



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE RECUBRIMIENTOS DE *Lactobacillus plantarum*
MICROENCAPSULADO EN QUITOSANO, PECTINA Y LACTOGLOBULINA
PARA LA CONSERVACIÓN DE LA CALIDAD POSCOSECHA DE LITCHI Y
RAMBUTÁN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

HIDALGO MUJICA CARMEN LETICIA

MÉXICO, D.F.

2016





Universidad Nacional
Autónoma de México



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: OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO

VOCAL: JORGE ARTURO ABURTO ANELL

SECRETARIO: CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO

1er. SUPLENTE: ALEJANDRO ZAVALA RIVAPALACIOS

2° SUPLENTE: CARMINA MONTIEL PACHECO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biopolímeros (S-157) y Planta Piloto de Procesamiento de Desperdicios Orgánicos del Departamento de Biotecnología de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección de la Dra. Concepción Keiko Shirai Matsumoto. El trabajo experimental se llevó a cabo con financiamiento CONACYT (SEP-Básica No. 237292 y SE-FINNOVA No. 224962).

ASESOR DEL TEMA:

DRA. CONCEPCIÓN KEIKO SHIRAI MATSUMOTO.

SUSTENTANTE:

HIDALGO MUJICA CARMEN LETICIA

AGRADECIMIENTOS

DEDICATORIAS

1	INTRODUCCIÓN	12
2	MARCO TEÓRICO	13
2.1	Frutas climatéricas y no climatéricas	13
2.2	Tecnologías poscosecha para mantener la calidad en las frutas tropicales y subtropicales.....	14
2.3	Producción nacional de litchi y rambután	15
2.4	Problemas asociados en la vida poscosecha de litchi y rambután	15
2.4.1	Pérdida fisiológica de peso (PFP)	15
2.4.2	Cambio de color debido a la degradación de las antocianinas.....	16
2.4.3	Contaminación por fitopatógenos	18
2.5	Películas y recubrimientos comestibles	18
2.6	Quitina	20
2.7	Quitosano	21
2.8	El quitosano en la elaboración de recubrimientos comestibles	21
2.9	Propiedades antimicrobianas en los recubrimientos y películas elaboradas a partir de quitosano	22
2.10	Recubrimientos elaborados empleando pectina	22
2.11	Recubrimientos elaborados con proteínas de suero de leche	23
2.11.1	β -lactoglobulina.....	23
2.12	Inmovilización de microorganismos en recubrimientos	23
3	ANTECEDENTES.....	25
4	JUSTIFICACIÓN.....	28
5	HIPÓTESIS.....	29
6	OBJETIVOS.....	30
6.1	Objetivo general	30

6.2	Objetivos particulares	30
7	METODOLOGÍA	31
7.1	1° ETAPA: Preparación y caracterización de quitina y quitosano.....	32
7.1.1	Extracción biológica de quitina a partir de desechos de camarón	32
7.1.2	Purificación de quitina	32
7.1.3	Caracterización de quitina biológica (QB)	32
7.1.3.1	Determinación del contenido de humedad (%H).....	32
7.1.3.2	Determinación del contenido de cenizas (%C).....	33
7.1.3.3	Determinación del contenido de grasa (%G).....	33
7.1.3.4	Determinación de nitrógeno total.....	33
7.1.4	Quitosano	34
7.1.4.1	Obtención de quitosano	34
7.1.5	Caracterización de quitosano	34
7.1.5.1	Grado de acetilación (DA)	34
7.1.5.2	Peso molecular determinada mediante viscosidad intrínseca	34
7.2	2° ETAPA: Preparación y caracterización de los recubrimientos	35
7.2.1	Preparación de la suspensión celular.....	35
7.2.2	Preparación de solución de quitosano (Q5)	35
7.2.3	Preparación de los complejos poli electrolitos	35
7.2.3.1	Formulación de quitosano y pectina-β-lactoglobulina (Q- βP)	35
7.2.3.2	Formulación de quitosano, pectina-β-lactoglobulina y BAL (Q- βP-BAL).....	35
1.1.1	Preparación de recubrimientos.....	36
7.3	Caracterización de los recubrimientos.....	36
7.3.1	Determinación del potencial zeta (ζ)	36
7.3.2	Determinación de tamaño de partícula.....	36
7.3.3	Espesor en las películas.....	37
7.3.4	Permeabilidad al vapor de agua (PVA)	37
7.3.4.1	Determinación de la viabilidad celular mediante espectrometría de fluorescencia	38

