulsiones de cera de abeja y proteína de suero de leche, mezcladas con antioxidantes tienen un efecto significativo en la pérdida de peso de manzanas 'Fuji' frescas cortadas, en comparación a las muestras que sólo contenían los antioxidantes (Perez-Gago et al., 2006). Perez-Gago et al., (2005), demostraron que con recubrimientos comestibles a base de emulsiones O/W preparadas con cera de abeja en la fase oleosa e hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en la fase acuosa, redujeron poco la pérdida de peso de manzanas 'Fuji' frescas cortadas. Por su parte, McHugh y Senesi, (2000), evaluaron algunas propiedades de barrera de películas de puré de manzana conteniendo diferentes lípidos sobre manzanas 'Golden Delicious' frescas cortadas, indicando que las películas formadas a partir de los recubrimientos mostraron ser buenas barreras a la transmisión de vapor de agua; adicionalmente, las manzanas tratadas con las películas redujeron significativamente la pérdida de peso, siendo los lípidos añadidos el factor más importante en la disminución de la pérdida de peso.

Con el tratamiento de nanocápsulas-Toc la pérdida de peso se incrementó gradualmente durante el almacenamiento, teniendo un valor en este parámetro en el día tres de 0.29% y de 1.26% en el día catorce; mientras que con las nanocápsulas-Toc/xantana se tuvo un porcentaje de pérdida de 1.20% en el día tres y 1.59% en el día catorce. Sin embargo, se

observaron ligeras diferencias entre las nanocápsulas-Toc y las nanocápsulas-Toc mezcladas con xantana lo que puede ser debido a la naturaleza polisacárido matriz, que debido a sus características hidrofílicas puede disminuir ligeramente el efecto benéfico del sistema submicrónico. Además se observó una menor pérdida de peso con respecto al sistema control ($p \leq 0.05$; Anexo A1.3) y a las manzanas recubiertas con xantana, lo que puede atribuirse a que en ambos sistemas hubo dl- α -tocoferol, el cual, puede liberarse paulatinamente desde el interior de la nanocápsula lo que genera la disminución de la transmisión de vapor del recubrimiento, ya que de acuerdo con McHugh y Senesi, (2000), los componentes liposolubles adicionados, son los factores que contrarrestan la permeabilidad al vapor de agua de los recubrimientos hidrofílicos. En frutas frescas han sido utilizadas nanopartículas de quitosano directamente sobre fresas encontrando que el recubrimiento submicrónico disminuyó significativamente la pérdida de peso del producto almacenado por 20 días (Eshghi et al., 2014).

Por otro lado, las nanoesferas y las nanoesferas/xantana tuvieron un porcentaje de pérdida similar en el día tres con 0.82%; sin embargo, durante el almacenamiento mostraron diferencias en este parámetro, obteniéndose porcentajes de pérdida de peso mayores para las manzanas recubiertas con nanoesferas/xantana (1.77 %) que con las nanoesferas sin el polisacárido (1.60%) en el día catorce de muestreo, lo que puede ser debido a las características hidrofílicas de la goma xantana, ya que de acuerdo con Baldwin et al. (1996), la pérdida de peso de los frutos recubiertos depende de las características químicas de los materiales utilizados, siendo los componentes hidrofóbicos los que proporcionan mejores beneficios en el control de la pérdida de agua. En este aspecto, Qi et al. (2011) indican que la habilidad del quitosano para disminuir la pérdida de peso de manzanas 'Fuji' es debido a su insolubilidad de este polisacárido en agua; por lo cual, tiene la capacidad de formar una alta humedad relativa en la superficie de las manzanas, reduciendo el gradiente de humedades con el exterior. Sin embargo, se obtuvieron mayores porcentajes de pérdida de peso con los recubrimientos de nanoesferas sin dl- α -tocoferol que con las nanocápsulas-Toc que incluían el activo, lo que puede deberse al dl- α -tocoferol oleoso que modifica la permeabilidad de vapor de agua de los recubrimientos sobre las manzanas. Resultados que resaltan la aplicabilidad de las nanopartículas poliméricas y la importancia del tamaño de partícula en el control de la pérdida de peso y en la conservación de los alimentos.

3.4 Cambios en los parámetros de color de las manzanas recubiertas con los diferentes tratamientos

A continuación se discuten los cambios en los valores de L^* , a^* , b^* y ΔE^* de las manzanas tratadas con los diferentes sistemas como indicadores del desarrollo del oscurecimiento de las superficies cortadas. (Rocha y Morais, 2003; Rojas-Graü, 2006; Wang et al., 2007).

3.4.1 Evolución de los valores de L^* en la superficie cortada de las manzanas

Se ha documentado que la pérdida de la luminosidad es indicativo de la acumulación de compuestos oscuros en las superficies de las frutas frescas cortadas, incluyendo a las manzanas ‘Red Delicious’ (Sliva-Fortuny et al., 2001). En la Tabla 4 se muestran los valores de L^* obtenidos de la superficie cortada y recubierta de las manzanas.

Tabla 4: Valores de L^* en la superficie recubierta de las manzanas con los diferentes tratamientos								
Luminosidad (L^*)								
Día	C	GX	NCS-T	NCS-T/GX	NES	NES/GX	NE-T	NE-T/GX
0	73.7±0.2	74.8±1.6	74.9±0.4	75.3±1.7	75.2±0.2	73.6±0.3	73.2±1.0	75.0±1.3
3	72.5±0.2	74.5±0.4	75.3±1.4	73.5±0.9	75.8±0.4	73.9±0.3	73.6±0.6	74.5±1.1
5	67.6±1.1	74.7±0.4	77.5±1.3	74.1±2.0	75.7±0.5	73.1±0.9	74.0±0.9	75.8±0.9
7	65.3±0.5	73.8±0.2	76.5±1	73.7±1.1	75.2±2.1	73.3±0.2	73.8±0.2	74.6±0.9
10	64.3±0.7	70.7±0.3	74.8±1.1	74.5±0.7	75.4±1.0	71.4±1.3	71.1±1.6	73.2±0.6
12	63.9±0.2	69.3±1	74.5±1.1	73.0±0.5	74.9±1.7	70.4±0.2	71.4±0.8	71.0±0.4
14	61.2±1.9	65.4±1	72.3±0.7	71.7±0.2	71.7±1.6	70±0.2	70.3±0.5	71.4±0.2

Los valores son la media de tres mediciones ± DE.

C: Control; GX: Goma xantana; NCS-T: Nanocápsulas-Toc; NCS-T/GX: Nanocápsulas-Toc/xantana; NES: Nanoesferas; NES/GX: Nanoesferas/xantana; NE-T: Nanoemulsión-Toc; NE-T/GX: Nanoemulsión-Toc/xantana.

En la Tabla 4 se observa que la luminosidad de las manzanas control disminuyó considerablemente a partir del día cinco de almacenamiento, teniendo un decaimiento en el valor de L^* desde 73.7 en el día cero a 67.6 en el día cinco; manteniéndose sin cambios considerables durante los siguientes días, alcanzando una luminosidad del tejido en el día

catorce de 61.2. Resultados parecidos respecto a este comportamiento han sido obtenidos para manzanas 'Red Delicious' tratadas con CaCl_2 , en las cuales se observó un decremento desde 82 en el día cero a 77 en el día cinco, sin cambios aparentes durante los siguientes veinte días de prueba (López-López et al., 2013). Por su parte, Freitas et al. (2013), en manzanas 'Gala' frescas cortadas y tratadas con 1% de CaCl_2 , obtuvieron un decaimiento en el parámetro de luminosidad desde 80.1 a 73.7 en el día cinco y llegando hasta 70 en el día doce. Además en el presente estudio no se observó un cambio drástico en el valor de L^* durante los tres primeros días, como se ha evidenciado en manzanas frescas cortadas que no fueron tratadas CaCl_2 (Soliva-Fortuny et al., 2001), por lo cual, se puede considerar que el CaCl_2 tiene un efecto protector de la luminosidad durante los primeros días de almacenamiento. De acuerdo con Janovitz-Klapp (1990) y Lu et al (2007), los iones cloruro provenientes del pretratamiento con CaCl_2 pueden interferir en las reacciones de oscurecimiento debido a que interaccionan de manera no competitiva con la enzima PFO de manzanas 'Red Delicious', mostrando una ligera inhibición de la actividad que es proporcional a la cantidad de iones cloruro presentes en el producto y potencializándose con la disminución del pH; sin embargo, para inhibir completamente a la enzima es necesaria la adición de grandes cantidades de sales, lo que pone en riesgo otros atributos sensoriales como el sabor (García y Barret, 2002). La adición de iones cloruro en muchos casos no tiene un efecto significativo en la disminución de las reacciones de oscurecimiento como ha sido mostrado por Son et al. (2001) en manzanas frescas cortadas de la variedad 'Liberty' tratadas con CaCl_2 y NaCl .

Por otra parte, todos los recubrimientos comestibles utilizados en este trabajo tuvieron un efecto significativo en el control de los valores de L^* ($p \leq 0.05$; Anexo A2.1.). Las muestras recubiertas con goma xantana presentaron una pérdida de luminosidad desde 74.8 en el día cero a 65.4 en el día catorce, no observándose diferencias con los demás tratamientos durante los primeros diez días de almacenamiento, los que es atribuido a la capacidad del recubrimiento para disminuir las reacciones de oxidación, debido a que es una barrera a la transmisión de gases, provocando una disminución en la concentración de O_2 en el interior del fruto, por ende una disminución en la formación de compuestos oscuros. Freitas et al. (2013), encontraron resultados similares en manzanas 'Gala' tratadas con una dispersión de 1% glicerol + 0.5% goma xantana + 1% CaCl_2 , mencionando una pérdida de luminosidad

desde 79.7 en el día cero hasta 65.8 en el día doce de prueba, reteniendo mejor la luminosidad de las manzanas con el tratamiento de xantana y CaCl_2 que las tratadas únicamente con CaCl_2 .

Las manzanas recubiertas con los nanosistemas, tanto con las nanopartículas poliméricas y las nanoemulsiones-Toc, tuvieron menores variaciones en la luminosidad de las manzanas, mostrando pocos cambios en los valores de L^* con respecto a su condición inicial, siendo esta entre 73 y 75 y obteniéndose valores muy similares al final del periodo del almacenamiento (entre 70 y 72). Este comportamiento puede ser atribuido en gran medida a que a menor talla de partícula se produce una mayor emisión de luz del recubrimiento, ya que el coeficiente de dispersión de luz está relacionado con las características de las partículas como el tamaño, la forma, la rugosidad superficial y la cantidad de las partículas (Van de Hulst, 2012); además, la goma xantana le proporciona un cierto grado de brillantez al sistema aplicado (Ward y Nussinovitch, 1997).

De acuerdo con valores de L^* presentados para las manzanas cortadas, se observó que los recubrimiento nanométricos mostraron los mejores resultados siendo las nanocápsulas-Toc > nanoesferas = nanocápsulas-Toc/xantana = nanoesferas/xantana = nanoemulsión-Toc/xantana = nanoemulsión-Toc > xantana > control, con lo cual el uso de sistemas de talla submicrónicas tiene un efecto benéfico en la conservación de la luminosidad de la fruta cortada.

3.4.2 Cambio en el valor de a^* de las manzanas recubiertas

Otro parámetro importante asociado en la evolución de la coloración de las manzanas es el valor de a^* , que representa una cierta medida de los cambios en el color verde (-) a rojo (+) y ha sido utilizado para evaluar y monitorear el oscurecimiento de las frutas frescas cortadas (Rocha y Morais, 2003; Wang et al, 2007). En la Tabla 5 se presentan los valores de a^* obtenidos de las superficies cortadas de las manzanas control y las recubiertas con tratamientos.

Tabla 5: Valores de a* obtenidos en la superficie recubierta de las manzanas con los diferentes tratamientos

Valor de a*								
Día	C	GX	NCS-T	NCS-T/GX	NES	NES/GX	NE-T	NE-T/GX
0	- 1.8±1.2	- 2.1±0.5	- 2.7±0.2	-2.9±0.5	- 2.6±0.3	-2.8±0.1	- 2.1±0.4	-2.4±0.6
3	- 1.3±0.1	- 1.7±0.4	- 2.2±0.3	-2.6±0.2	- 2.3±0.1	-2.1±0.2	- 2.1±0.2	-1.9±0.2
5	1.0±0.6	- 0.8±0.1	- 2.5±0.5	-2.3±0.3	- 1.7±0.8	-1.6±0.2	- 1.5±0.4	-1.2±0.2
7	2.1±0.8	- 0.7±0.3	- 1.7±0.4	-1.4±0.7	- 2.5±0.6	-1.6±0.3	- 0.5±0.1	-0.6±0.3
10	2.4±0.4	- 0.1±0.3	- 1.4±0.1	-1.3±0.3	- 2.0±0.3	-0.9±1.0	- 0.3±0.5	-0.5±0.1
12	2.2±0.5	1.2±0.2	- 1.3±0.3	-1.4±0.3	- 1.5±1.2	-0.7±0.1	0.2±0.3	0.5±0.2
14	2.5±0.2	1.5± 0.1	- 1.1±0.1	-0.2±0.4	- 1.0±0.1	-0.5±0.2	0.6±0.1	1.1±0.3

Los valores son la media de tres mediciones ± DE.

C: Control; GX: Goma xantana; NCS-T: Nanocápsulas-Toc; NCS-T/GX: Nanocápsulas-Toc/xantana; NES: Nanoesferas; NES/GX: Nanoesferas/xantana; NE-T: Nanoemulsión-Toc; NE-T/GX: Nanoemulsión-Toc/xantana.

En las manzanas control el valor de a* se incrementó durante los primeros cinco días de almacenamiento desde -1.8 en el día cero a +2.1 en el día cinco, resultando en un incremento en el oscurecimiento de la superficie cortada de las manzanas. Resultados similares en los valores a* han sido reportados por Freitas et al. (2013), en manzanas ‘Gala’ frescas cortadas tratadas con 1% de CaCl₂, obteniendo un valor de a* que aumentó desde -3.98 en el día cero a -1.37 en el día cinco y para el día catorce se obtuvo un valor de +2.26. Así mismo, López-López et al. (2013), encontraron un incremento en el valor el valor de a* desde -4.0 aproximadamente a -2 en el día cinco, aumentando gradualmente durante el almacenamiento hasta alcanzar un valor de a* de 0 en el día quince, relacionándose con la producción de compuestos oscuros en manzanas ‘Red Delicious’ tratadas con CaCl₂.

En cambio para todas las muestras tratadas con los diferentes recubrimientos también se observó diferencia significativa en el valor de a* (p≤0.05; Anexo A3.1.), con respecto a los valores obtenidos para las manzanas inmersas solamente en 1% CaCl₂. Con el uso de goma

xantana como recubrimiento se encontró un aumento de esta variable pero en menor proporción que las muestras control, iniciando con un valor de -2.1 y finalizando con +1.5 en el día catorce, sugiriendo un efecto inhibitor del oscurecimiento enzimático como ha sido reportado por Freitas et al. (2013) en manzanas ‘Gala’ recubiertas con una dispersión de 0.5% de xantana + 1% glicerol + 1% CaCl₂, quienes obtuvieron un incremento en el valor de a* desde -3.98 en el día cero a +2.26 en el día doce mostrando menor oscurecimiento que las manzanas control y las tratadas con CaCl₂. Estas diferencias pueden ser atribuidas a que el polisacárido que cubre en su totalidad la superficie de las manzanas puede formar una barrera entre la fruta y el ambiente reduciendo la transmisión de gases y la concentración de O₂ en el interior del tejido, abatiendo las reacciones de oscurecimiento enzimático.

Por otra lado, para los tratamientos submicrónicos aplicados por inmersión en la superficie de las manzanas se obtuvieron valores de a* al inicio del almacenamiento entre -2.6 y -2.9, viéndose afectados durante el almacenamiento por la composición de los nanosistemas, siendo los recubrimientos de nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana los que presentaron los valores más altos al final del periodo de prueba, alcanzando valores de +0.67 y +1.11 respectivamente, de forma muy parecida al tratamiento de goma xantana (+1.54). En cambio con las nanopartículas poliméricas incluyendo a las nanocápsulas-Toc, nanocápsulas-Toc/xantana, nanoesferas y nanoesferas/xantana, los cambios en el valor de a* fueron menores en todos los casos en comparación con los tratamientos de nanoemulsión-Toc, nanoemulsión-Toc/xantana, goma xantana y control. Con las nanoesferas se determinó un valor de a* al final del almacenamiento de -1.65, mientras que para las nanoesferas/xantana se tuvo un valor de a* promedio de -0.51 en el día catorce. En tanto que para las nanocápsulas-Toc/xantana se observó un valor de a* de -1.16 y para nanocápsulas-Toc de -0.19, sugiriendo un descenso de la producción de compuestos oscuros en las superficies cortadas y recubiertas con las nanopartículas poliméricas. Freitas et al. (2013) reportan que el uso de goma xantana sola como recubrimiento comestible no tiene un efecto significativo sobre los cambios de L* y a* de manzanas ‘Gala’, pero puede servir eficazmente como acarreador otros aditivos para mantener la calidad de los frutos frescos cortados. Por lo cual los recubrimientos comestibles compuestos por nanopartículas poliméricas pueden ser una alternativa para controlar el oscurecimiento de las frutas frescas

cortadas, siendo de especial importancia los sistemas formados por nanocápsulas-Toc y nanocápsulas-Toc/xantana, en los cuales se pueden adicionar diversos aditivos oleosos para potencializar su efecto protector.

3.4.3 Cambios en los valores de b* de las manzanas cortadas y recubiertas.

Dentro del espacio de color el valor de b* representa las variaciones en los colores de (-) azul a (+) amarillo, donde un incremento importante en el color amarillo de las superficies cortadas de las manzanas pueden representar el desarrollo del oscurecimiento. En la Tabla 6 se condensan los valores de b* obtenidos colorimétricamente de la superficie cortada de las manzanas y recubierta con los diferentes tratamientos.

Tabla 6: Valores de b* obtenidos de la superficie cortada de las manzanas recubiertas.

Valor de b*								
Día	C	X	NC-T	NC-T/GX	NES	NES/GX	NE-T	NE-T/GX
0	23.0±1.3	24.0±1.5	19.7±0.5	21.6±2.2	20.5±0.3	20.6±0.3	24.9±0.5	22.9±0.7
3	25.7±4.6	24.5±0.5	21.3±0.2	21.0±0.7	20.8±0.1	20.2±0.9	22.3±1.5	22.9±0.8
5	31.8±1.8	25.6±0.7	20.8±0.4	21.6±0.3	21.8±0.7	21.9±0.8	24.3±0.2	26.3±0.6
7	31.5±1.5	26.8±0.5	22.7±0.8	22.5±0.4	22.8±0.9	23.7±1.1	25.8±0.9	25.0±0.6
10	34.3±0.6	27.2±1.1	22.0±0.7	21.5±0.2	22.7±0.4	24.7±2.3	26.3±1.8	23.1±0.7
12	34.6±0.5	27.7±0.2	23.2±0.4	22.4±0.6	23.1±0.3	24.1±0.8	26.7±0.3	24.9±1.7
14	33.9±2.6	28.3±0.9	23.1±0.6	22.7±0.6	23.3±0.5	23.9±0.8	26.4±0.2	26.4±2.0

Los valores son la media de tres mediciones ± DE.

C: Control; GX: Goma xantana; NCS-T: Nanocápsulas-Toc; NCS-T/GX: Nanocápsulas-Toc/xantana; NES: Nanoesferas; NES/GX: Nanoesferas/xantana; NE-T: Nanoemulsión-Toc; NE-T/GX: Nanoemulsión-Toc/xantana.

En la Tabla 6 se muestra que los valores de b* para el sistema control se incrementó drásticamente en el quinto día desde 25.7 en el tercer día hasta 31.8 en el día cinco y manteniéndose con ligeros incrementos hasta el final del periodo de almacenamiento. Respecto a este comportamiento se ha descrito que el incremento en este parámetro puede

ser indicativo del oscurecimiento enzimático, dando lugar a una coloración más amarillenta en la superficie del producto (Freitas et al., 2013), que en conjunto con la disminución de la luminosidad provoca una apariencia café y el decaimiento de la comercialización de las manzanas frescas cortadas.

A diferencia de las muestras control, las manzanas recubiertas mostraron pocas variaciones en los cambios del valor de b^* , con ligeros incrementos en este parámetro durante los 14 días de almacenamiento refrigerado a 4 °C, lo que es indicativo del efecto protector de los recubrimientos utilizados en este trabajo. Cabe resaltar el efecto de los sistemas submicrónicos que presentaron las menores variaciones del valor de b^* con lo cual se puede establecer que los nanorrecubrimientos tuvieron la capacidad de mantener las características visuales de las manzanas siendo el tratamiento más efectivo el recubrimiento formado por nanocápsulas-Toc/xantana > nanoemulsión-Toc > nanoesferas nanoesferas/xantana > nanocápsulas-Toc > nanoemulsión-Toc/xantana, lo cual puede ser atribuido a la capacidad de los sistemas para formar una barrera al intercambio de gases minimizando la difusión del O₂ dentro del tejido cortado, reduciendo con ello la oxidación de los compuestos fenólicos mediante la actividad enzimática de la PFO y la formación de compuestos oscuros.

3.4.4 Diferencias totales del color (ΔE^*) de las manzanas recubiertas

Las diferencias totales en el color (ΔE^*) se han usado para evaluar la evolución del oscurecimiento enzimático en la fruta en función al tiempo de almacenamiento. Este parámetro es generalmente usado para conocer las diferencias entre dos colores de acuerdo a la siguiente escala de referencia: niveles traza de diferencia $\Delta E^*=0-0.5$, ligeras diferencias $\Delta E^*=0.5-1.5$, diferencias notables $\Delta E^*=1.5-3.0$, diferencias apreciables $\Delta E^*=3.0-6.0$, grandes diferencias $\Delta E^*=6.0-12.0$, diferencias muy obvias $\Delta E^*>12.0$ (Goyeneche et al., 2014). En la Figura 15 se muestran los valores de ΔE^* calculados para las manzanas recubiertas con los diferentes tratamientos. Así mismo, para correlacionar cualitativamente los valores de ΔE^* con el aspecto real de las manzanas, en la Tabla 7 se

muestran algunas de las fotografías tomadas de los trozos envasados durante el periodo de prueba.

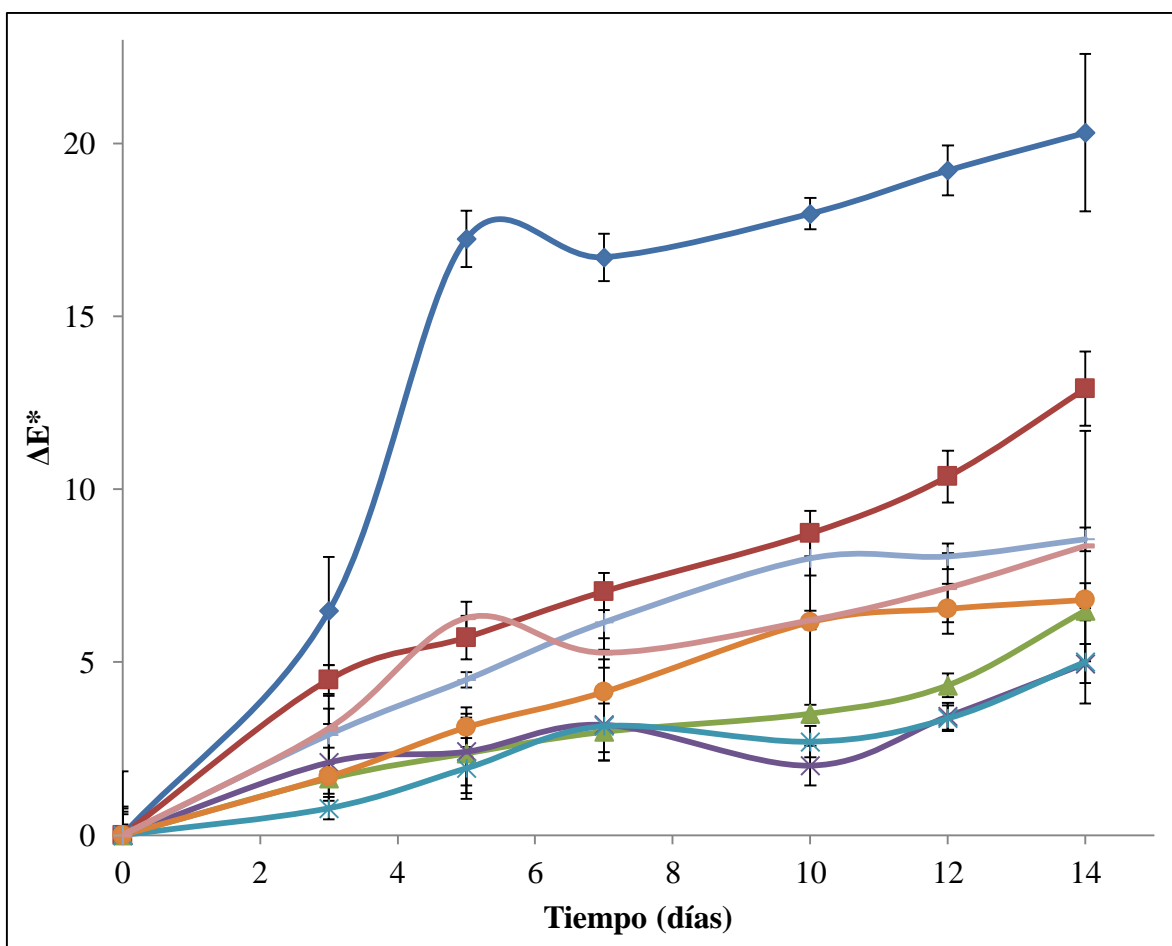


Figura 15: Diferencias totales de color (ΔE^*) de las manzanas recubiertas. \blacklozenge Control; \blacksquare Xantana; \blacktriangleup Nanocápsulas-Toc; \blacktriangledown Nanocápsulas-Toc/xantana; \blacktimes Nanoesferas; \blacklozenge Nanoesferas/xantana; \blacktriangleleft Nanoemulsión-Toc; \blacktriangleright Nanoemulsión-Toc/xantana.











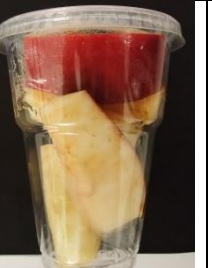

















De acuerdo con la Figura 15 para las muestras control se observó un claro incremento del ΔE^* en el día cinco, alcanzando un valor de 17.24, para posteriormente incrementarse paulatinamente hasta mostrar un ΔE^* de 20.30 asociado con el oscurecimiento del fruto. De acuerdo con la escala de referencia para los ΔE^* , se obtuvieron diferencias evidentes desde el día cinco de almacenamiento en comparación al día en que se prepararon las muestras, lo que es correspondiente con las fotos de las manzanas envasadas mostradas en la Tabla 7, donde se observa un incremento considerable en el oscurecimiento superficial pronunciado





























en el quinto día, disminuyendo con ello la luminosidad y aumentando el encafecimiento del producto.

Respecto al valor de ΔE^* calculado para el recubrimiento de la goma xantana, se encontró un incremento del ΔE^* durante todo el periodo de prueba, alcanzando para el día catorce un valor de 12.90; sin embargo, fue mucho menor al ΔE^* presentado para las muestras control, observándose que durante los 7 primeros días tuvo un comportamiento muy parecido a las manzanas tratadas con nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana, obteniéndose grandes diferencias en el cambio de coloración de la superficie durante este periodo, viéndose incrementado el valor de ΔE^* durante los siguientes dos días hasta alcanzar un valor en el ΔE^* de 12.90 en el día catorce, lo que corresponde a tener diferencias muy obvias de acuerdo a la escala de referencia con respecto a su coloración inicial. Con las fotografías de las manzanas tratadas con goma xantana (Tabla 7) se puede correlacionar los datos obtenidos metodológicamente con el aspecto visual de las manzanas, evidenciándose un incremento del oscurecimiento gradual durante todo el periodo de almacenamiento, pero en cierta medida menor que las muestras tratadas únicamente con CaCl_2 .

Los ΔE^* obtenidos para los tratamientos de nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana, indican un comportamiento similar entre ambos sistemas durante los primeros siete días de almacenamiento. La nanoemulsión-Toc obtuvo un ΔE^* de 5.27, mientras que con el recubrimiento de nanoemulsión-Toc/xantana se calculó un ΔE^* de 6.15 en dicho periodo, lo que indica que tienen diferencias apreciables con respecto a la coloración inicial. Estos resultados pueden corroborarse con las fotografías donde se observa claramente que el recubrimiento de nanoemulsión-Toc tuvo mejores resultados en el control del oscurecimiento enzimático mientras que la coloración de las manzanas tratadas con nanoemulsión-Toc/xantana fue mayor, pareciéndose a las muestras tratadas con goma xantana. Al final del periodo de prueba se observaron resultados similares en la evolución del ΔE^* para los dos sistemas, lo que coincide con las fotografías donde no se observan claras diferencias entre ambos tratamientos.

Tabla 7: Fotografías de las manzanas tratadas con los diferentes tratamientos durante 14 días en almacenamiento refrigerado.

	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 10	Día 12	Día 14
Control							
Xantana							
Nanoemulsión-Toc							
Nanoemulsión-Toc/xantana							

	Día 0	Día 3	Día 5	Día 7	Día 10	Día 12	Día 14
Nanocápsulas-Toc							
Nanocápsulas-Toc/xantana							
Nanoesferas							
Nanoesferas/xantana							

Se ha mencionado anteriormente que los nanosistemas pueden tener un efecto en la dispersión de luz y mostrar una retención de la luminosidad. Esta hipótesis puede ser ratificada mediante los valores de ΔE^* y las fotografías de las manzanas envasadas. Si bien los valores de luminosidad medidos por colorimetría se vieron casi inalterados durante el periodo de almacenamiento, en la gráfica 15 se muestra un ligero pero apreciable oscurecimiento de las superficies cortadas, siendo las nanopartículas poliméricas las que tuvieron el menor incremento en el valor de ΔE^* . Los mejores resultados los presentó el tratamiento de nanoesferas y nanocápsulas-Toc/xantana teniendo ΔE^* de 5.0 al final del periodo de almacenamiento, manteniendo por catorce días el aspecto visual de la fruta cortada, seguido por las nanocápsulas-Toc y las nanoesferas/xantana con un valor de ΔE^* de 6.4 y 6.8 respectivamente, pero el desarrollo de compuestos oscuros fue menor que en la nanoemulsión-Toc/xantana; sin embargo, no se observan claras diferencias entre la utilización de nanopartículas poliméricas como recubrimiento en las manzanas, lo que puede ser atribuido a que el polímero (poli- ϵ -caprolactona) puede formar una barrera al intercambio de gases reduciendo con ello la cantidad de O_2 dentro del alimento y disminuyendo las reacciones de oscurecimiento, como ha sido observado por Qi et al. (2011) para recubrimientos de quitosano sobre manzanas 'Fuji'. Resultados similares con respecto al comportamiento de los cambios en los parámetros de color han sido obtenidos por Zambrano-Zaragoza et al. (2014), indicando que el efecto protector de las nanocápsulas-Toc y nanocápsulas-Toc/xantana sobre el oscurecimiento enzimático puede ser atribuido también a que el dl- α -tocoferol oleoso puede intervenir en la transmisión de gases, permitiendo una disminución en las reacciones oxidativas por la reducción de O_2 en el interior del producto y disminuyendo la pérdida del color natural de las manzanas; o bien tiene un efecto protector de la composición lipídica de las membranas celulares, ya que el tocoferol nanoencapsulado puede encontrarse más disponible y actuar como captador de especies reactivas incluyendo los radicales libres generados por la oxidación de los lípidos en la membrana o inactivar especies reactivas de oxígeno, manteniendo con ello la integridad de la membrana celular (Toivonen y Brummell, 2008). Por lo cual se puede establecer que las nanopartículas poliméricas como las nanocápsulas-Toc y las nanocápsulas-Toc/xantana tienen gran potencial para la conservación de las propiedades visuales de las manzanas frescas cortadas, mostrando los menores cambios con respecto a

su condición inicial, lo que puede ser aplicado a otros frutos que de igual forma sean altamente susceptibles al oscurecimiento enzimático.

3.5 Fenoles totales en las manzanas tratadas con los diferentes sistemas

El conocimiento de la cantidad de fenoles totales en las manzanas cortadas es importante para asociarlos con las variaciones en los cambios de coloración y establecer la función de los recubrimientos comestibles como protectores de la calidad visual y la funcionalidad de las manzanas ‘Red Delicious’ frescas cortadas. La Figura 16 muestra el comportamiento en el contenido de fenoles expresados en mg equivalentes de ácido gálico por gramo de manzana (mgEAG/g), monitoreados durante los catorce días de almacenamiento a 4 °C. La amplitud de la caja representa la variabilidad de los resultados, destacando que durante el día cero se obtuvieron concentraciones de fenoles totales entre 425 y 440 mg EAG/g de manzana, valores coincidentes con los reportados por Tsao et al. (2003), para la variedad ‘Red Delicious’.

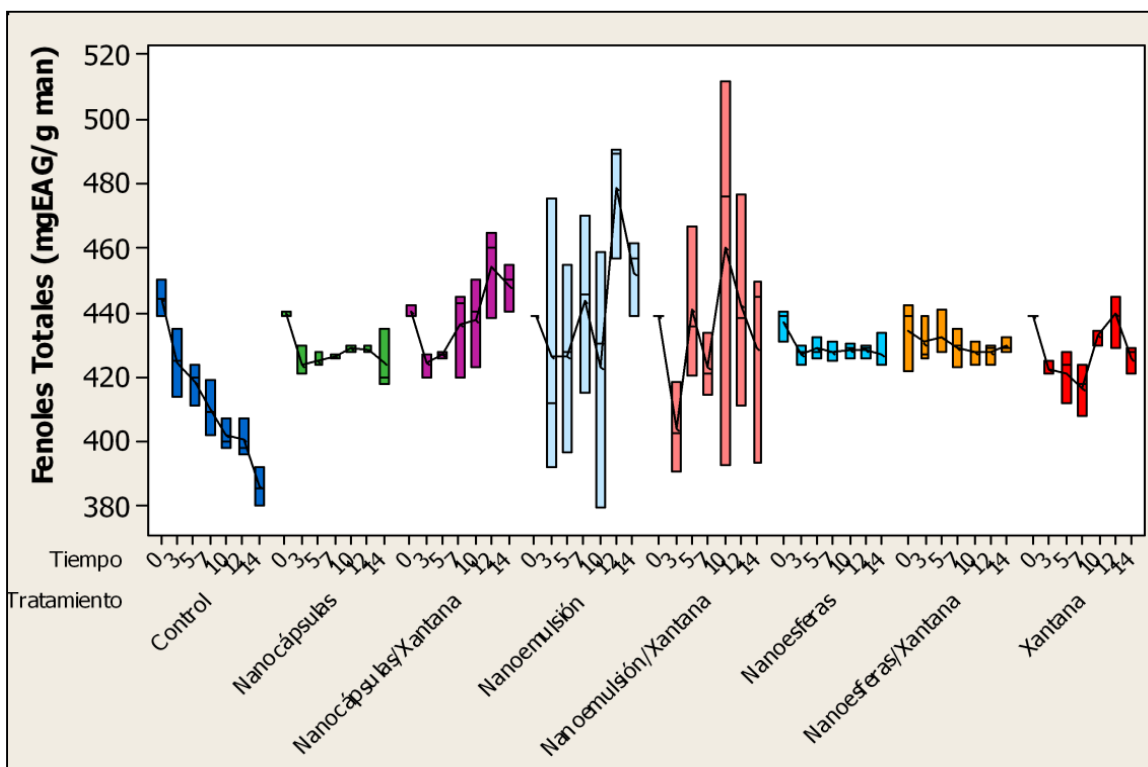


Figura 16: Concentración de fenoles totales en la superficie de las manzanas recubiertas con las diferentes dispersiones.