7.4	3° ETAPA: Aplicación de los recubrimientos	38
7.4.1	Diseño experimental para bioensayo con litchi	38
7.4.2	Diseño experimental para bioensayo con rambután.....	39
7.4.3	Análisis de las unidades experimentales (UE) tratadas con los recubrimientos.....	40
7.4.3.1	Pérdida Fisiológica de Peso (PFP).....	40
7.4.3.2	Determinación de sólidos solubles totales (SST)	40
7.4.3.3	Determinación de Acidez Total Titulable (ATT)	40
7.4.3.4	Extracción de fenoles y antocianinas	41
7.4.3.5	Determinación de antocianinas totales mediante espectrometría de absorción	41
7.4.3.6	Determinación de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	41
7.4.3.7	Determinación de fenoles totales	42
7.4.3.8	Análisis de cambio de color.....	42
7.4.4	Caracterización de los recubrimientos en los frutos	42
7.4.4.1	Microscopia electrónica de barrido (SEM) del pericarpio de litchi y rambután	42
7.4.4.2	Determinación de BAL viables en frutos mediante conteo en placa	43
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
8.1	1° ETAPA caracterización de quitina y quitosano.....	44
8.1.1	Quitina	44
8.1.2	Caracterización de quitosano	45
8.2	2° ETAPA preparación y caracterización de los recubrimientos.....	46
8.2.1	Potencial z.....	46
8.2.2	Tamaño de partícula.....	48
8.2.3	Permeabilidad al Vapor de Agua y espesor de las películas	49
8.2.4	Viabilidad del recubrimiento determinada por fluorescencia	51
8.3	3° ETAPA Aplicación de los recubrimientos	53

8.3.1	Bioensayo litchi.....	53
8.3.1.1	Pérdida fisiológica de peso (PFP)	53
8.3.1.2	Cambio de color en el pericarpio.....	54
8.3.1.3	Determinación de antocianinas	56
8.3.1.4	Micrografías electrónicas de barrido del pericarpio de litchi con el recubrimiento Q-βP-BAL.....	58
8.3.1.5	Recuperación de BAL viables en litchi	60
8.3.2	Bioensayo rambután.....	61
8.3.2.1	Pérdida Fisiológica de Peso (PFP).....	61
8.3.2.2	Cambios de color en el pericarpio de rambután	61
8.3.2.3	Antocianinas.....	63
8.3.2.4	Características del jugo de rambután.....	67
8.3.2.5	Recuperación de BAL viables en rambután	69
8.3.2.6	Micrografías electrónicas de barrido del pericarpio de rambután con el recubrimiento Q-βP-BAL	70
9	CONCLUSIONES	72
10	BIBLIOGRAFÍA	73
11	ANEXOS	80

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Frutos climatéricos y no climatéricos (FAO, 2007).	13
Fig. 2 Tecnologías poscosecha de frutos tropicales (Kader & Yahia, 2011).	14
Fig. 3 Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Garz, 2008).	16
Fig. 4 Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH (Garz, 2008).	17
Fig. 5 Materiales empleados comúnmente en la elaboración de recubrimientos comestibles (Salgado et al. 2015).	19
Fig. 6 Funciones principales de un recubrimiento comestible (Salgado et al. 2015).	20
Fig. 7 Estructura del quitosano (Mármol et al. 2011).	21
Fig. 8 Metodología general empleada en la realización de esta tesis.	31
Fig. 9 Potencial ζ de los recubrimientos, biopolímeros y BAL.	47
Fig. 10 Diámetro volumétrico de los recubrimientos, biopolímeros y BAL	48
Fig. 11 PVA de las películas a dos gradientes de HR 75/90 y 90/75 a 10 ± 5 °C. ..	50
Fig. 12 PFP determinado en litchis tratados con el recubrimiento y el control almacenados a 10 °C y HR 75 %. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.05$)	53
Fig. 13 Calidad visual del litchi tratados con Q- β P-BAL y control. Fotos tomadas en los días 0,7 y 14 de almacenamiento a 10°C y HR 75 %	54
Fig. 14 Cambio en la calidad de color CIE (C^* , L^* , a^*) sistema colorimétrico, durante el almacenamiento de los litchis tratados con el recubrimiento y control, almacenados a 10 °C y HR 75 %	55
Fig. 15 Concentración de cianidina-3-rutinósido determinado en el pericarpio de litchi almacenado a 10°C y HR 75 %	56
Fig. 16 Micrografías obtenidas por Microscopia electrónica de Barrido (MEB) a 1000, 3000, 4000, 8000 y 10000X aumentos. En la imagen a se muestra la superficie del litchi almacenado a 10°C y HR 75 %; a y b (control), c y d superficie de litchi con el recubrimiento Q- β P-BAL; e litchi t (0); f litchi t (14)	59
Fig. 17 Recuperación de BAL en frutos de litchi almacenados a 10°C y HR 75 %. Siembra en placa por extensión en agar MRS.	60