En las muestras control la concentración de fenoles decayó paulatinamente desde los primeros tres días de almacenamiento llegando a 385 mg EAG/g de manzana al día catorce, esta disminución se relacionó con el rápido oscurecimiento que se presentó en la superficie cortada que fue evidente después de 48 h, a su vez la oxidación de los compuestos fenólicos reduce la aceptabilidad visual por la formación de compuestos oscuros y la capacidad antioxidante del fruto (Tsao et al., 2005). El descenso de los compuestos fenólicos en manzanas ha sido reportado por diferentes autores. Cocci et al. (2006) reportaron una pérdida de fenoles en manzanas ‘Golden Delicious’ desde 8 mg EAG/g de manzana hasta 4 mg EAG/g durante los primeros tres días de almacenamiento, sugiriendo que las atmósferas modificadas pueden servir eficazmente para mantener la concentración de compuestos fenólicos; a su vez, retardar las reacciones de oscurecimiento y mantener la calidad sensorial y funcional. Se observó una mayor correlación entre el contenido de fenoles y las diferencias totales del color (ΔE^* ; $R=-0.95$) que con el valor de a^* ($R=0.88$) y el valor de L^* ($R=0.80$), lo que indica que la pérdida de fenoles es función de la evolución de los cambios totales en la coloración de las manzanas frescas cortadas. Rocha y Morais, (2002) en manzanas de la variedad ‘Jonagored’, indicaron que existe una mayor relación entre el índice de oscurecimiento y el valor de a^* (0.16), que con el valor de L^* del cual no se obtuvo la determinación. Así mismo, Amiot et al. (1992), mencionaron que el contenido de fenoles en la mayoría de las manzanas estudiadas incluyendo a las manzanas ‘Red Delicious’ no tienen buena correlación con el valor de L^* , sugiriendo que otros factores como la alta actividad PFO que exhiben estas manzanas tienen un papel importante en el desarrollo de compuestos oscuros.

Las muestras tratadas con goma xantana mostraron una disminución de la concentración de fenoles que se mantuvo hasta los siete días, lo que se relacionó con un rápido decremento en el valor de L^* ($R=0.98$) y un aumento en los valor de a^* ($R=0.98$) y ΔE^* ($R=-0.99$) durante este periodo, lo que indica que la oxidación de los compuestos fenólicos está relacionada con el incremento del oscurecimiento de las manzanas tratadas con xantana durante los primeros siete días de almacenamiento. Posteriormente hubo una acumulación de los compuestos fenólicos sin cambios significativos en el valor de a^* , lo que puede ser atribuido a la activación de la enzima PAL, que cataliza la producción de fenoles cuando se han dañado las células. De acuerdo con el análisis estadístico el recubrimiento de goma

xantana tiene un efecto significativo en el contenido de fenoles totales de las manzanas cortadas ($p \leq 0.05$; Anexo A4.1.), mostrando una mayor estabilidad de los compuestos antioxidantes durante el periodo de prueba, lo que contribuye a retardar las reacciones de oxidación en las superficies cortadas, por lo cual, con el uso del polisacárido se puede disminuir la velocidad de oxidación de compuestos fenólicos, mantener la calidad sensorial y funcional de las manzanas 'Red Delicious' frescas cortadas por lo menos durante diez días en almacenamiento a 4°C.

Con los tratamientos de nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana se observaron comportamientos muy variables respecto a la medición de fenoles totales, lo que puede ser atribuido a los surfactantes tanto Tween[®] 80 y Span[®] 80 utilizados para la formación de la nanoemulsión-Toc, que pueden en cierto grado modificar la permeabilidad de las membranas celulares y aumentar el transporte de los solutos presentes en el interior de las células no dañadas, como se ha descrito para la penetración de Ca²⁺ en manzanas de la variedad 'Granny Smith' usando diferentes surfactantes como Tween[®] 20, Armoblen NPX o Armoblen T25 (Harker y Ferguson, 1988; Harker y Ferguson, 1991), mostrando cierta linealidad en función de la concentración de tensoactivo, lo que puede dar lugar en este caso a la extracción de los compuestos fenólicos de las células intactas y ser contabilizados mediante la técnica de Folin-Ciocalteu, este fenómeno puede afectar las características sensoriales de las manzanas, ya que al ser extraídos del interior celular, los fenoles pueden interaccionar con las PFO y aumentar con ello el oscurecimiento del fruto como se ha observado en los valores de ΔE^* obtenidos para el tratamiento de nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana. Otro aspecto importante relacionado con la presencia de surfactantes es el oscurecimiento desarrollado por las manzanas provocado por la activación de la PFO que se encuentra en forma latente en el tejido del fruto. Sapers et al. (1989), observaron que el uso de Tween 20 y Tween 80 para emulsificar diferentes activos oleosos como palmitato de ascorbilo, laurato de ascorbilo y decantonato de ascorbilo, disminuyen la capacidad de los compuestos para reducir el oscurecimiento enzimático, observándose un efecto adverso induciendo el oscurecimiento, lo cual es debido a la acción detergente de los surfactantes que tienen la habilidad de solubilizar y activar las PFO ligadas a las membranas. Debido a los factores externos que influyen la concentración de compuestos fenólicos en las manzanas tratadas con las nanoemulsiones-Toc, se obtuvieron

bajas correlaciones entre la concentración de compuestos fenólicos y los cambios en la coloración de la fruta.

Por otra parte, el contenido de fenoles en las manzanas tratadas con las nanopartículas poliméricas mostró pocas variaciones a lo largo del periodo de almacenamiento, observándose un ligero decremento de los compuestos fenólicos en el día tres para las nanocápsulas-Toc y las nanocápsulas-Toc/xantana. Para estos tratamientos, la concentración de fenoles disminuyó de 440 a 424 mg EAG/100g de manzana en ambos casos. Mientras que para las nanoesferas y las nanoesferas/xantana los fenoles totales permanecieron prácticamente constantes durante todo el almacenamiento, por lo cual, se obtuvieron bajas relaciones entre los compuestos fenólicos y los parámetros L^* , a^* y el ΔE^* siendo $R < 0.30$ en todos los casos. Lo que sugiere que los recubrimientos de nanopartículas poliméricas sirven eficazmente para conservar una concentración de compuestos fenólicos casi inalterada en la superficie de las manzanas coadyuvando a reducir la formación de pigmentos cafés, debido probablemente a la funcionalidad tanto del polímero en talla submicrónica empleado, así como al hecho de que en las nanocápsulas-Toc aportaron en todo momento α -tocoferol que contribuyó a captar las especies reactivas como los radicales libre y mantener los compuestos bioactivos. De acuerdo con el análisis estadístico el uso de nanopartículas poliméricas con y sin goma xantana mostraron un efecto significativo en la conservación de los compuestos fenólicos ($\alpha \leq 0.05$; Anexo A4.3.). Para zanahorias peladas y recubiertas una dispersión de celulosa, no se observó un efecto significativo en la concentración de fenoles totales en el producto (Howard y Dewi, 1996). En contraste con lo obtenido por Simões et al. (2009) en zanahorias recubiertas con quitosano, indicando que el recubrimiento tiene un efecto significativo para la conservación de los fenoles y la vida útil de las zanahorias. Por lo cual, las nanodispersiones pueden servir eficazmente para minimizar la oxidación de los compuestos fenólicos y mantener la características sensoriales y funcionales de las manzanas durante los catorce días en almacenamiento refrigerado.

De manera general se evidenció que con todos los recubrimientos utilizados incluyendo a las nanoemulsiones y la goma xantana se obtuvo la protección de los compuestos fenólicos; sin embargo, los mejores resultados fueron mostrados por los sistemas poliméricos de talla

submicrónica como las nanocápsulas-Toc y las nanocápsulas-Toc/xantana que tuvieron gran potencial para mantener una concentración casi inalterable de fenoles totales en la superficie de las manzanas durante los catorce días de almacenamiento refrigerado, con lo cual se conservan las características funcionales y sensoriales de la fruta cortada en almacenamiento a 4°C.

3.6 Actividad PFO de las manzanas recubiertas

Uno de los parámetros más importantes a considerar para determinar la efectividad de tratamientos en frutas frescas cortadas es monitorear los cambios en la actividad PFO durante el almacenamiento del producto (Rojas-Graü et al., 2006). La Figura 17 muestra el comportamiento de la actividad PFO en función al tratamiento y tiempo de almacenamiento, donde se observa que todos los tratamientos presentan un máximo de actividad PFO con la subsecuente reducción de esta. Qi et al. (2011), reportaron comportamientos similares de la actividad PFO usando recubrimientos de quitosano como acarreador de agentes antioscurecimiento sobre manzanas ‘Fuji’ frescas cortadas. Además, para manzanas ‘Red Delicious’ se han reportado actividades enzimáticas de 1230 (U/mL) sumando las actividades del mesocarpio y endocarpio del fruto (Wakayama, 1995), resultados que son similares a los obtenidos en este trabajo que fueron de 1170 U/mL en el día cero.

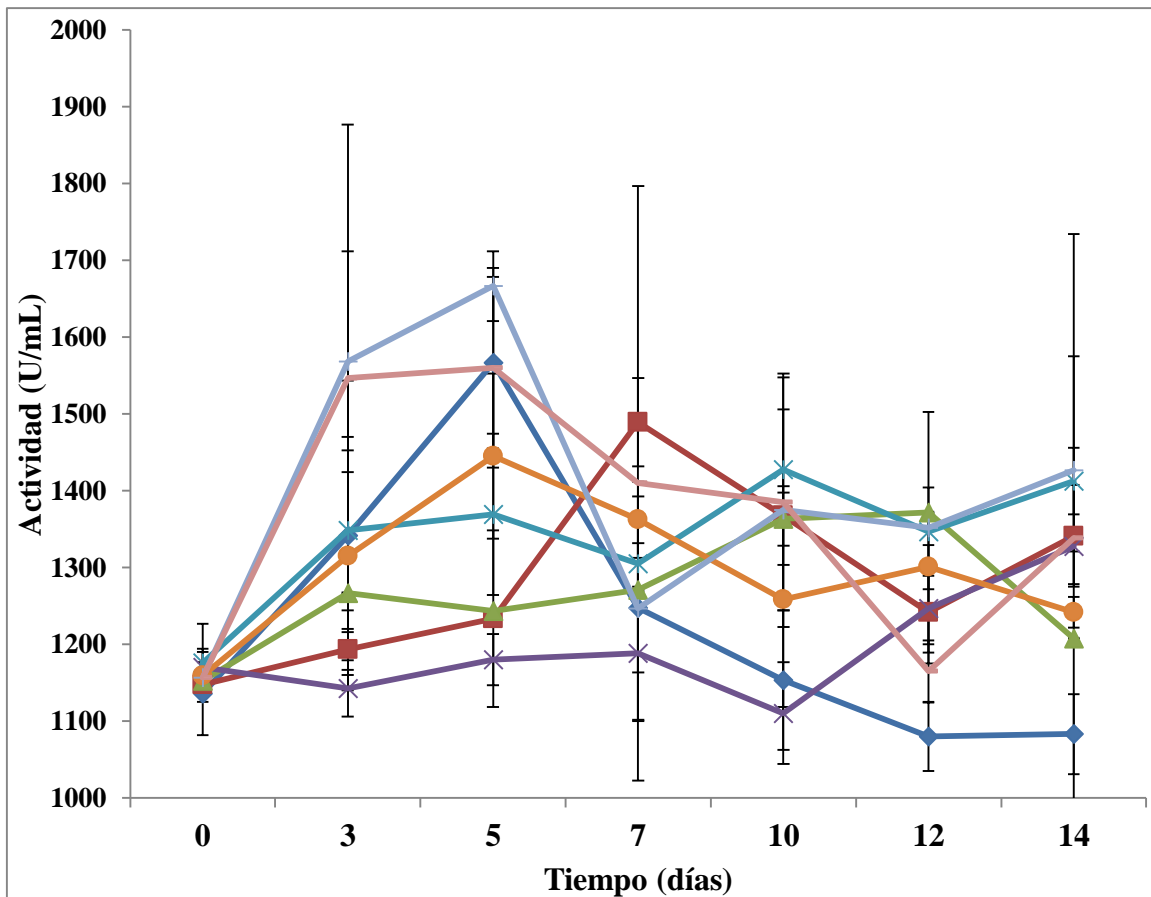


Figura 17: Actividad PFO de las manzanas cortadas y tratadas con los diferentes sistemas. ● Control; ■ Xantana; ▲ Nanocapsulas-Toc; × Nanocapsulas-Toc/xantana; * Nanoesferas; ● Nanoesferas/xantana; + Nanoemulsión-Toc; ■ Nanoemulsión-Toc/xantana.

La actividad PFO en las muestras control aumentó a razón de 85 U/mL día hasta el día cinco alcanzando una actividad promedio de 1,567 U/mL, encontrándose una correlación con las diferencias totales en el color ($R=0.92$), con en el valor de L^* ($R=-0.92$) y con el valor de a^* ($R=0.94$) y con la reducción de los compuestos fenólicos ($R=-0.93$) durante los primeros cinco días, indicando que el oscurecimiento de las muestras es promovido por la oxidación de los compuestos fenólicos mediante la activación de la PFO. En este aspecto, Coseteng y Lee (1987), han indicado que en las manzanas ‘Delicious’, ‘RI Greening’, ‘McIntosh’ y ‘Cortland’, el oscurecimiento está mayormente correlacionado con la

actividad de la enzima PFO que con la oxidación de los compuestos fenólicos. Además, Amiot et al. (1992), indicaron que en las manzanas 'Red Delicious' el factor determinante en el desarrollo de compuestos oscuros es la alta actividad PFO que presentan las manzanas.

Las manzanas tratadas con goma xantana tuvieron un máximo de actividad hasta el día siete con 1489 U/mL, que se relacionó mejor con las diferencias totales de color ($R=0.87$) y la disminución de sustratos ($R=-0.82$), que con el valor de L^* y a^* ($R<0.50$), lo que indica que el oscurecimiento de las manzana está directamente dependiente de la disminución de los compuestos fenólicos, mostrando diferencia estadísticamente significativa respecto al sistema control ($p\leq 0.05$; Anexo A5.1.). Para recubrimientos comestibles compuestos por 2% ácido ascórbico + 0.5% CaCl_2 + 1% quitosano sobre manzanas frescas cortadas de la variedad 'Fuji', Qi et al. (2011) encontraron una máxima actividad PFO durante el sexto día de almacenamiento indicando que el tratamiento retarda el oscurecimiento enzimático debido a que la actividad PFO es disminuida y se expresa días después que las manzanas control; así mismo, se observó que la goma xantana tiene efectos benéficos en la conservación de la fruta, ya que logró extender la máxima actividad de la enzima PFO hasta el día siete, lo que conlleva a retardar el oscurecimiento enzimático manteniendo la calidad sensorial y funcional de las manzanas.

De los sistemas de talla submicrónica la nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana mostraron incrementos en la actividad PFO a los cinco días de almacenamiento con 1,666 y 1,560 U/mL respectivamente. Este incremento probablemente es debido al efecto de los surfactantes, ya que se ha reportado que los detergentes como el Tween[®]80 han sido utilizados para mejorar la solubilización de las PFO's ligadas a las membranas de los cloroplastos durante el proceso de extracción de la enzima (Harel y Mayer, 1971). Además, Yang et al. (2007) encontraron que la enzima tirosinasa de hongos responde a diferentes surfactantes, siendo activada por tensoactivos no iónicos como el Brij 52, en cambio con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) se observó una disminución de la actividad. Así mismo como ha sido reportado por Sapers et al. (1989), los surfactantes como Tween 20 y Tween 80 pueden tener un efecto adverso en el control del oscurecimiento de manzanas porvocado por la solubilización y activación de las PFO latentes. Por otra parte, la relación

de la PFO obtenida para la nanoemulsión-Toc con respecto a los cambios en los valores de ΔE^* ($R=0.91$) fue mayor que con los valores de a^* y L^* ($R<0.5$) y sin relación con la concentración de compuestos fenólicos. De forma similar para el tratamiento de nanoemulsión-Toc/xantana se observó una mejor relación entre la actividad PFO y el valor de ΔE^* ($R=0.90$) que con el valor de a^* ($R=0.49$) y no se observó relación con el valor de L^* y la cantidad de fenoles totales en la superficie del fruto, lo que sugiere que el incremento en la actividad enzimática es atribuida a los surfactantes como el Tween[®] 80 que fueron empleados para la formación del sistema disperso, dando lugar al oscurecimiento de las manzanas cortadas.