Fig. 18 Calidad visual del rambután tratados con los diferentes tratamientos empleados. Fotos tomadas en los días 0, 7,14 y 20, almacenados a 10°C y HR 75%	62
Fig. 19 Cambio en la calidad de color CIE (C*,L*, a*) sistema colorimétrico, durante el almacenamiento del rambután tratados con el recubrimiento y control, almacenados a 10 °C y HR 75 %.....	63
Fig. 20 Antocianinas totales medias por absorbancias (A/g pericarpio) en rambután almacenados a 10 °C y HR 75 %	64
Fig. 21 Concentración de cianidina-3-rutinósido determinada en los pericarpios de rambutanes almacenados a 10 °C y HR 75 %	65
Fig. 22 Concentración de fenoles determinada en los pericarpios de los rambutanes almacenados a 10 °C y HR 75 %	66
Fig. 23 Cambios de pH determinado en el jugo de los rambutanes almacenados a 10 °C y HR 75 %	67
Fig. 24 Cambios de SST determinado en el jugo de rambután, almacenados a 10°C y HR 75 %	68
Fig. 25 AT determinada en el jugo de rambután, almacenados a 10°C y HR 75 %	68
Fig. 26 Recuperación de BAL en frutos de rambután almacenados a 10°C y HR 75 %. Siembra en placa por extensión en agar MRS.....	69
Fig. 27 Micrografías obtenidas por Microscopia electrónica de Barrido a 10,000 X de la superficie de rambután almacenado a 10°C y HR 75%; a Q5, b Q-βP; c y d Q-βP-BAL, e rambután Q-βP-BAL t (0); f rambután Q-βP-BAL t (20).....	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Análisis químico proximal en base seca de la quitina obtenida en ambas fermentaciones.....	44
Tabla 2 Caracterización del quitosano obtenido.....	45
Tabla 3 Espesor de los recubrimientos elaborados, PVA de las películas a dos gradientes de HR 75/90 y 90/75 a 10°C.....	49
Tabla 4 Porcentaje de viabilidad en el recubrimiento Q-βP-BAL a 10°C y HR 75 %	52
Tabla 5. Características de calidad de los litchis almacenados a los 14 días a 10°C y HR 75 %	57

ABREVIATURAS

ATT	acidez total titulable
BAL	<i>L. plantarum</i>
C*	croma
DM	desmineralización
DP	desproteínización
FAL	fermentación ácido láctica
HMP	pectina de alto metoxilo
HPMC	hiroxiopropil metil celulosa
HR	humedad relativa
L*	luminosidad
M_v	peso molecular
PFP	pérdida fisiológica de peso
PO	polifenol oxidasa
PPO	polifenol peroxidasa
PVA	pérdida de vapor de agua
Q	quitosano
Q5	quitosano a una concentración de 5g/L
QC	quitina cruda
Q- β P-BAL	quitosano/lactoglobulina/pectina/ <i>L. plantarum</i>
Q- β P	quitosano/lactoglobulina/pectina
QB	quitina biológica
SEM	microscopía electrónica de barrido
SO ₂	dióxido de azufre
SST	sólidos solubles totales
UE	unidad experimental

1 INTRODUCCIÓN

El litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) y el rambután (*Nephelium lappaceum* L.), son frutos tropicales no climatéricos, pertenecen a la familia *Sapindaceae*, la cual comprende 140 géneros y 1,500 especies, se caracterizan por un sabor agridulce y aroma refrescante (Kader & Yahia, 2011). La cosecha de los frutos comienza cuando adquieren un color rojo intenso, considerado como un criterio de calidad y madurez en los mismos. El litchi y el rambután son frutas altamente perecederas, una vez cosechadas comienzan a deshidratarse rápidamente, lo que genera la degradación de las antocianinas presentes en el pericarpio. Esta degradación aumenta los subproductos de color oscuro debido a la acción de las enzimas polifenol oxidasa (PO) y polifenol peroxidasa (PPO), el color rojo brillante desaparece, perdiendo así su valor comercial (Jiang et al. 2004; Zhang et al. 2005; Yingsanga et al. 2008).

El método utilizado para preservar el color durante la vida poscosecha es fumigación de los frutos con dióxido de azufre (SO₂) debido a su bajo costo y fácil aplicación. Sin embargo, el SO₂, provoca reacciones alérgicas en el consumidor, su uso está restringido en Japón, la Unión Europea y está limitado en EUA, (Sivakumar & Korsten, 2006), además el SO₂ cuando está en contacto con la atmósfera reacciona con la humedad y forma aerosoles de ácido sulfúrico y sulfuroso que formaran parte de la llamada lluvia ácida (Garcés et al. 2010).

La aplicación de recubrimientos biológicos, elaborados a partir de: polisacáridos, proteínas, lípidos o resinas en combinación de microorganismos encapsulados en matrices poliméricas de grado alimenticio, surgen como una alternativa para la conservación, extensión de la vida comercial y mejoramiento en la calidad poscosecha de frutos perecederos. (Yahia et al. 2011; Nussinovitch et al. 2013; Fabra et al. 2014, Piermaría et al. 2015).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Frutas climatéricas y no climatéricas

Las frutas son organismos vivos que continúan con su proceso de respiración después de ser cortadas, los carbohidratos son metabolizados en dióxido de carbono y agua, esta reacción produce la energía necesaria para mantenerse vivas (Saltveit, 1997).

Las frutas pueden dividirse en dos tipos de acuerdo al tipo de maduración: climatéricas y no climatéricas. En las frutas no climatéricas el proceso de madurez es gradual, pero continuo mientras que las frutas climatéricas el proceso natural de madurez es iniciado de acuerdo a cambios en la composición hormonal. La madurez climatérica se caracteriza por un rápido aumento en la velocidad de respiración y el desprendimiento de etileno por la fruta, conocido como respiración climatérica Fig. 1.