En la Figura 17, se muestra también el comportamiento de las nanoesferas/xantana que mostraron un máximo a los cinco días de almacenamiento, con una actividad PFO de 1,445 U/mL que de cualquier manera es menor a la actividad obtenida por las nanoemulsiones-Toc. La actividad PFO de las manzanas con nanoesferas/xantana se relacionó con el incremento en el ΔE^* ($R=0.91$) y en el valor de a^* ($R=-0.98$). Para los tratamientos de nanoesferas sin el polisacárido, la máxima actividad PFO se presentó en el día diez con una actividad PFO de 1428 U/mL, relacionándose mayormente con un aumento en el valor de ΔE^* ($R=0.95$) que con el valor de a^* ($R=0.77$) y L^* ($R=-0.52$), sin que existiera relación con la pérdida de fenoles ya que su concentración se mantuvo prácticamente constante.

En tanto que las nanocápsulas-Toc y nanocápsulas-Toc/xantana mostraron los mejores resultados en el control de la actividad PFO, teniendo una actividad promedio de 1208 y 1327 U/mL hasta día doce y día catorce respectivamente, lo que representó una diferencia evidente con respecto a los tratamientos con goma xantana e inclusive aquellos en los cuales se emplearon nanoemulsiones. Además, se observaron claras diferencias con el uso de nanocápsulas-Toc/xantana durante los diez primeros días con respecto al resto de los tratamientos, presentando las menores actividades catalíticas; a su vez, esta disminución se relacionó con ligeras variaciones en el valor de a^* ($R=0.75$) y con el ΔE^* ($R=0.90$), indicando que la disminución de las actividades catalíticas tienen un efecto potencial en la conservación de los compuestos polifenólicos. De acuerdo con el análisis estadístico se observó que los tratamientos de nanopartículas poliméricas muestran diferencias significativas sobre la expresión de la PFO ($p\leq 0.05$; Anexo A5.2) con respecto al control.

La mayoría de los recubrimientos conteniendo partículas submicrónicas, en especial las nanocápsulas-Toc y las nanocápsulas-Toc/xantana, lograron extender la expresión de la PFO, lo cual es atribuido al polímero PCL utilizado para la formación de las nanopartículas poliméricas, observándose la integración de los sistemas en la superficie del fruto cortado con lo cual se disminuye la transmisión de O₂ al interior de las manzanas debido a las buenas propiedades de barrera proporcionadas por el PCL (Myllymaki et al., 1998), así mismo el α -tocoferol incluido en las nanocápsulas-Toc puede ayudar a mejorar la integridad de la membrana celular, con lo cual se disminuye el rompimiento celular causada por la degradación de los lípidos de la membrana que puede traer en consecuencia un incremento en la oxidación de los compuestos fenólicos y el oscurecimiento enzimático. El uso de nanopartículas poliméricas directamente sobre frutos ha sido poco explorado; sin embargo, Eshghi et al. (2014) usaron nanopartículas de quitosano sobre fresas, indicando que la formación del nanorrecubrimiento afecta la velocidad de respiración por ende la actividad PFO. También Qi et al. (2011) mostraron que el tratamiento compuesto por 2% ácido ascórbico + 0.5% CaCl₂ + 1% quitosano inhibe la expresión de la PFO hasta el día seis de almacenamiento en manzanas 'Fuji', resultados que demuestran la potencialidad de las nanopartículas poliméricas usadas en este trabajo para la conservación de las manzanas.

Los recubrimientos comestibles formados a partir de nanopartículas como las nanocápsulas-Toc y nanocápsulas-Toc/xantana han mostrado tener gran efectividad en el control de la expresión de la enzima PFO lo que conllevó al bajo oscurecimiento en las superficies cortadas y la disminución en la pérdida de fenoles, promoviendo así la conservación del fruto desde el punto de vista funcional y sensorial. Respecto a las menores correlaciones encontradas entre la actividad PFO y el valor de L* con los sistemas submicrónicos, estas pueden ser explicadas por los fenómenos de dispersión de luz debidos a la talla nanométrica lo que genera en apariencia la retención de la luminosidad en las muestras.

3.7 Firmeza de las manzanas recubiertas con los diferentes sistemas

Uno de los factores más importantes para la comercialización de las frutas frescas cortadas es la firmeza, que está ligada a la estructura celular del tejido. Sin embargo, durante el almacenamiento la firmeza de las frutas frescas cortadas tiende a cambiar disminuyendo con ello su aceptabilidad. En la Figura 18 se muestran los cambios en la firmeza de la superficie cortada de las manzanas tratadas con los diferentes recubrimientos durante catorce días de almacenamiento, donde las cajas representan la desviación estándar de las tres mediciones. De acuerdo con el análisis estadístico se observó que todos los recubrimientos utilizados tuvieron diferencia estadísticamente significativa sobre los cambios de firmeza de las manzanas ($p \leq 0.05$; Anexo A6.1)

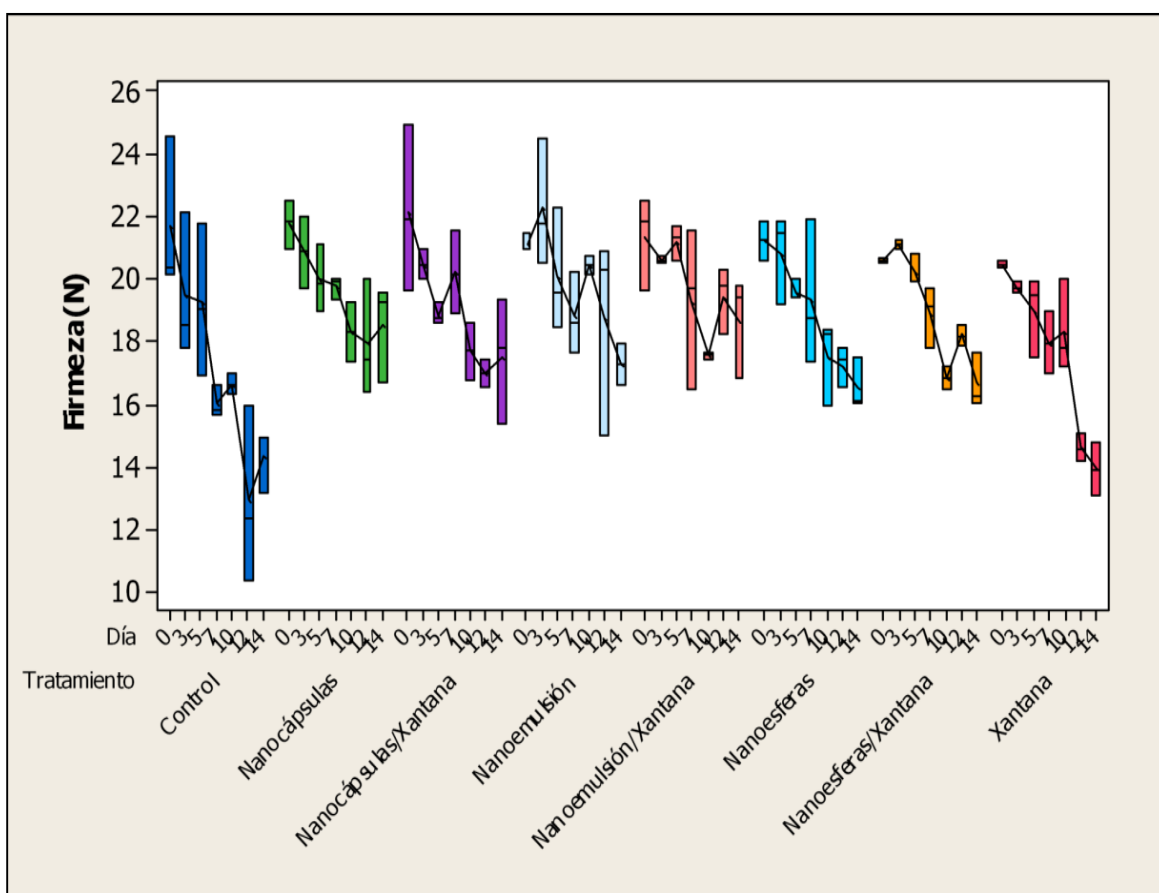


Figura 18: Cambios en la firmeza de las manzanas recubiertas con las dispersiones durante catorce días de almacenamiento refrigerado.

La firmeza de las manzanas control decayó progresivamente desde los primeros días de almacenamiento y durante todo el periodo de prueba. En el día cero se obtuvo una firmeza promedio de 21.7 N reduciéndose hasta alcanzar 14.31 N en el día catorce de almacenamiento, lo que correspondió con una pérdida del 34% con respecto a su condición inicial. Para manzanas tratadas únicamente con sales de calcio se ha encontrado una disminución en la firmeza en manzanas durante el periodo de almacenamiento. López-López et al. (2013), indicaron resultado similares con una pérdida de firmeza desde 43.7 a 35 N en manzanas ‘Red Delicious’ cortadas y tratadas con 1% de CaCl_2 , encontrando una retención de la firmeza en comparación con las muestras control sin ningún tratamiento, sugiriendo también que un tratamiento de calor puede aumentar la firmeza de las manzanas. Luo et al. (2011), encontraron resultados similares para las manzanas ‘Red Delicious’ frescas cortadas y tratadas con CaCl_2 y diferentes agentes antioscurecimiento encontrando que las manzanas tratadas con la sal de calcio mantuvieron la firmeza del producto por catorce días, siendo la firmeza final para las manzanas tratadas mucho mayor (33 N) que las manzanas sin tratamiento (28 N). Sobre manzanas ‘Fuji’ tratadas con lactato de calcio se encontró una pérdida de firmeza desde 10.11 a 9.32 N durante dos semanas en almacenamiento refrigerado, indicando que el tratamiento no mostró diferencias significativas en comparación con las muestras sin tratamiento (Alandes et al, 2006). Así mismo, Alandes et al. (2009) no encontraron efecto significativo en la conservación de la textura usando lactato de calcio para manzanas ‘Fuji’ y peras ‘Piel de Sapo’, pero se observó la retención de la firmeza en peras ‘Flor de Invierno’ por efecto del tratamiento. Por su parte, Soliva-Fortuny et al. (2006) observaron una pérdida de firmeza en manzanas ‘Golden Delicous’ tratadas con CaCl_2 desde 6 a 4 N durante dos semanas en almacenamiento, siendo la pérdida de textura mucho menor que las manzanas no tratadas. La retención de la firmeza observada con la adición de sales de calcio es debida principalmente a que los iones Ca^{2+} pueden interaccionar con las pectinas desmetiladas, entrecruzándolas y manteniendo la estabilidad estructural de la pared celular de las manzanas; sin embargo, los recubrimientos utilizados en este trabajo fueron más efectivos para disminuir la pérdida de firmeza en las manzanas.

Las manzanas recubiertas con goma xantana mostraron una ligera disminución de la firmeza durante los primeros 10 días desde 20.53 en el día cero a 18.31 en el día diez,

teniendo una pérdida de firmeza del 10% y no evidenciándose diferencia con los demás tratamientos durante este periodo; sin embargo, se observó que después del día diez la firmeza de las manzanas decayó drásticamente, teniendo un valor de firmeza en el día doce de 14.60 N y finalizando en 13.9 N en el día catorce, siendo en % de pérdida del 28.6% y del 31.39% respectivamente con respecto a su condición en el día cero, no mostrando diferencias significativas ($p > 0.05$, Anexo A6.2) respecto a las manzanas control durante este periodo. Para manzanas ‘Red Delicious’ tratadas con goma xantana Zambrano-Zaragoza et al. (2014) encontraron una pérdida de firmeza similar a la reportada en este trabajo que fue del 28% con respecto a la firmeza inicial durante dieciocho días de almacenamiento refrigerado. Freitas et al. (2013) indicaron que un tratamiento de goma xantana sola no tiene un efecto significativo en los cambios de firmeza de las superficie cortada de manzanas ‘Gala’, pero al adicionar CaCl_2 y glicerol como plastificante, se observó un aumento en la firmeza de las muestras. Lo que demuestra la aplicabilidad de la goma xantana para controlar la pérdida de firmeza de las manzanas almacenadas en por lo menos diez días.

Las manzanas recubiertas con nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana mostraron comportamientos similares entre sí, con la disminución paulatina de la firmeza pero en menor medida que las manzanas control y las recubiertas de goma xantana teniendo una firmeza inicial para la nanoemulsión-Toc y la nanoemulsión-Toc/xantana de 21.13 y 21.34 N respectivamente y llegando a 17.26 N con la nanoemulsión-Toc y 18.68 N para la nanoemulsión-Toc/xantana, siendo en términos de porcentaje de pérdida del 18.3% y 12.5% respectivamente, mostrando diferencias significativas entre las nanoemulsiones y las muestras control ($p \leq 0.05$; Anexo A6.3). Para manzanas ‘Red Delicious’ tratadas con nanoemulsiones conteniendo α -tocoferol y nanoemulsión-Toc/xantana se reportó una pérdida de firmeza del 37% y del 28% respectivamente, indicando que el sistema de nanoemulsión-Toc fue el menos efectivo para reducir la pérdida de firmeza de las manzanas frescas cortadas por quince días; sin embargo, los resultados presentados en este trabajo mostraron una mayor variabilidad en la firmeza, lo que hace inferir que si bien con la media se obtienen valores similares a los demás tratamientos submicrónicos, las cajas que representan la desviación estándar pueden mostrar que en algunos casos se obtienen valores inferiores en la firmeza de las manzanas tratadas con las nanoemulsiones.

Por otra parte, con los tratamientos de nanoesferas y nanoesferas/xantana se obtuvieron las mayores pérdidas de firmeza de todos los sistemas submicrónicos. Para las nanoesferas se observó una disminución de la fuerza necesaria para romper el tejido desde su condición inicial (21.23 N) y durante los catorce días de almacenamiento teniendo una firmeza final de 16.55 N, siendo el porcentaje de pérdida de firmeza del 22%. En cambio las manzanas tratadas con nanoesferas/xantana presentaron una firmeza en el día cero de 20.62 N y en el día catorce de 16.64 N teniendo un porcentaje de pérdida de 19.30%, mostrando diferencia estadísticamente significativas respecto a la firmeza de las muestras control ($p \leq 0.05$; Anexo A6.4)

Las manzanas recubiertas con nanocápsulas-Toc mostraron los mejores resultados con respecto a la retención de la firmeza, decayendo desde 21.78 N en el día cero a 18.53 N en el día catorce, teniendo una pérdida de firmeza del 11.7% respecto a su condición inicial. En cambio con las nanocápsulas-Toc/xantana se obtuvo una pérdida de firmeza un poco mayor siendo del 14.3%, lo que puede ser atribuido a que los recubrimientos formados pueden contribuir a la disminución de los procesos fisiológicos y la respiración de la fruta, reduciendo con ello la senescencia de los tejidos. Las ligeras diferencias entre ambos recubrimientos también puede ser atribuidas a la pérdida de agua presentadas en la Figura 14 ya que se observó que las nanocápsulas-Toc/xantana perdieron más peso que las nanocápsulas-Toc solas, dando lugar a una disminución de la turgencia del fruto por ende una menor firmeza. Aún queda incierto el papel del α -tocoferol sobre la conservación de la firmeza del fruto ya que de acuerdo con el análisis estadístico no se obtuvo diferencia significativa entre las nanocápsulas-Toc y las nanoesferas ($p > 0.05$; Anexo A6.5), deduciendo que el PCL está mayoritariamente implicado en el mantenimiento de la firmeza de las manzanas; sin embargo el α -tocoferol puede tener un efecto protector capaz de ligarse a moléculas oxidantes y reducir las reacciones de deterioro dentro de la membrana celular. En este aspecto el deterioro de la membrana celular se incrementa como respuesta a los cortes de los tejidos mediante la producción de radicales de oxígeno, los cuales tienen el potencial de interactuar con los lípidos contenidos en las membranas celulares del fruto y causar la propagación de la oxidación de los componentes lipídicos; así mismo, se incrementan las actividades de enzimas lipooxigenasas, produciendo también la degradación de los componentes de la membrana, teniendo como consecuencia el

rompimiento celular y la mezcla de los componentes intercelulares (Toivonen y DeEll, 2002). Por lo cual, el α -tocoferol incluido en las nanopartículas puede incorporarse dentro del espacio intermembrana de las manzanas, corrigiendo los desordenes provocados por los procesamientos mínimos, contribuyendo a proteger los componentes lipídicos, las funciones, la rigidez y estructura de la membrana celular (Munné-Bosch y Alegre, 2002), lo que se manifiesta en una mayor retención de la firmeza de las manzanas cortadas. Resultados similares en el comportamiento de la firmeza de los sistemas nanoparticulados conteniendo tocoferol fueron reportados por Zambrano-Zaragoza et al. (2014) quienes reportan que con el tratamiento de nanocápsulas-Toc se obtuvieron los mejores resultados en el control de la firmeza de manzanas 'Red Delicious' frescas cortadas.

Se estableció que la utilización de partículas submicrónicas como recubrimientos para manzanas pueden tener grandes beneficios en el control de las pérdidas en firmeza de las manzanas, mostrando que con el uso de nanocápsulas-Toc se tienen los mejores resultados en la conservación de este parámetro, atribuido a la distribución y la capacidad del polímero en formar una película sobre la superficie del tejido, evitando las reacciones de deterioro del fruto cortado.