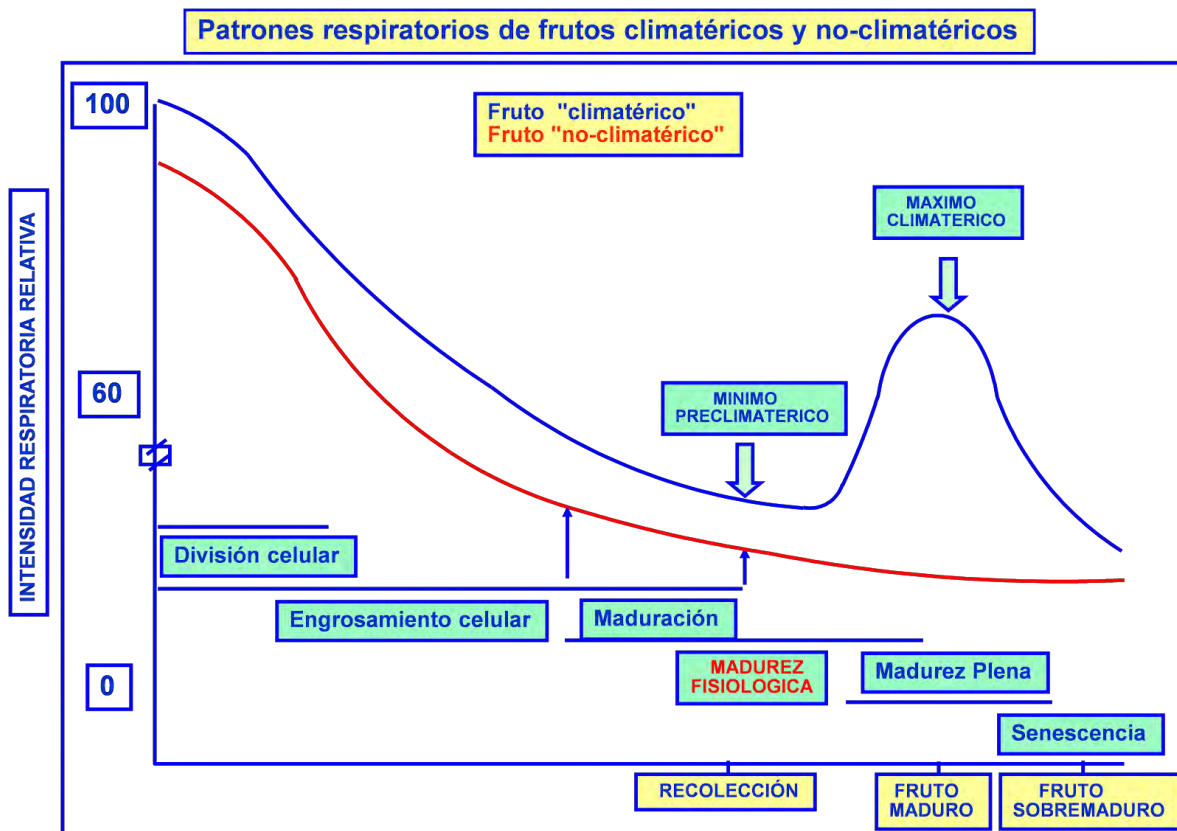


Fig. 1 Frutos climatéricos y no climatéricos (FAO, 2007).

2.2 Tecnologías poscosecha para mantener la calidad en las frutas tropicales y subtropicales

Debido a la pérdida económica que generan los frutos tropicales por su corta vida de anaquel, se han establecido nuevas tecnologías poscosecha para la conservación de los mismos; la temperatura y la humedad relativa (HR), son críticos para el almacenamiento, así como el transporte de frutas tropicales y subtropicales. Las condiciones requeridas dependen de la naturaleza de cada producto (Kader & Yahia, 2011). En la Fig. 2 se muestran las principales técnicas poscosecha empleadas en la conservación de frutos tropicales.