3.8 Actividad PME de las manzanas cortadas y recubiertas con las dispersiones

Las enzimas pécticas como la PME están implicadas en los procesos de degradación de las cadenas de homogalacturonanos que conforman las pectinas. Por lo cual la determinación del efecto de los recubrimientos nanométricos sobre la actividad enzimática de la PME es indispensable para correlacionarlas con la pérdida de firmeza en las manzanas. En la Figura 19 se muestran los cambios en la actividad de la PME con los diferentes tratamientos. Para todas las manzanas incluyendo al control y las recubiertas, se encontró un incremento de la actividad durante el periodo de almacenamiento.

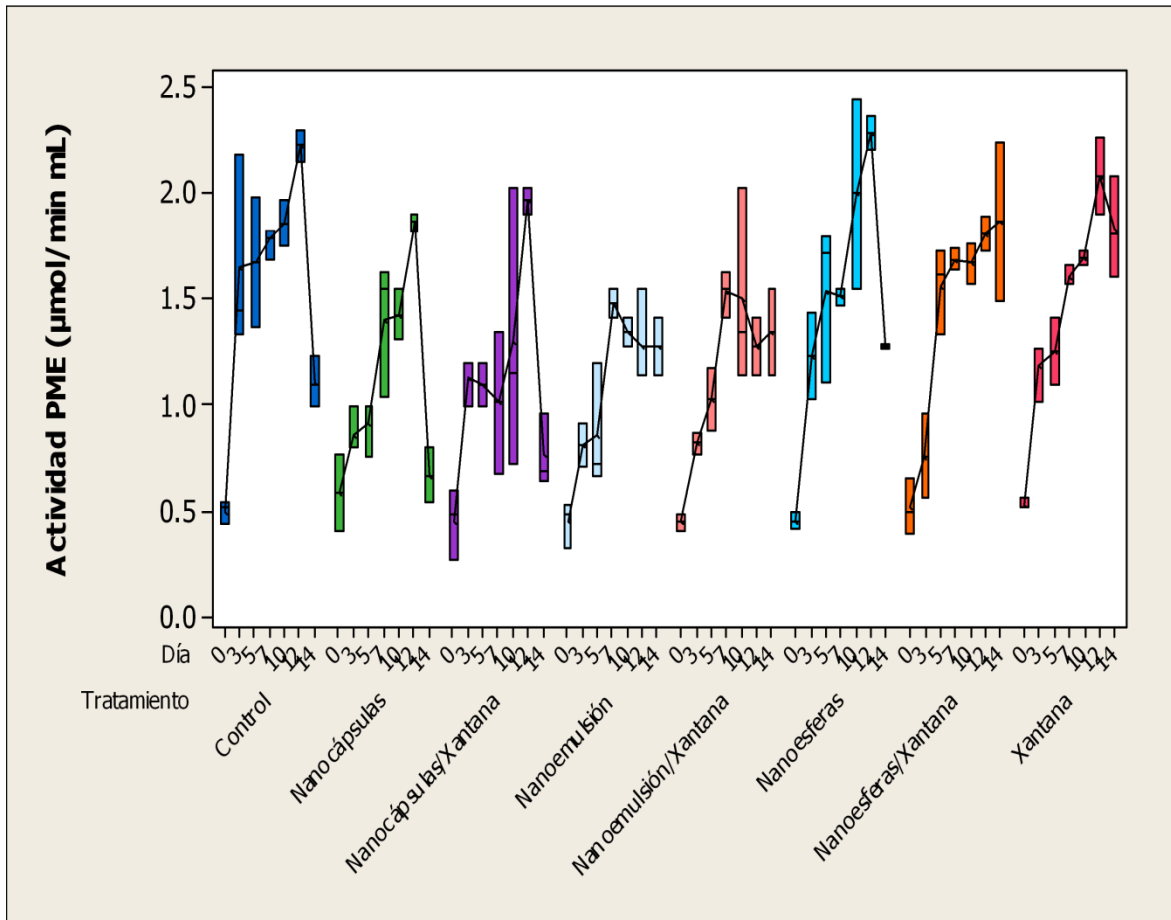


Figura 19: Evolución de la actividad PME de las manzanas recubiertas con los diferentes sistemas coloidales.

La Figura 19 muestra que las manzanas control, a diferencia de los demás tratamientos, tuvo un aumento considerable en la actividad PME durante los primeros cinco días, alcanzando una actividad de $1.65 \mu\text{mol}/\text{min mL}$ en el día tres, que se relacionó con la pérdida de firmeza de las manzanas ($R=-0.99$), así mismo, la actividad catalítica siguió en ascenso durante los siguientes días hasta una actividad máxima en el día doce de $2.22 \mu\text{mol}/\text{min mL}$ relacionándose de igual manera con el decaimiento de la firmeza. Con respecto a las actividades PME encontradas en otros frutos se ha reportado que en papayas ‘Maradol’ frescas cortadas y no recubiertas con quitosano mostraron las actividades PME más elevadas durante todo el periodo de prueba; donde también desde los tres días se observó un aumento considerable de la actividad. En manzanas ‘Fuji’ frescas cortadas

tratadas con lactato de calcio la actividad PME se incrementó desde 32 nkat/mL hasta 105.33 nkat/mL en la segunda semana de almacenamiento, al igual que en peras ‘Piel de Sapo’ tratadas con lactato de calcio que mostraron una actividad ascendente desde 142 nkat/mL a 212 nkat/mL durante la primera semana de almacenamiento (Alandes et al, 2009). En melones ‘Galia’ frescos cortado se observó un aumento significativo de la actividad PME tratadas con diferentes sales de calcio incluyendo al CaCl_2 (Silveira et al, 2011). Se ha sugerido que el incremento de la actividad PME utilizando sales de calcio puede ser debido a que los iones Ca^{2+} pueden activar a la enzima PME actuando como un cofactor (Degraeve et al, 2003; Anthon y Barrett, 2006). El calcio al igual que otros compuestos metálicos pueden unirse a la enzima para producir cambios estructurales o conformacionales más activos, lo que hace que aumente la cantidad de ácido liberado por la PME, por el aumento en el número de sitios activos con las pectinas (Alandes et al. 2009). Las tendencias en la actividad PME mostradas en este trabajo son comparables a las obtenidas en otros estudios, sugiriendo en varios casos que el aumento de la actividad enzimática y la presencia de sales de calcio están relacionadas con una disminución en la pérdida de firmeza; sin embargo, también se ha reportado que la adición de sales de calcio no es un factor en la pérdida de firmeza en manzanas ‘Fuji’ frescas-cortadas (Raybaudi-Massilia et al, 2007).

En el caso de las manzanas recubiertas con goma xantana, el incremento de la actividad PME fue menor que en las muestras control, aumentando desde 0.52 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ iniciales a 1.69 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ a los diez días, lo que se relacionó con el 10.46% de pérdida de firmeza ($R=-0.93$); mostrándose un incremento considerable en los días posteriores llegando al día doce con una actividad catalítica de 2.08 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$, lo que se correlacionó con la pérdida de firmeza del 31.93% ($R=-0.86$). De acuerdo con el análisis estadístico, no se observó influencia del recubrimiento de goma xantana sobre la actividad PME después del décimo día ($p>0.05$; Anexo A7.1), lo que coincide con los resultados obtenidos para la firmeza entre las muestras recubiertas con la goma xantana y las control, donde el polisacárido tampoco mostró un efecto significativo en el control de la firmeza después del décimo día de almacenamiento.

Las manzanas tratadas con nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana mostraron el mayor efecto en el control de la PME presentando un máximo de actividad en el día siete con ambos tratamientos, determinándose una actividad PME de 1.48 y 1.53 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ respectivamente, con la subsecuente estabilización de la actividad por el resto del almacenamiento. Este comportamiento puede ser debido a la presencia de los surfactantes como el Tween[®] 80, puesto que se ha descrito que los surfactantes tienen un efecto en la inhibición de la PME siendo más pronunciado el efecto con los surfactantes catiónicos como el dodecil sulfato de sodio o el lauril sulfato de sodio (Anthon y Barrett, 2012); sin embargo, también se ha mostrado que concentraciones bajas de detergentes no iónicos como el Tween[®] 80 pueden tener una ligera disminución de la actividad PME, por lo cual los nanosistemas compuestos por nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana presentan dicho comportamiento reduciendo la actividad PME lo que conlleva a la disminución de la pérdida de textura de las manzanas.

Para las nanoesferas y nanoesferas/xantana se observó un rápido incremento en la actividad PME en función al tiempo de almacenamiento durante los primeros siete días, encontrándose una actividad para las nanoesferas y nanoesferas/xantana en el día siete de 1.51 y 1.68 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ respectivamente, teniendo una correlación con la pérdida de textura $R=-0.91$ y $R=-0.81$ para cada caso, e incrementándose durante los días siguientes hasta alcanzar una actividad máxima de 2.28 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ para las nanoesferas en el día doce y de 1.86 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ para las nanoesferas/xantana en el día catorce. De acuerdo con el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa ($p>0.05$; Anexo A7.2) con respecto al control, lo que sugiere que con los tratamientos con nanoesferas no se redujo la actividad PME en las manzanas, en cambio se logró la estabilidad de la firmeza.

Las muestras recubiertas con las nanocápsulas-Toc y nanocápsulas-Toc/xantana presentaron menores incrementos en la actividad PME. Para las nanocápsulas-Toc la actividad PME se incrementó constantemente desde 0.57 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ en el día cero hasta 1.86 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ en el día doce, correlacionándose con la pérdida de firmeza ($R=-0.91$). En tanto la actividad PME en las manzanas recubiertas con nanocápsulas-Toc/xantana se incrementó desde 0.44 $\mu\text{mol}/\text{min mL}$ hasta 1.96 $\mu\text{mol}/\text{min}$ correlacionándose de igual manera con la pérdida de firmeza ($R=0.89$) de las manzanas, además se observaron

diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos nanoencapsulados y las manzanas control ($p \leq 0.05$; Anexo A7.3), lo que permite indicar que los recubrimientos tanto el de nanocápsulas-Toc como el de nanocápsulas-Toc/xantana disminuyen en cierta medida la actividad enzimática PME, manteniendo con ello las características de firmeza de las manzanas.

Adicionalmente, las menores correlaciones entre la PME y los cambios en la textura pueden ser atribuidos al CaCl_2 que puede activar a la PME o bien por efecto de los tratamientos; sin embargo, se demostró que con los tratamientos submicrónicos conteniendo α -tocoferol se obtuvo un efecto significativo en la reducción de la actividad PME con lo cual se logró mantener la textura de las manzanas, siendo el tratamiento más efectivo el recubrimiento de nanocápsulas-Toc > nanoemulsión-Toc > nanoemulsión-Toc/xantana > nanocápsulas-Toc/xantana.

3.9 Actividad PG de las manzanas cortadas y tratadas con los diferentes sistemas

Finalmente, para correlacionar la degradación de las cadenas pécticas con la pérdida de firmeza se evaluó el efecto de los recubrimientos sobre los cambios de la actividad PG, que se ha descrito tiene un importante papel en la despolimerización de los homogalacturonanos provocando la solubilización de las cadenas y la pérdida estructural de la pared celular, generando el reblandecimiento del tejido. Los resultados para las actividades PG obtenidas con los diferentes tratamientos en función del tiempo de almacenamiento se presentan en la Figura 20. Donde se observa que todos los tratamientos con nanopartículas tuvieron las menores actividades PG.

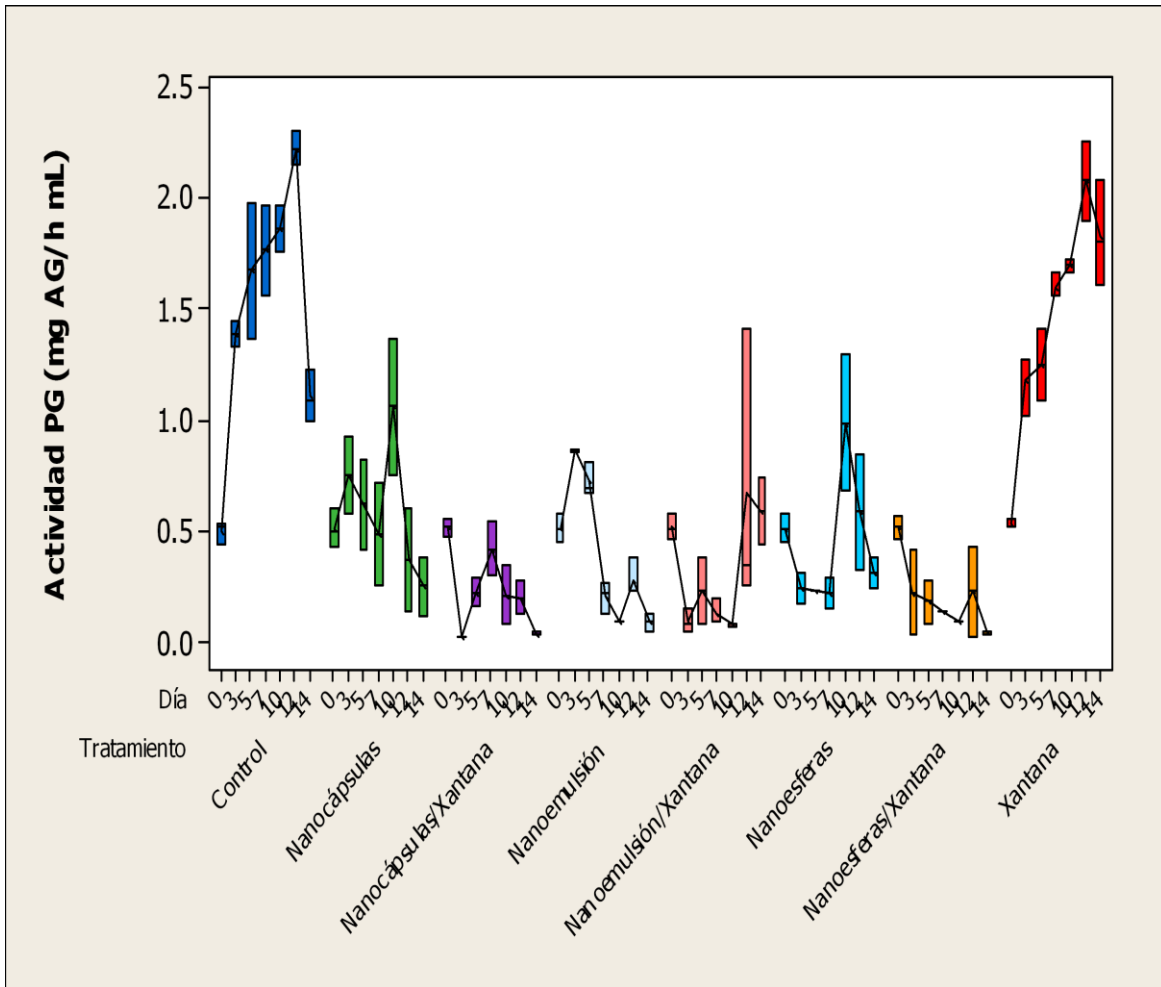


Figura 20: Actividades enzimáticas PG para las manzanas recubiertas con las diferentes dispersiones en función al tiempo de almacenamiento.

Para las muestras tratadas con CaCl_2 , se encontró que presentaron un aumento en la actividad PG desde los primeros tres días de almacenamiento desde 0.49 mgAG/h mL hasta 1.38 en el día tres, para continuar aumentando hasta el día doce donde se alcanzó una máxima actividad enzimática con un promedio de 2.22 mgAG/h mL. Este comportamiento puede deberse a los iones Ca^{2+} procedentes del pretratamiento pueden activar de igual forma a las enzimas PG's como ha sido estudiado por Pathak y Sanwal, (1998), estos autores encontraron que las enzimas PG's de plátano responden a diferentes concentraciones de iones metálicos incluyendo los iones Ca^{2+} , incrementándose con aumento en la concentración de calcio.

Las muestras tratadas con goma xantana mostraron un incremento desde 0.52 mgAG/h mL en el día cero hasta 2.08 mgAG/h en el día doce, no mostrando diferencia estadísticamente significativa entre las muestras control y las tratadas con xantana ($p > 0.05$; Anexo A8.2), sugiriendo que el recubrimiento formado por el polisacárido no tiene un efecto en la reducción de la actividad PG. La alta actividad PG presentada en el sistema control puede ser explicada por la inducción del estrés de los tejidos promovidos por los procesamientos mínimos. Silveira et al. (2011), documentaron para melones tratados con diferentes sales de calcio, un incremento en la actividad PG durante los primeros cuatro días indicando que una alta actividad PME durante los primeros días puede conllevar a una alta actividad PG y la pérdida de la textura, resultados coincidentes a los presentados en este trabajo donde las muestras control y las tratadas con goma xantana mostraron un incremento significativo en la actividad PME durante los primeros días de almacenamiento, así mismo un incremento en la actividad PG. Así mismo, se encontró una buena correlación entre la actividad PME y PG en el tratamiento control ($R=0.98$) y las manzanas tratadas con xantana ($R=0.99$), indicando que en principio la PME puede actuar desmetilando las cadenas de homogalacturonanos en la pectinas para que posteriormente sean despolimerizadas por la PG, produciendo la solubilización de las pectinas y reduciendo con ello la firmeza superficial de las manzanas.