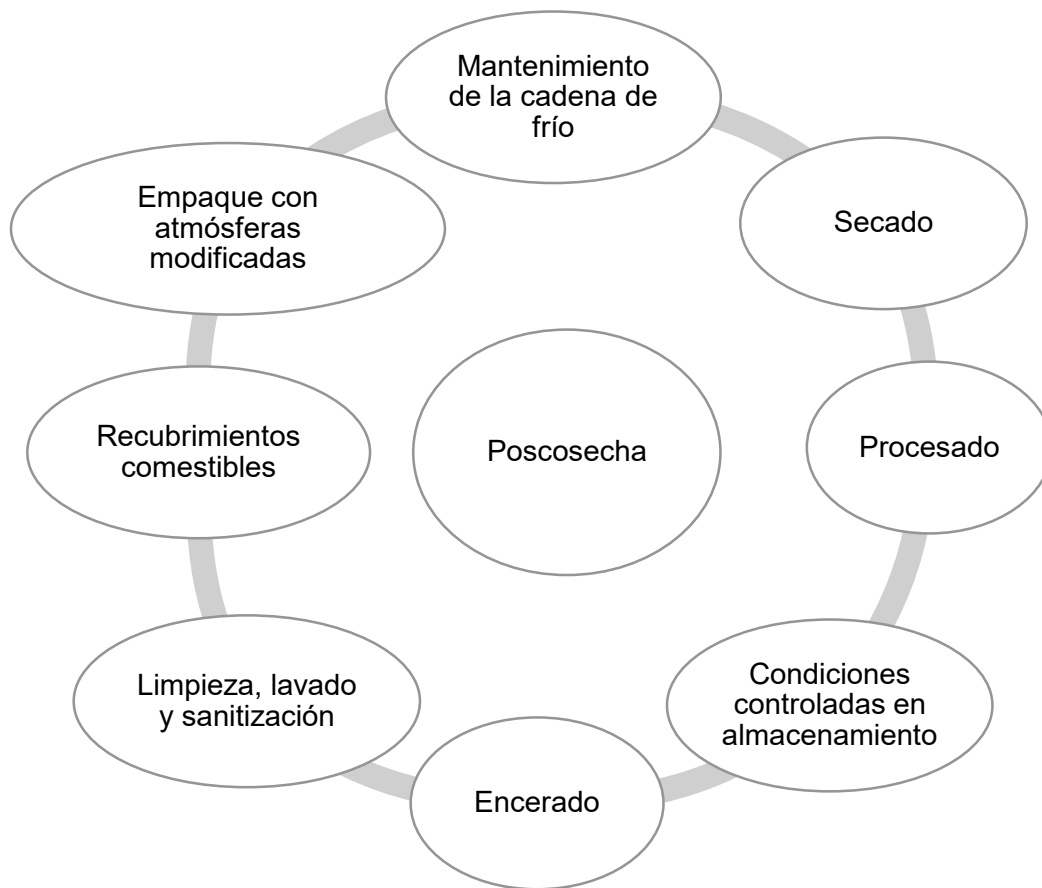


Fig. 2 Tecnologías poscosecha de frutos tropicales (Kader & Yahia, 2011).

El proceso de maduración en los frutos incluye una serie de cambios bioquímicos, con la finalidad de desarrollar características de: color, sabor, textura, tamaño y forma que son importantes para el consumidor. La velocidad de respiración es un factor importante, si ésta es demasiado rápida la vida útil del fruto es más corta. Existen factores extrínsecos como la temperatura y HR de almacenamiento que se pueden controlar para disminuir este problema. La calidad de las frutas en la cosecha y durante su vida poscosecha se ve afectada por las decisiones tomadas en todo el proceso de cultivo y posterior comercialización (Benkeblia et al. 2011).

2.3 Producción nacional de litchi y rambután

El litchi y el rambután son frutos de clima sub-tropical originarios del sur de China y norte de Vietnam. En México existe una amplia gama de condiciones climáticas que favorecen el desarrollo de dichos frutos, siendo las zonas tropicales las de mayor potencial productivo (Aguas-atlahua et al. 2014).

Los principales estados productores de litchi y rambután son: Veracruz, Oaxaca, Sinaloa, San Luis Potosí, Puebla, Chiapas y Michoacán. De acuerdo a lo reportado por el Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), la producción al cierre del año 2014 para litchi fue 18,739.84 ton y para rambután 1,990.26 ton con un valor de total de producción para ambos frutos de 284,361.61 pesos.

El consumo y la producción de frutos “exóticos” han aumentado considerablemente en los últimos años. El litchi y el rambután son frutos de alta rentabilidad que pueden colocarse con buenos precios tanto en el mercado nacional como internacional (INIFAP, 2001), lo anterior como una alternativa prometedora para el campo mexicano debido a la baja rentabilidad obtenida de cultivos tradicionales como café, cítricos, caña de azúcar, entre otros.

2.4 Problemas asociados en la vida poscosecha de litchi y rambután

2.4.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP)

Las frutas frescas se componen principalmente de agua (80% o más), durante la cosecha el abastecimiento de agua que es provista por el sistema radicular se detiene, los frutos son capaces de sobrevivir utilizando sus propias reservas.

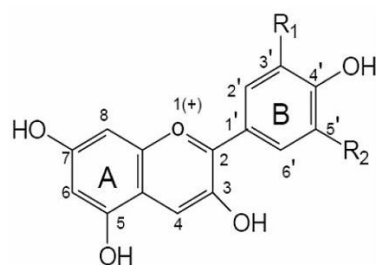
La transpiración en los frutos es la pérdida irremplazable de agua, este proceso tiene como consecuencia principal la disminución significativa del peso, a medida que este avanza las frutas pierden turgencia, volviéndose blandos y marchitos (FAO, 2007).

La pérdida de peso en el rambután es directamente proporcional al número de filamentos (espiternos) presentes en la fruta, los filamentos tienen una densidad estomática cinco veces mayor que el cuerpo de la fruta debido a esto la pérdida de humedad ocurre rápidamente (Hare et al. 1994; Landrigan et al. 1996; Wall et al. 2011). Para el caso del litchi, la pérdida de agua genera una serie de cambios bioquímicos y fisiológicos, en donde el oscurecimiento poscosecha, se debe principalmente a la desecación (Jiang & Fu, 1999).

2.4.2 Cambio de color debido a la degradación de las antocianinas

Las antocianinas son un grupo de pigmentos hidrosolubles detectables en la región visible del ojo humano (Fennema, 1993). Las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace β -glucosídico.