En general, todos los recubrimientos submicrónicos mostraron las menores actividades PG con respecto al control y al recubrimiento de goma xantana, mostrando diferencia estadísticamente significativa en función al sistema control ($p \leq 0.05$; Anexo A8.2), indicando que los sistemas submicrónicos tienen la capacidad de disminuir la actividad enzimática PG y evitar la despolimerización de las cadenas de la membrana celular lo que conlleva a la conservación de la firmeza. Las implicaciones de la disminución de la actividad PG fueron obtenidas en la reducción de la pérdida de firmeza con la utilización de los sistemas submicrónicos. Gol et al. (2013), evaluaron recubrimientos de HPMC, CMC mezclados con quitosano sobre la actividad PG de fresas encontrando que los recubrimientos pueden disminuir la actividad catalítica de la enzima, siendo la actividad PG 2.7 veces más alta en las muestras control, el día ocho con respecto al día cero. Para zanahorias recubiertas con 1% quitosano + 0.5% CaCl_2 , existe una inhibición de la enzima PG durante el almacenamiento siendo más evidente durante el periodo final; la parcial

inactivación de la enzima reduce la solubilización de las pectinas y disminuye el reblandecimiento del tejido (Ruoyi et al., 2005). También, Zohu et al. (2011), obtuvieron resultados que evidencian el efecto de los tratamientos en peras de la variedad 'Huanghua' recubiertas a base de poliésteres de sacarosa y goma laca, indicando que la disminución de la PG se asoció con la alta integridad de la membrana celular y varios cambios en los constituyentes de la pared celular que contribuyen a mantener la firmeza de las peras.

Con el uso de los nanorrecubrimientos se logró disminuir por mucho la actividad PG lo que en consecuencia tiene gran impacto en la conservación de la firmeza de las manzanas, por lo cual la utilización de los recubrimientos comestibles a base de nanopartículas en especial las nanocápsulas-Toc conteniendo α -tocoferol pueden ser una buena opción para mantener las características de firmeza mediante el control de las actividades PME y PG.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Conclusiones

De acuerdo con los resultados presentados en este trabajo, se demostró que las nanopartículas preparadas tuvieron tamaños de partícula en el rango submicrónico, con IPD estrechos y potenciales zeta bajos, sugiriendo buena estabilidad de los sistemas.

El empleo de recubrimientos contribuyó a disminuir la pérdida de peso en las manzanas frescas cortadas, siendo las nanocápsulas-Toc y las nanoemulsiones-Toc las mostraron los mejores resultados disminuyendo más del 50% la pérdida de peso con respecto a las muestras control.

Los tratamientos aplicados en las manzanas frescas cortadas, tuvieron una reducción en la pérdida de los compuestos fenólicos en comparación con las muestras control, siendo mejor conservados por los sistemas nanométricos.

Se observaron menores cambios en los valores de L^* , a^* , b^* y ΔE^* con el uso de los recubrimientos con respecto al control, lo que indicó que hubo una menor producción de compuestos oscuros en la superficie cortada de las manzanas, obteniéndose los mejores resultados las nanopartículas poliméricas.

La máxima expresión de la enzima PFO, con los sistemas utilizados incluyendo la goma xantana, se presentó varios días después que el sistema control, siendo los recubrimientos más efectivos en retardar la actividad las nanocápsulas-Toc/xantana > nanocápsulas-Toc > nanoesferas > xantana > nanoesferas/xantana > nanoemulsión-Toc = nanoemulsión-Toc/xantana = control. Este efecto se relacionó mejor con la disminución de los cambios totales en el color que con la conservación de fenoles.

Los sistemas submicrónicos que contenían dl- α -tocoferol, mostraron los mejores resultados en la conservación de la firmeza de la superficie cortada de las manzanas, siendo los tratamientos de nanocápsulas-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana quienes mostraron la mayor efectividad en el mantenimiento de la firmeza durante catorce días de almacenamiento.

Las nanopartículas con dl- α -tocoferol disminuyeron tanto las actividades enzimáticas PME y PG con respecto a las muestras control y las tratadas con xantana, por lo cual, la disminución de ambas actividades se asociaron con el control de la firmeza en las manzanas.

De manera general, las nanopartículas poliméricas usadas como recubrimiento tienen gran potencial para preservar las características fisicoquímicas, estructurales y funcionales de la manzana 'Red Delicious' fresca cortada, pudiendo ser aplicadas a otros tipos de alimentos para conservar las propiedades de un producto fresco durante el almacenamiento, incrementando con ello la vida útil del producto.

Perspectivas

A partir de este trabajo quedan como perspectivas para posibles investigaciones posteriores:

- 1.- Evaluar las cinéticas de liberación del dl- α -tocoferol de los nanosistemas ensayados en este trabajo, utilizando métodos de separación como HPLC o electroforesis capilar.
- 2.- Realizar estudios microbiológicos para evaluar la funcionalidad de los recubrimientos como inhibidores del crecimiento de bacterias y hongos.
- 3.- Evaluar la capacidad antioxidante de las manzanas recubiertas con los sistemas de talla nanométrica en función al tiempo de almacenamiento.
- 4.- Determinar mediante HPLC el perfil polifenólico de las manzanas recubiertas durante el almacenamiento, considerando los sustratos de la PFO como el ácido clorogénico, así mismo correlacionarlos con la capacidad antioxidante del fruto.
- 5.- Determinar las propiedades mecánicas, ópticas, de transmisión de gases y vapor de agua de las películas obtenidas con las nanodispersiones, para correlacionarlas con la conservación de las manzanas frescas cortadas.

REFERENCIAS

- Alandes, L., Hernando, I., Quiles, A., Pérez-Munuera, I., y Lluch, M. A. (2006). Cell wall stability of fresh-cut fuji apples treated with calcium lactate. *Journal of Food Science*, 71(9), S615-S620.
- Alandes, L., Quiles, A., Pérez-Munuera, I., y Hernando, I. (2009). Improving the quality of fresh-cut apples, pears, and melons using natural additives. *Journal of Food Science*, 74(2), S90-S96.
- Alvarez-Parrilla, E., De La Rosa, L. A., Rodrigo-Garcia, J., Escobedo-González, R., Mercado-Mercado, G., Moyers-Montoya, E., y González-Aguilar, G. A. (2007). Dual effect of β -cyclodextrin (β -CD) on the inhibition of apple polyphenol oxidase by 4-hexylresorcinol (HR) and methyl jasmonate (MJ). *Food Chemistry*, 101(4), 1346-1356.
- Amiot, M. J., Tacchini, M., Aubert, S., y Nicolas, J. (1992). Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal of Food Science*, 57(4), 958-962.
- Anandharamakrishnan, C. (2014). *Techniques for Nanoencapsulation of Food Ingredients*. Springer Nueva York, pp. 65-67.
- Anthon, G. E., y Barrett, D. M. (2006). Characterization of the temperature activation of pectin methylesterase in green beans and tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(1), 204-211.
- Anthon, G. E., y Barrett, D. M. (2012). Pectin methylesterase activity and other factors affecting pH and titratable acidity in processing tomatoes. *Food Chemistry*, 132(2), 915-920.
- Augustin, M. A., y Hemar, Y. (2009). Nano-and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38(4), 902-912.
- Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Sitterberg, J., Bakowsky, U., y RaviKumar, M. N. V. (2005). Design of biodegradable nanoparticles: a novel approach to encapsulating poorly soluble phytochemical ellagic acid. *Nanotechnology*, 16(12), 2819-2822.
- Baldwin, E. A., Nisperos-Carriedo, M. O., y Baker, R. A. (1995). Edible coatings for lightly processed fruits and vegetables. *HortScience*, 30(1), 35-38.

- Baumgartner, S., Pavli, M., y Kristl, J. (2008). Effect of calcium ions on the gelling and drug release characteristics of xanthan matrix tablets. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 69(2), 698-707.
- Beaulieu (2011). Factors affecting sensory quality of fresh-cut produce. En: O. Martín-Belloso, y R. Soliva-Fortuny, (Eds.). *Advances in fresh-cut fruits and vegetables processing*. CRC Press, Florida, EU, 115-144.
- Benen, J.A.E., Voragen, A.G.J., y Visser, J. (2003a). Pectic enzymes. En: J.R. Whitaker, .G.J., Voragen, y D.W.S., Wong (Eds.). *Handbook of Food Enzymology*. Marcel-Dakker Inc., Nueva York, EU.
- Benen, J.A.E., y Visser, J. (2003c). Poligalacturonases. : J.R. Whitaker, A.G.J., Voragen, y D.W.S., Wong (Eds.). *Handbook of food enzymology*. Marcel-Dakker Inc., Nueva York, EU.
- Benen, J.A.E., van Alebeek, G.W.M., Voragen, A.G.J., y Visser, J. (2003b). Pectic esterases. En: J.R. Whitaker, A.G.J., Voragen, y D.W.S., Wong (Eds.). *Handbook of Food Enzymology*. Marcel-Dakker Inc., Nueva York, EU.
- Bouchemal, K., Briançon, S., Perrier, E., y Fessi, H. (2004). Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, 280(1), 241-251.
- Buta, J. G., Moline, H. E., Spaulding, D. W., y Wang, C. Y. (1999). Extending storage life of fresh-cut apples using natural products and their derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 1-6.
- Byun, Y., Whiteside, S., Cooksey, K., Darby, D., y Dawson, P. L. (2011). α -Tocopherol-loaded polycaprolactone (PCL) nanoparticles as a heat-activated oxygen scavenger. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1428-1431.
- Calderon-Lopez, B., Bartsch, J. A., Lee, C. Y., y Watkins, C. B. (2005). Cultivar effects on quality of fresh cut apple slices from 1-Methylcyclopropene (1-MCP)-treated apple fruit. *Journal of Food Science*, 70(3), S221-S227.
- Chee-Teck, T. (2003). Beverage emulsions. En: S. E. Friberg, K. Larsson, J. Sjöblom (Eds.), *Food Emulsions*. New York: Marcel Dekker, Inc. pp. 485-425.

- Cheong, J. N., Tan, C. P., Man, Y. B. C., y Misran, M. (2008). α -Tocopherol nanodispersions: preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 204-209.
- Cheyrier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., y Martens, S. (2013). Plant phenolics: Recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiology and Biochemistry*, 72, 1-20.
- Chen, S. y Nussinovitch, A. (2000). The role of xanthan gum in traditional coatings of easy peelers. *Food Hydrocolloids*, 14, 319-326.
- Chiumarelli, M., y Hubinger, M. D. (2012). Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch–carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples. *Food Hydrocolloids*, 28(1), 59-67.
- Chiumarelli, M., y Hubinger, M. D. (2014). Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. *Food Hydrocolloids*, 38, 20-27.
- Choi, Y., Tomás-Barberán, A., y Saltveit, M.E. (2005). Wound-induced phenolic accumulation and browning in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf tissue is reduced by exposure to *n*-alcohols. *Postharvest Biology and Technology*, 37(1), 47-55.
- Contreras, S.N.C. (2010). Efecto de la aplicación de vitamina E sobre la vida útil de manzana fresca cortada. Tesis de Licenciatura, Universidad nacional Autónoma de México.
- Coseteng, M. Y., y Lee, C. Y. (1987). Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *Journal of Food Science*, 52(4), 985-989.
- Denès, J. M., Baron, A., y Drilleau, J. F. (2000). Purification, properties and heat inactivation of pectin methylesterase from apple (cv Golden Delicious). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(10), 1503-1509.
- Degraeve, P., Saurel, R., y Coutel, Y. (2003). Vacuum impregnation pretreatment with pectinmethylesterase to improve firmness of pasteurized fruits. *Journal of Food Science*, 68(2), 716-721.
- Eissa, H. A., Fadel, H. H., Ibrahim, G. E., Hassan, I. M., y Elrashid, A. A. (2006). Thiol containing compounds as controlling agents of enzymatic browning in some apple products. *Food Research International*, 39(8), 855-863.

- Eshghi, S., Hashemi, M., Mohammadi, A., Badii, F., Mohammadhoseini, Z., y Ahmadi, K. (2014). Effect of nanochitosan-based coating with and without copper loaded on physicochemical and bioactive components of fresh strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duchesne) during storage. *Food and Bioprocess Technology*, doi:10.1007/s11947-014-1281-2.
- Dhall, R. K. (2013). Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(5), 435-450.
- Falguera, V., Quintero, J.P., Jiménez, A., Muñoz, J.A., y Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*. 22(6), 292-303.
- Fei, Z. (1998). Characteristics of polyphenol oxidase and its inhibition in red delicious Apple. *Acta Horticulturae Sinica*, 2.
- Freitas, I.R., Cortez-Vega, W.R., Pizato, S., Prentice-Hernández, C., y Borges, C.D. (2013). Xanthan gum as a carrier of preservative agents and calcium chloride applied on fresh-cut apple. *Journal of Food Safety*, 33(3), 229-238.
- García, E. y Barrett, D.M. (2002). Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables: science, technology and market. En: O. Lamikanra (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables science, technology and market*. CRC Press, Florida, EU, 267-304.
- García-Ochoa, F., Santos, V. E., Casas, J. A., y Gomez, E. (2000). Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances*, 18(7), 549-579.
- Garret, H. (2002). Fresh-cut produce: tracks and trends. En: O. Lamikanra (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables: science technology and market*, CRC Press, EU, 1-10.
- Garrido-Assis, O. B., y de Britto, D. (2011). Evaluation of the antifungal properties of chitosan coating on cut apples using a non-invasive image analysis technique. *Polymer International*, 60(6), 932-936.
- Gil, M. I., Gorny, J. R., y Kader, A. A. (1998). Responses of Fuji' apple slices to ascorbic acid treatments and low-oxygen atmospheres. *HortScience*, 33(2), 305-309.
- Giovane, A., Servillo, L., Balestrieri, C., Raiola, A., D'avino, R., Tamburrini, M., Ciardiello, L., y Camardella, L. (2004). Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1696(2), 245-252.

- Gol, N. B., Patel, P. R., y Rao, T. V. (2013). Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. *Postharvest Biology and Technology*, 85, 185-195.
- González-Aguilar, G. A., Valenzuela-Soto, E., Lizardi-Mendoza, J., Goycoolea, F., Martínez-Téllez, M. A., Villegas-Ochoa, M. A., y Ayala-Zavala, J. F. (2009). Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya 'Maradol'. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1), 15-23.
- Gooding, P.S., Bird, C. y Robinson, S.P. (2001). Molecular cloning and characterization of banana fruit polyphenol oxidase. *Planta*, 213(5), 748-757.
- Goyeneche, R., Agüero, M. V., Roura, S., y Di Scala, K. (2014). Application of citric acid and mild heat shock to minimally processed sliced radish: Color evaluation. *Postharvest Biology and Technology*, 93, 106-113.
- Guan, W., y Fan, X. (2010). Combination of sodium chlorite and calcium propionate reduces enzymatic browning and microbial population of fresh-cut "Granny Smith" apples. *Journal of Food Science*, 75(2), M72-M77.
- Harker, F. R., y Ferguson, I. B. (1988). Calcium ion transport across discs of the cortical flesh of apple fruit in relation to fruit development. *Physiologia Plantarum*, 74(4), 695-700.
- Harker, F. R., y Ferguson, I. B. (1991). Effects of surfactants on calcium penetration of cuticles isolated from apple fruit. *Scientia Horticulturae*, 46(3), 225-233.
- Harel, E., y Mayer, A. M. (1971). Partial purification and properties of catechol oxidases in grapes. *Phytochemistry*, 10(1), 17-22.
- Hatanaka, J., Chikamori, H., Sato, H., Uchida, S., Debari, K., Onoue, S., y Yamada, S. (2010). Physicochemical and pharmacological characterization of α -tocopherol-loaded nano-emulsion system. *International Journal of Pharmaceutics*, 396(1), 188-193.
- Howard, L. R., y Dewi, T. (1996). Minimal Processing and Edible Coating Effects on Composition and Sensory Quality of Mini-peeled Carrots. *Journal of Food Science*, 61(3), 643-646.
- Hsu, C. L., y Yen, G. C. (2008). Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(1), 53-61.

- Hye-Yeon, S., Wan-Shin, J., Nak-Bum, S., Sea, C.M., y Kyung, B.S. (2013). Quality change of apple slices coated with *Aloe vera* gel during storage. *Journal of Food Science*, 78(6), 817-822.
- Iqbal, T., Rodrigues, F. A., Mahajan, P. V., Kerry, J. P., Gil, L., Manso, M., y Cunha, L.M. (2008). Effect of minimal processing conditions on respiration rate of carrots. *Journal of Food Science*, 73 (8), 396-402.
- Jang, J. H., y Moon, K. D. (2011). Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*, 124(2), 444-449.
- James, J.B. y Ngarmasak, T. (2011). Processing of fresh-cut tropical fruits and vegetables: a technical guide. *Food and Agriculture Organization*, 1-6.
- Janovitz-Klapp, A. H., Richard, F. C., Goupy, P. M., y Nicolas, J. J. (1990). Inhibition studies on apple polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(4), 926-931.
- Johnston, J. W., Hewett, E. W., y Hertog, M. L. (2002). Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit: a review. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30(3), 145-160.
- Kader, A.A. (2002). Quality parameters on fresh-cut fruit and vegetables. En: O. Lamikanra (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables: science technology and market*, CRC Press, EU, 11-21.
- Ke, D., y Saltveit, M. E. (1989). Wound-induced ethylene production, phenolic metabolism and susceptibility to russet spotting in iceberg lettuce. *Physiologia Plantarum*, 76(3), 412-418.
- Kefeli, V. I., Kalevitch, M. V., y Borsari, B. (2003). Phenolic cycle in plants and environment. *Journal of Cell & Molecular Biology*, 2(1).
- Khayata, N., Abdelwahed, W., Chehna, M. F., Charcosset, C., y Fessi, H. (2012). Preparation of vitamin E loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method: from laboratory scale to large scale using a membrane contactor. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 419-427.
- Kim, C., y Yoo, B. (2006). Rheological properties of rice starch-xanthan gum mixtures. *Journal of Food Engineering*, 75(1), 120-128.