La estructura química básica de estas agliconas es el ión flavilio (Badui, 2006), también llamado 2-fenilbenzopirilio, que consta de dos grupos aromáticos: un benzopirilio (A) y un anillo fenólico (B); el flavilio normalmente funciona como un catión Fig. 3. El color de las antocianinas depende de factores intrínsecos, como son los sustituyentes químicos que contenga y la posición de los mismos en el grupo flavilio; si se aumentan grupos hidroxilo en el anillo fenólico se intensifica el color azul, mientras que la introducción de grupos metoxilo provoca la formación del color rojo.



Aglicona	Sustitución	
	R ₁	R ₂
Pelargonidina	H	H
Cianidina	OH	H
Delfinina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Fig. 3 Estructura y sustituyentes de las antocianinas (Garz, 2008).

El pH, la temperatura, el oxígeno y el ácido ascórbico tienen un efecto estructural en la estabilidad de las antocianinas. La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula. En soluciones acuosas a valores de pH inferiores a dos, básicamente el 100% del pigmento se encuentra en su forma más estable de catión flavilio (AH^+) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición (2), dando lugar a un equilibrio entre la pseudobase carbinol o hemicetal y la forma chalcona "cadena abierta". Tanto el hemicetal como la chalcona, son formas incoloras y bastante inestables. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas quinoidales (A, A-) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire Fig. 4.

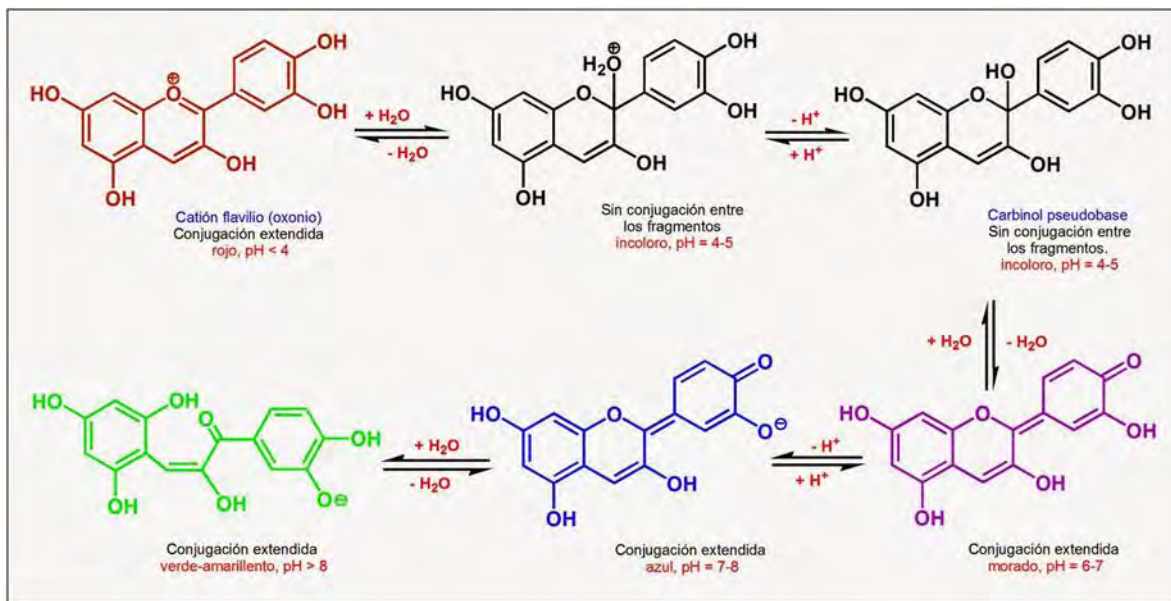


Fig. 4 Estructura de las antocianinas a diferentes valores de pH (Garz, 2008).

2.4.3 Contaminación por fitopatógenos

El litchi y el rambután una vez cosechados, sufren deterioro durante su almacenamiento, el ataque por hongos, bacterias y levaduras es la principal causa, esto se atribuye a las microfisuras que se presentan en el pericarpio debido a la deshidratación de los frutos. Las grietas microscópicas alojan las esporas de los hongos y favorecen el crecimiento de levaduras, provocando la fermentación y el deterioro de la fruta (Underhill & Simons, 1993).

Las principales especies asociadas con el deterioro en litchi son *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Peronophythora*, *Rhizopus* y varias levaduras (Holcroft & Mitcham 1996; Jiang & Fu 1999; Jiang et al. 2003).

En rambután la antracnosis, la mancha marrón y la pudrición del pedúnculo se asocian a diferentes tipos de hongos: *Colletotrichum gloeosporioides*, responsable de la antracnosis, *Bulbium*, *Gliocephalotrichum* y *G. microchlamydosporum* provocan síntomas de mancha marrón; mientras que *Botryodiplodia theobromae* produce la pudrición del pedúnculo (Paull et al. 1995; Sivakumar et al. 2002; Wall et al. 2011).

2.5 Películas y recubrimientos comestibles

Los recubrimientos comestibles generalmente se definen como matrices continuas que se pueden preparar a partir de materiales naturales y biodegradables de calidad alimentaria, los cuales tienen diferentes funciones dependiendo de la especificación y las propiedades del producto (Tharanathan, 2003). Algunos de los materiales comúnmente empleados para la elaboración de los recubrimientos se muestran en la Fig. 5.

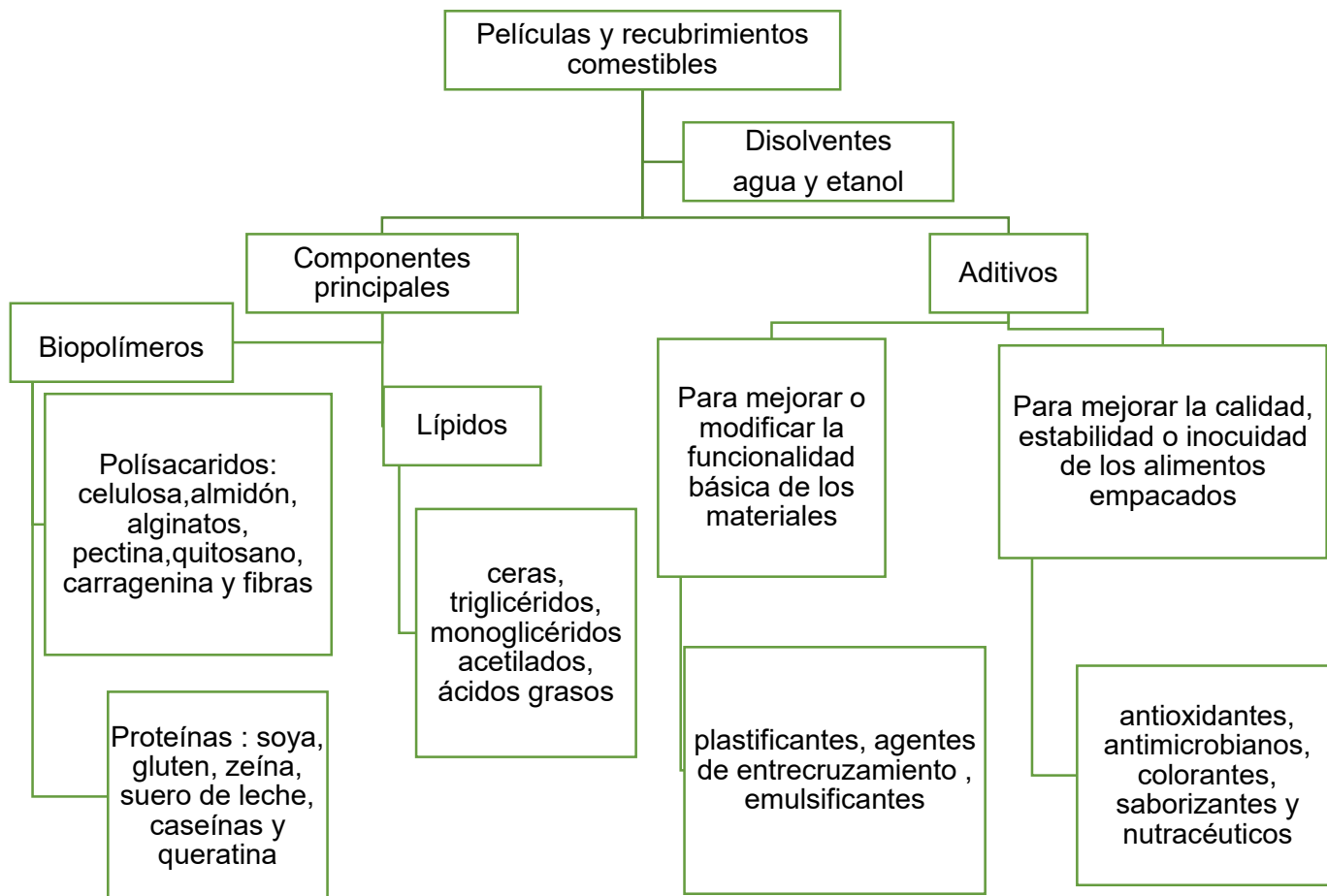


Fig. 5 Materiales empleados comúnmente en la elaboración de recubrimientos comestibles (Salgado et al. 2015).

Un recubrimiento o película comestible debe mantener una buena adherencia en la superficie de los alimentos, ya que la estabilidad estructural que proporciona, evita daños ocasionados durante el transporte y almacenamiento. Los recubrimientos o películas comestibles protegen a los frutos de la contaminación ambiental y microbiológica, garantizan la inocuidad del alimento. En el desarrollo de películas comestibles se busca que su elaboración sea sencilla, de fácil aplicación y económicamente viable Fig. 6 (Salgado et al. 2015).