- Klabunde, T., Eicken, Ch., Sacchettini, J.C. y Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. *Nature Structural Biology*, 5(12), 1084-1090.
- Klessig, D. F., y Malamy, J. (1994). The salicylic acid signal in plants. *Plant Molecular Biology*. 26, 1439-1458.
- Lemarchand, C., Couvreur, P., Vauthier, C., Constantini, D., y Gref, R. (2003). Study of emulsion stabilization by graft copolymers using the optical analyzer Turbiscan. *International Journal of Pharmaceutics*, 254(1), 77-82.
- Lee, J.Y., Park, H.J., Lee, C.Y., y Choi, W. Y. (2003). Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT - Food Science and Technology*, 36(3), 323-329.
- Lin, D., y Zaho, Y. (2007). Innovations in the development and application of edible coating for fresh minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 6(3), 60-75.
- Lintas, C. (1992). Nutritional aspects of fruits and vegetables. *Consumption Options Mediterraennes*, 19, 79-87.
- Liu, C. H., y Wu, C. T. (2010). Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 353(2), 149-156.
- Lohani, S., Trivedi, P. K., y Nath, P. (2004). Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene-induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology*, 31(2), 119-126.
- López-López, M., Vega-Espinoza, A., Ayón-Reyna, L., López-Valenzuela, J., y Vega-García, M. (2013). Combined effect of hot water dipping treatment, N-acetylcysteine and calcium on quality retention and enzymatic activity of fresh-cut apple. *Journal of Food, Agriculture y Environment*, 11(2), 243-248.
- Lu, S., Luo, Y., Turner, E., y Feng, H. (2007). Efficacy of sodium chlorite as an inhibitor of enzymatic browning in apple slices. *Food Chemistry*, 104(2), 824-829.
- Luo, Y., Lu, S., Zhou, B., y Feng, H. (2011). Dual effectiveness of sodium chlorite for enzymatic browning inhibition and microbial inactivation on fresh-cut apples. *LWT-Food Science and Technology*, 44(7), 1621-1625.

- Lozano, J. E. (2006). *Fruit manufacturing: scientific basis, engineering properties, and deteriorative reactions of technological importance*. Springer, E.U., 160-166.
- Manzocco, L., Da Pieve, S., Bertolini, A., Bartolomeoli, I., Maifreni, M., Vianello, A., y Nicoli, M. C. (2011). Surface decontamination of fresh-cut apple by UV-C light exposure: Effects on structure, colour and sensory properties. *Postharvest Biology and Technology*, 61(2), 165-171.
- Martinez, M. V., y Whitaker, J. R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends in Food Science y Technology*, 6(6), 195-200.
- Mayer, A.M. y Harel, E. (1978). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18(2), 193-215.
- Marusek, C. M., Trobaugh, N. M., Flurkey, W. H., y Inlow, J. K. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100(1), 108-123.
- Moldao-Martins, M., Beirao-da-Costa, S. M., y Beirao-da-Costa, M. L. (2003). The effects of edible coatings on postharvest quality of the "Bravo de Esmolfe" apple. *European Food Research and Technology*, 217(4), 325-328.
- McClements, D.J. (1999). *Food emulsions: principles, practice, and techniques*. CRC Press, Boca Raton, EU.
- McClements, D.J., y Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285-330.
- McHugh, T. H., y Senesi, E. (2000). Apple Wraps: A Novel Method to Improve the Quality and Extend the Shelf Life of Fresh-cut Apples. *Journal of Food Science*, 65(3), 480-485.
- Mei, Y., Zhao, Y., Yang, J., y Furr, H.C. (2002). Using edible coatings to enhance nutritional and sensory qualities of baby carrots. *Journal of Food Science*, 67(5), 1964-1968.
- Micheli, F. (2001). Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 6(9), 414-419.
- Mirhosseini, H., Tan. C.P., Hamid, N.S.A., y Yusof, S. (2008). Effect of Arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and

pH of orange beverage emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315(1-3), 47-56.

Mohamed, A.Y.I., Aboul-Anean, H.E. y Hassan, A.M. (2013). Utilization of edible coating in extending the shelf life of minimally processed prickly pear. *Journal of Applied Science Research*. 9(2), 1202-1208.

Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., y Elaissari, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 385(1-2), 113-142.

Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., y Elaissari, A. (2011). Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. *Advances in Colloid and Interface Science*, 163(2), 90-122.

Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., y Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1), 67-89.

Munné-Bosch, S., y Alegre, L. (2002). The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(1), 31-57.

Myllymaki, O., Myllarinen, P., Forssell, P., Suortti, T., Lahteenkorva, K., Ahvenainen, R., y Poutanen, K. (1998). Mechanical and permeability properties of biodegradable extruded starchpolycaprolactone films. *Packaging Technology and Science*, 11(6), 265-274.

Niture, S. K. (2008). Comparative biochemical and structural characterizations of fungal polygalacturonases. *Biologia*, 63(1), 1-19.

Olivas, G. I., Mattinson, D. S., y Barbosa-Cánovas, G. V. (2007). Alginate coatings for preservation of minimally processed 'Gala' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 89-96.

Noronha, C. M., Granada, A. F., de Carvalho, S. M., Lino, R. C., de OB Maciel, M. V., y Barreto, P. L. M. (2013). Optimization of α -tocopherol loaded nanocapsules by the nanoprecipitation method. *Industrial Crops and Products*, 50, 896-903.

Olivas, G. I., Mattinson, D. S., y Barbosa-Cánovas, G. V. (2007). Alginate coatings for preservation of minimally processed 'Gala' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 89-96.

- Ortega-García, F., y Peragon, J. (2009). The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenoloxidase and phenols to cold stress in the olive tree (*Olea europea* L. cv. Picual). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1565-1573.
- Palanivelu, P. (2006). Polygalacturonases: Active site analyses and mechanism of action. *Indian Journal of Biotechnology*, 5(2), 148.
- Pathak, N., Mishra, S., y Sanwal, G. G. (2000). Purification and characterization of polygalacturonase from banana fruit. *Phytochemistry*, 54(2), 147-152.
- Park, H. J. (1999). Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science y Technology*, 10(8), 254-260.
- Park, S. I., Kodihalli, I., y Zhao, Y. (2005). Nutritional, sensory, and physicochemical properties of vitamin E and mineral-fortified fresh-cut apples by use of vacuum impregnation. *Journal of Food Science*, 70(9), S593-S599.
- Pelletier, E., Viebke, C., Meadows, J., y Williams, P. A. (2001). A rheological study of the order–disorder conformational transition of xanthan gum. *Biopolymers*, 59(5), 339-346.
- Perera, C. O., Balchin, L., Baldwin, E., Stanley, R., y Tian, M. (2003). Effect of 1-methylcyclopropene on the quality of fresh-cut apple slices. *Journal of Food Science*, 68(6), 1910-1914.
- Pelloux, J., Rustérucci, C., y Mellerowicz, E. J. (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 12(6), 267-277.
- Perez-Gago, M. B., Serra, M., y Del Rio, M. A. (2006). Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 39(1), 84-92.
- Perera, N., Gamage, T. V., Wakeling, L., GamLath, G. G. S., y Versteeg, C. (2010). Colour and texture of apples high pressure processed in pineapple juice. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 11(1), 39-46.
- Pereyra, L., Roura, S.I., y del Valle, C.E. (2005). Phenylalanine ammonia lyase activity in minimally processed Romaine lettuce. *LWT-Food Science and Technology*, 38(1), 67-72.
- Perez-Gago, M. B., Serra, M., Alonso, M., Mateos, M., y Del Río, M. A. (2005). Effect of whey protein-and hydroxypropyl methylcellulose-based edible composite coatings on color change of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 36(1), 77-85.

Perez-Gago, M. B., Serra, M., y Del Rio, M. A. (2006). Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 39(1), 84-92.

Pickersgill, R., Smith, D., Worboys, K., y Jenkins, J. (1998). Crystal structure of polygalacturonase from *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*. *Journal of Biological Chemistry*, 273(38), 24660-24664.

Pinto Reis, C., Neufeld, R. J., Ribeiro, A. J., y Veiga, F. (2006). Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2(1), 8-21.

Pizato, S., Cortez-Vega, W.R., Andreghetto, J.T., Prentice-Hernández, C. y Dellinghausen, C.D. (2013). Effects of different edible coatings in physical, chemical and microbiological characteristics of minimally processed peaches (*prunus persica* L. *BATSCH*). *Journal of Food Safety*. 30-39.

Pizzocaro, F., Torreggiani, D., y Gilardi, G. (1993). Inhibition of apple polyphenoloxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride. *Journal of Food Processing and Preservation*, 17(1), 21-30.

Pristijono, P., Wills, R. B. H., y Golding, J. B. (2006). Inhibition of browning on the surface of apple slices by short term exposure to nitric oxide (NO) gas. *Postharvest Biology and Technology*, 42(3), 256-259.

Qui, H., Hu, W., Jiang, A., Tian, M., y Li, Y. (2011). Extending shelf life of fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 12(1), 62-66.

Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., y Doelker, E. (1998a). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 24(12), 1113-1128.

Quintanar-Guerrero, D., Alléman, E., Doelker, E. y Fessi, H., (1998b). Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*, 15(7), 1056-1062.

Ramirez, E.C., Whitaker, J.R. y Virador, V.M. (2003). Polyphenol oxidase. En: J.R. Whitaker, A.G.J., Voragen, y D.W.S., Wong (Eds.). *Handbook of Food Enzymology*. Marcel-Dakker Inc., Nueva York, EU.

- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., y Cesaro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1), 219-228.
- Raybaudi-Massilia, R. M., Mosqueda-Melgar, J., Sobrino-López, A., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2007). Shelf-life extension of fresh-cut “Fuji” apples at different ripeness stages using natural substances. *Postharvest Biology and Technology*, 45(2), 265-275.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., y Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rico, D., Martín-Diana, A. B., Barat, J. M., y Barry-Ryan, C. (2007). Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables: a review. *Trends in Food Science y Technology*, 18(7), 373-386.
- Röbke, C., Brunton, N., Gormley, R. T., Wouters, R., y Butler, F. (2011). Alginate coating as carrier of oligofructose and inulin and to maintain the quality of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*, 76(1), H19-H29.
- Rocculi, P., Romani, S., y Rosa, M. D. (2004). Evaluation of physico-chemical parameters of minimally processed apples packed in non-conventional modified atmosphere. *Food Research International*, 37(4), 329-335.
- Rocha, A. M., Cano, M. P., y Galeazzi, M. A. (1998). Characterisation of ‘Starking’ apple polyphenoloxidase. *Food Control*, 12(2), 85-90.
- Rocha, A. M. C. N., y Morais, A. M. M. B. (2003). Shelf life of minimally processed apple (cv. Jonagored) determined by colour changes. *Food Control*, 14(1), 13-20.
- Rojas-Graü, M. A., Sobrino-López, A., Tapia, M. S., y Martín-Belloso, O. (2006). Browning inhibition in fresh-cut 'Fuji' apple slices by natural antibrowning agents. *Journal of Food Science*, 71(1), S59-S65.
- Rojas-Graü, M. A., Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C., Friedman, M., Henika, P. R., Martín-Belloso, O., Pan, Z., y McHugh, T. H. (2007a). Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. *Journal of Food Engineering*, 81(3), 634-641.

- Rojas-Graü, M. A., Raybaudi-Massilia, R. M., Soliva-Fortuny, R. C., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., y Martín-Belloso, O. (2007b). Apple puree-alginate edible coating as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh-cut apples. *Postharvest Biology and Technology*, 45(2), 254-264.
- Rojas-Graü, M. A., Tapia, M. S., y Martín-Belloso, O. (2008). Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut Fuji apples. *LWT - Food Science and Technology*, 41(1), 139-147.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., y Martín-Belloso, O. (2009). Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science y Technology*, 20(10), 438-447.
- Sánchez, R.V. (2011). Efecto del recubrimiento a base de nanocápsulas de vitamin E, sobre el índice de oscurecimiento de rebanadas de manzana variedad Red Delicious. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rojas-Graü, M.A., Garner, E. y Martín-Belloso, O. (2011). The fresh-cut fruits and vegetables industry: current situation and market trends. En: O. Martín-Belloso, y R. Soliva-Fortuny, (Eds.). *Advances in fresh-cut fruits and vegetables processing*. CRC Press, Florida, EU, 1-12.
- Rudell, D. R., y Mattheis, J. P. (2008). Synergism exists between ethylene and methyl jasmonate in artificial light-induced pigment enhancement of 'Fuji' apple fruit peel. *Postharvest Biology and Technology*, 47(1), 136-140.
- Ruoyi, K., Zhifang, Y., y Zhaoxin, L. (2005). Effect of coating and intermittent warming on enzymes, soluble pectin substances and ascorbic acid of *Prunus persica* (Cv. Zhonghuashoutao) during refrigerated storage. *Food Research International*, 38(3), 331-336.
- Sapers, G.M., Hicks, K.B., Phillips, J.G., Garzarella, L., Pondish, D.L., Matulaitis, R.M., McCormack, T.J., Sondey, S.M., Seib, P.A. y El-Atawy, Y.S. (1989). Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors and complexing agents. *Journal of Food Science*, 54(4), 997-1002.
- Saniewski, M., Czapski, J., Nowacki, J., y Lange, E. (1987). The effect of methyl jasmonate on ethylene and l-aminocyclopropane-1-carboxylic acid production in apple fruits. *Biologia Plantarum*, 29(3), 199-203.

- Shrestha, A.K., Arcot, J. y Paterson, J.L. (2003). Edible coating materials – their properties and use in the fortification of rice with folic acid. *Food Research International*, 36(9-10), 921-928.
- Siddiqui, M.W, C., I., Ayala-Zavala y Dhua, R.S. (2011). Advances in minimal processing of fruits and vegetables: a review. *Journal of Scientific y Industrial Research*, 70(10), 823-834.
- Sila, D. N., Van Buggenhout, S., Duvetter, T., Fraeye, I., De Roeck, A., Van Loey, A., y Hendrickx, M. (2009). Pectins in processed fruits and vegetables: Part II—Structure–function relationships. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 8(2), 86-104.
- Silveira, A. C., Aguayo, E., Chisari, M., y Artés, F. (2011). Calcium salts and heat treatment for quality retention of fresh-cut ‘Galia’ melon. *Postharvest Biology and Technology*, 62(1), 77-84.
- Simoës, A. D., Tudela, J. A., Allende, A., Puschmann, R., y Gil, M. I. (2009). Edible coatings containing chitosan and moderate modified atmospheres maintain quality and enhance phytochemicals of carrot sticks. *Postharvest Biology and Technology*, 51(3), 364-370.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., y Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid y Interface Science*, 10(3), 102-110.
- Soliva-Fortuny, R.C., Grigelmo-Miguel, N., Odriozola-Serrano, I., Gorinstein, S., y Martín-Belloso, O. (2001). Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural of Food Chemistry*, 49(8), 3685-3690.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., y Garcia-Celma, M. J. (2005). Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid y Interface Science*, 10(3), 102-110.
- Soliva-Fortuny, R. C., Lluch, M. A., Quiles, A., Grigelmo-Miguel, N., y Martín-Belloso, O. (2003). Evaluation of textural properties and microstructure during storage of minimally processed apples. *Journal of Food Science*, 68(1), 312-317.
- Son, S. M., Moon, K. D., y Lee, C. Y. (2001). Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry*, 73(1), 23-30.
- Soysal, Ç. (2008). Kinetics and thermal activation/inactivation of Starking apple polyphenol oxidase. *Journal of Food Processing and Preservation*, 32(6), 1034-1046.

- Supapvanich, S., Pimsaga, J., y Srisujan, P. (2011). Physicochemical changes in fresh-cut wax apple (*Syzygium samarangense* Blume, Merrill y L.M. Perry) during storage. *Food Chemistry*, 127(3), 912-917.
- Supapvanich, S., Prathaan, P., y Tepsorn, R. (2012). Browning inhibition in fresh-cut rose apple fruit cv. Taaptimjaan using konjac glucomannan coating incorporated with pineapple fruit extract. *Postharvest Biology and Technology*, 73, 46-49.
- Sworn, G. (2009). Xanthan gum. En: Phillips, G.O. y Williams, P.A. (Eds.). *Handbook of hydrocolloids*. Segunda edición, CRC Press, Florida, EU.
- Tadros, T. F., Vandamme, A., Leveck, B., Booten, K., y Stevens, C. V. (2004). Stabilization of emulsions using polymeric surfactants based on inulin. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 207-226.
- Tien, C., Vachon, C., Mateescu, M. A., y Lacroix, M. (2001). Milk protein coatings prevent oxidative browning of apples and potatoes. *Journal of Food Science*, 66(4), 512-516.
- Toivonen, P., y Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 1-14.
- Treutter, D. (2001). Biosynthesis of phenolic compounds and its regulation in apple. *Plant Growth Regulation*, 34(1), 71-89.
- Tsao, R., Yang, R., Young, C., y Zhu, H. (2003). Polyphenolic profiles in eight apple cultivar using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6347-6353.
- Tsao, R., Yang, R., Xie, S., Sockovie, E., y Khanizadeh, S. (2005). Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4989-4995.
- Vert, M., Doi, Y., Hellwich, K.H., Hess, M., Hodge, P., Kubisa, P., Rinaudo, M. y Schué, F. (2012). Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recomendatio 2012). *Pure Appl. Chem.*, 82(2); 377-410.
- Van de Hulst, H. C. (2012). *Light scattering by small particles*. Courier Dover Publications, p.p. 3-9.
- Veiga-Santos, P., Suzuki, C. K., Cereda, M. P., y Scamparini, A. R. P. (2005). Microstructure and color of starch-gum films: effect of gum deacetylation and additives. part 2. *Food Hydrocolloids*, 19(6), 1064-1073.

- Vermeris, W. y Nicholson, R. (2006). Phenolic compounds biochemistry. Springer, Dordrecht, Holanda. 63-151.
- Wakayama, T. (1995). Polyphenol oxidase activity in Japanese apples. En: C.Y. Lee, y J.R. Whitaker, (Eds.). *Enzymatic browning and its prevention*. ACS Symposium Series 600, American Chemical Society, Washington, EU.
- Wang, H., Feng, H., y Luo, Y. (2007). Control of Browning and Microbial Growth on Fresh-Cut Apples by Sequential Treatment of Sanitizers and Calcium Ascorbate. *Journal of Food Science*, 72(1), M001-M007.
- Wang, Z., Duan, H., y Hu, C. (2009). Modelling respiration rate of guava (*Psidium guajava* L.) fruit using enzyme kinetics, chemical kinetics and artificial neural network. *European Food Research and Technology*, 229(3), 495-503.
- Waterhouse, A.L. (2005). Determination of total phenolics. In R.E. Wrolstad, T.E. Acree, E.A. Decker, M.H. Penner, D.S. Reid, S.J. Schwartz, C.F. Shoemaker, D. Smith, y P. Sporns (Eds.), *Handbook of food analytical chemistry: pigments, colorants, flavors, texture, and bioactive food components* (pp. 463-470). New York: John Wiley y Sons.
- Ward, G., y Nussinovitch, A. (1997). Characterizing the gloss properties of hydrocolloid films. *Food Hydrocolloids*, 11(4), 357-365.
- Weiss, J., Takhistov, P., y McClements, D.J. (2006). Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*, 71(9), R107-R116.
- Whitaker, J. R. y Lee, C. Y. (1995). Recent advances in chemistry of enzymatic browning. En: C.Y. Lee y J.R. Whitaker (Eds.). *Enzymatic browning and its prevention*. Washington DC: American Chemistry Society, Symposium Series, Vol. 600, 2-7.
- Williams, R. J., Spencer, J. P., y Rice-Evans, C. (2004). Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(7), 838-849.
- Wojdylo, A., Oszmiański, J., y Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidants activity of new and old apple varieties. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 56(15), 6520-6530.
- Wu, S., y Chen, J. (2013). Using pullulan-based edible coatings to extend shelf-life of fresh-cut 'Fuji' apples. *International Journal of Biological Macromolecules*, 55, 254-257.
- Wu, Z. S., Zhang, M., y Wang, S. (2012). Effects of high-pressure argon treatments on the quality of fresh-cut apples at cold storage. *Food Control*, 23(1), 120-127.

- Yu, L. (2008). Effect of preservation of garlic by xanthan gum single coating films and multiple coating films. *Food and Fermentation Industries*, 34(10), 92-94.
- Zhao, Y., Park, S., Leonard, S.W. y Traber, M.G.(2005). Vitamin E and mineral fortification in fresh-cut apples (*Fuji*) using vacuum impregnation. *Nutrition & Food Science*, 35, 393-402.
- Zambrano-Zaragoza, M.L., Mercado-Silva, E., Del Real L., A., Gutiérrez-Cortez, E., Cornejo-Villegas, M.A. y Quintanar-Guerrero, D. (2013). The effect of nano-coatings with α -tocopherol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut “Red Delicious” apples. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, doi: 10.1016/j.ifset.2013.09.008
- Zambrano-Zaragoza M. L., Mercado-Silva, E., Gutiérrez-Cortez, E., Castaño-Tostado, E., y Quintanar-Guerrero, D., (2011). Optimization of nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications. *LWT - Food Science and Technology*, 44(6), 1362-1368.
- Zambrano-Zaragoza, M.L., Mercado-Silva, E., Ramirez-Zamorano, P., Cornejo-Villegas, M.A., Gutiérrez-Cortez, E. y Quintanar-Guerrero, D. (2013). Use of solid lipid nanoparticles (SLNs) in edible coatings to increase guava (*Psidium guajava* L.) shelf-life. *Food Research International*, 51(2), 946-953.
- Zambrano-Zaragoza, M. L., Mercado-Silva, E., Del Real L, A., Gutiérrez-Cortez, E., Cornejo-Villegas, M. A., y Quintanar-Guerrero, D. (2013). The effect of nano-coatings with α -tocopherol and xanthan gum on shelf-life and browning index of fresh-cut “Red Delicious” apples. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*. 22, 188-196.
- Zhou, P., Smith N., y Lee C., (1993). Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 41(4), 532-536.
- Zhou, R., Li, Y., Yan, L., y Xie, J. (2011). Effect of edible coatings on enzymes, cell-membrane integrity, and cell-wall constituents in relation to brittleness and firmness of Huanghua pears (*Pyrus pyrifolia* Nakai, cv. Huanghua) during storage. *Food chemistry*, 124(2), 569-575.

ANEXOS

A1. Análisis estadísticos para el porcentaje de pérdida de peso

A1.1. Análisis estadístico de dos factores considerando el % de pérdida de peso entre las manzanas control y las recubiertas con goma xantana observándose diferencia significativa ($p \leq 0.05$) cuando las manzanas fueron recubiertas con el polisacárido.

ANOVA de dos factores: %Pérdida de Peso vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	1	13.4529	13.4529	35.61	0.000
Día	6	20.9621	3.4937	9.25	0.000
Interacción	6	2.7938	0.4656	1.23	0.320
Error	28	10.5781	0.3778		
Total	41	47.7870			

S = 0.6146 R-cuad. = 77.86% R-cuad.(ajustado) = 67.59%

A1.2. Análisis estadístico de dos factores para el % de pérdida de peso entre la nanoemulsión-Toc con y sin goma xantana y las muestras control, observándose diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

ANOVA de dos factores: %Pérdida de Peso vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	2	46.0744	23.0372	98.16	0.000
Día	6	12.0036	2.0006	8.52	0.000
Interacción	12	9.0422	0.7535	3.21	0.002
Error	42	9.8571	0.2347		
Total	62	76.9773			

S = 0.4845 R-cuad. = 87.19% R-cuad.(ajustado) = 81.10%

A1.3. Resultados de análisis estadístico en el % de pérdida de peso de las nanopartículas poliméricas y las muestras control, evidenciándose un efecto significativo con la aplicación de los sistemas como recubrimiento en manzana.

ANOVA de dos factores: %Pérdida de Peso vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	4	30.2462	10.0821	39.03	0.000
Día	6	28.4847	4.7475	18.38	0.000
Interacción	18	8.6550	0.4808	1.86	0.040
Error	56	14.4654	0.2583		
Total	83	81.8513			

S = 0.5082 R-cuad. = 82.33% R-cuad.(ajustado) = 73.81%

A2. Análisis estadístico en los valores de L*

A2.1. Análisis estadístico ANOVA de dos factores entre las muestras control y las recubiertas con los diferentes sistemas incluyendo a la goma xantana, mostrando diferencia significativa ($p \leq 0.05$) en el valor de L* con todos los tratamientos.

ANOVA de dos factores: L* vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	7	1113.69	159.099	125.32	0.000
Día	6	489.74	81.623	64.29	0.000
Interacción	42	393.16	9.361	7.37	0.000
Error	112	142.19	1.270		
Total	167	2138.78			

S = 1.127 R-cuad. = 93.35% R-cuad. (ajustado) = 90.09%

A3. Análisis estadístico en los valores de a*

A3.1. Evaluación estadística ANOVA de dos factores entre las manzanas recubiertas con los diferentes tratamientos y las muestras control evidenciándose que existe diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en el valor de a* con el uso de los diferentes recubrimientos.

ANOVA de dos factores: a* vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	7	154.107	22.0153	124.88	0.000
Día	6	145.554	24.2589	137.61	0.000
Interacción	42	59.616	1.4194	8.05	0.000
Error	112	19.744	0.1763		
Total	167	379.021			

S = 0.4199 R-cuad. = 94.79% R-cuad. (ajustado) = 92.23%

A4. Fenoles totales

A4.1. Análisis ANOVA de dos factores entre los tratamientos control y el recubrimiento de goma xantana observándose diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) en la conservación de compuestos fenólicos.

ANOVA de dos factores: Fenoles Totales (mgEAG/g man) vs. Tratamiento, Tiempo

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	1	2712.1	2712.05	63.22	0.000
Tiempo	6	4429.3	738.22	17.21	0.000
Interacción	6	3624.0	604.00	14.08	0.000
Error	28	1201.2	42.90		
Total	41	11966.5			

S = 6.550 R-cuad. = 89.96% R-cuad. (ajustado) = 85.30%

A4.2. Análisis ANOVA de dos factores entre los tratamientos control y los recubrimientos de nanoemulsión-Toc y nanoemulsión-Toc/xantana observándose diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$) con el uso de los tratamientos.

ANOVA de dos factores: Fenoles Totales (mgEAG/g man) vs. Tratamiento, Tiempo

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	2	9731.2	4865.61	8.04	0.001
Tiempo	6	4022.7	670.45	1.11	0.374
Interacción	12	15293.9	1274.49	2.11	0.038
Error	42	25407.3	604.94		
Total	62	54455.1			

S = 24.60 R-cuad. = 53.34% R-cuad. (ajustado) = 31.12%

A4.3 Análisis ANOVA de dos factores entre el control y las nanopartículas poliméricas sobre los cambios en la concentración de fenoles, existiendo diferencia significativa ($p \leq 0.05$) con la utilización de las nanopartículas poliméricas.

ANOVA de dos factores: Fenoles Totales (mgEAG/g man) vs. Tratamiento, Tiempo

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	7610.8	1902.69	43.76	0.000
Tiempo	6	2459.4	409.90	9.43	0.000
Interacción	24	6993.1	291.38	6.70	0.000
Error	70	3043.3	43.48		
Total	104	20106.6			

S = 6.594 R-cuad. = 84.86% R-cuad. (ajustado) = 77.51%

A5. Polifenoloxidasa

A5.1. Análisis estadístico de dos factores entre el recubrimiento de goma xantana y el control, observándose diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

ANOVA de dos factores: PFO (U/mL) vs. Tratamiento, Tiempo

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	103406	103406	13.95	0.001
Tiempo	6	206982	34497	4.65	0.002
Interacción	6	228055	38009	5.13	0.001
Error	28	207506	7411		
Total	41	745949			

S = 86.09 R-cuad. = 72.18% R-cuad. (ajustado) = 59.27%

A5.2. Análisis estadístico de dos factores entre las manzanas tratadas con nanopartículas poliméricas y el sistema control, observándose diferencia estadística significativa con el uso de los tratamientos submicrónicos ($p \leq 0.05$)

ANOVA de dos factores: PFO (U/mL) vs. Tratamiento, Tiempo

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	4	363824	90956.0	9.01	0.000

Tiempo	6	209296	34882.6	3.46	0.005
Interacción	24	457995	19083.1	1.89	0.021
Error	70	706611	10094.4		
Total	104	1737726			

S = 100.5 R-cuad. = 59.34% R-cuad. (ajustado) = 39.59%

A6. Firmeza

A6.1. Análisis ANOVA de dos factores entre la actividad PME y el tratamiento mostrando una $p \leq 0.05$ indicando que hay diferencia estadísticamente significativa en el control de la actividad PME mediante la utilización de los diversos tratamientos.

ANOVA de dos factores: Actividad PME ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	7	5.2373	0.74818	16.87	0.000
Día	6	27.2267	4.53779	102.33	0.000
Interacción	42	8.2508	0.19645	4.43	0.000
Error	112	4.9668	0.04435		
Total	167	45.6816			

S = 0.2106 R-cuad. = 89.13% R-cuad. (ajustado) = 83.79%

A6.2. Análisis ANOVA de dos factores para los cambios de firmeza entre el recubrimiento de goma xantana y el sistema control, no mostrando diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) con el uso del polisacárido.

ANOVA de dos factores: Firmeza(N) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	2.912	2.9125	1.23	0.276
Día	6	274.947	45.8246	19.40	0.000
Interacción	6	14.273	2.3789	1.01	0.440
Error	28	66.129	2.3618		
Total	41	358.262			

S = 1.537 R-cuad. = 81.54% R-cuad. (ajustado) = 72.97%

A6.3. Análisis ANOVA de dos factores para los cambios de firmeza entre el recubrimiento de nanoemulsión-Toc, nanoemulsión-Toc/xantana y las muestras control evidenciándose diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

ANOVA de dos factores: Firmeza(N) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	2	93.853	46.9264	16.14	0.000
Día	6	188.101	31.3502	10.78	0.000
Interacción	12	73.937	6.1614	2.12	0.036
Error	42	122.091	2.9069		
Total	62	477.982			

S = 1.705 R-cuad. = 74.46% R-cuad. (ajustado) = 62.29%

A6.4 Análisis ANOVA de dos factores para los cambios de firmeza entre el recubrimiento de nanoesfereas, nanoesferas/xantana y el control mostrando diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.05$).

ANOVA de dos factores: Firmeza(N) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	2	42.140	21.0699	10.93	0.000
Día	6	249.593	41.5988	21.58	0.000
Interacción	12	45.492	3.7910	1.97	0.053
Error	42	80.979	1.9281		
Total	62	418.203			

S = 1.389 R-cuad. = 80.64% R-cuad. (ajustado) = 71.42%

A6.5. Análisis ANOVA de dos factores para los cambios de firmeza entre el recubrimiento de nanocápsulas-Toc y nanoesferas no mostrando diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

ANOVA de dos factores: Firmeza(N) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	1	5.034	5.0336	3.32	0.079
Día	6	93.245	15.5408	10.26	0.000
Interacción	6	3.489	0.5816	0.38	0.883
Error	28	42.392	1.5140		
Total	41	144.160			

A7. Pectinmetilesterasa (PME)

A7.1. Análisis estadístico ANOVA de dos factores para actividad PME entre el sistema control y las manzanas recubiertas con goma xantana con una $p > 0.05$, indicando que no hay diferencia significativa en la PME por efecto del recubrimiento de goma xantana después del décimo día.

ANOVA de dos factores: Actividad PME ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	1	0.08729	0.087288	4.36	0.059
Día	2	1.42054	0.710272	35.47	0.000
Interacción	2	0.77652	0.388258	19.39	0.000
Error	12	0.24030	0.020025		
Total	17	2.52465			

S = 0.1415 R-cuad. = 90.48% R-cuad. (ajustado) = 86.52%

A7.2 Análisis de dos factores entre la las nanoesfereas con y sin goma xantana y el control, no observándose diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

ANOVA de dos factores: Actividad PME ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	2	0.0584	0.02921	0.61	0.547
Día	6	14.3667	2.39445	50.22	0.000
Interacción	12	2.9419	0.24516	5.14	0.000
Error	42	2.0027	0.04768		
Total	62	19.3696			

S = 0.2184 R-cuad. = 89.66% R-cuad. (ajustado) = 84.74%

A7.3. Análisis estadístico de dos factores entre el sistema control y las nanocápsulas-Toc con y sin goma xantana sobre la actividad PME evidenciándose que existe diferencia estadísticamente significativa con el empleo de los sistemas nanocapsulares.

ANOVA de dos factores: Actividad PME ($\mu\text{mol}/\text{min mL}$) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	2	1.9691	0.98457	17.41	0.000
Día	6	12.4508	2.07513	36.69	0.000
Interacción	12	1.2942	0.10785	1.91	0.061
Error	42	2.3757	0.05656		
Total	62	18.0898			

S = 0.2378 R-cuad. = 86.87% R-cuad.(ajustado) = 80.61%

A8. Poligalacturonasa (PG)

A8.1. Análisis estadístico ANOVA de dos factores entre el recubrimiento de goma xantana y el control sobre la actividad PG no observándose diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) con el uso del polisacárido

ANOVA de dos factores: Firmeza(N) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	1	2.912	2.9125	1.23	0.276
Día	6	274.947	45.8246	19.40	0.000
Interacción	6	14.273	2.3789	1.01	0.440
Error	28	66.129	2.3618		
Total	41	358.262			

S = 1.537 R-cuad. = 81.54% R-cuad.(ajustado) = 72.97%

A8.2. Análisis estadístico ANOVA de dos factores entre los recubrimientos de nanocápsulas-Toc, nanocápsulas-Toc/xantana, nanoesferas, nanoesferas/xantana, nanoemulsión-Toc, nanoemulsión-Toc/xantana y el control sobre la actividad PG de manzanas observándose diferencia estadísticamente significativa.

ANOVA de dos factores: Firmeza(N) vs. Tratamiento, Día

Fuente	GL	SC	MC	F	P
Tratamiento	6	102.144	17.0240	8.45	0.000
Día	6	373.332	62.2219	30.89	0.000
Interacción	36	109.227	3.0341	1.51	0.059
Error	98	197.407	2.0144		
Total	146	782.110			

S = 1.419 R-cuad. = 74.76% R-cuad (ajustado) = 62.40%