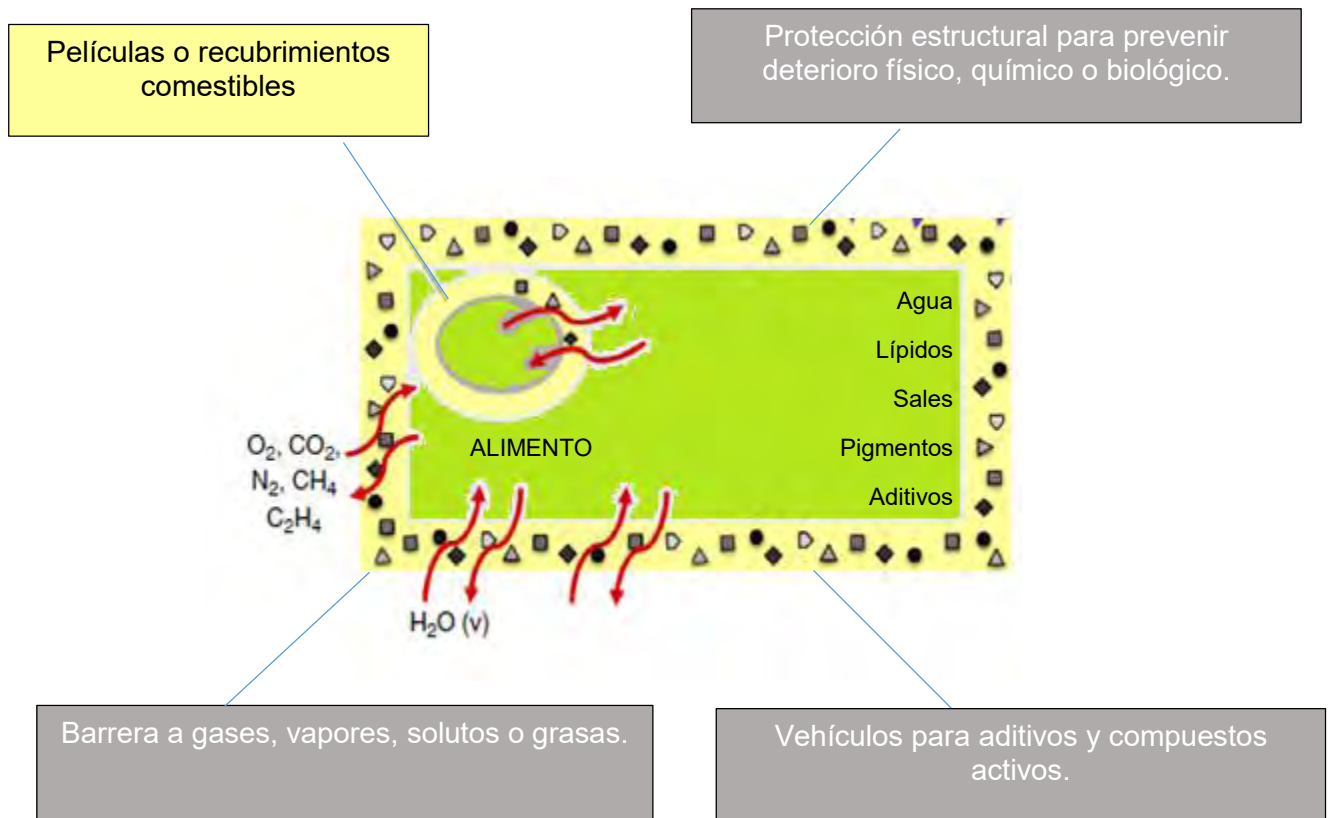


Fig. 6 Funciones principales de un recubrimiento comestible (Salgado et al. 2015).

2.6 Quitina

La quitina (poli *N*-acetil-*D*-glucosamina) es uno de los biopolímeros más abundantes de la naturaleza después de la celulosa, es el principal componente del exoesqueleto de crustáceos e insectos, también lo podemos encontrar en ciertos hongos (Mármol et al. 2011). La quitina es un homo polisacárido estructural, al igual que la celulosa se caracteriza por ser rígida, no elástica y altamente insoluble.

El método utilizado a nivel industrial para la obtención de quitina consiste en un proceso químico, el cual hidroliza la proteína y remueve la materia inorgánica. Esta técnica emplea grandes cantidades de agua, energía, ácidos y álcalis en altas concentraciones lo que dificulta la recuperación de productos de alto valor agregado como proteínas y pigmentos.

Para la extracción de quitina, el uso de métodos biotecnológicos como la fermentación ácido láctica (FAL) permite recuperar productos de alto valor agregado (Gimeno et al. 2007). Después de realizar la FAL, la concentración y la cantidad de ácidos y álcalis empleados para la purificación de la quitina disminuyen significativamente (Shirai et al. 2001; Cira et al. 2002).

2.7 Quitosano

El quitosano es la forma (*N*-desacetilada) de la quitina Fig. 7, se obtiene al sustituir los grupos acetoamido por grupos amino en el C-2 debido al tratamiento con álcalis fuertes. Se ha descrito como un polímero catiónico lineal formado por unidades 2-amino-2 deoxi-D-glucopiranosas unidos por enlaces β -1-4. El quitosano es un biopolímero capaz de formar películas que presentan un gran potencial como materiales de empaque en alimentos, debido a que es: biodegradable, de alto peso molecular, antimicrobiano y ambientalmente amigable. El quitosano es un biomaterial versátil, que puede emplearse como: solución, películas, o bien modificarse químicamente con lo que se facilita su aplicación.

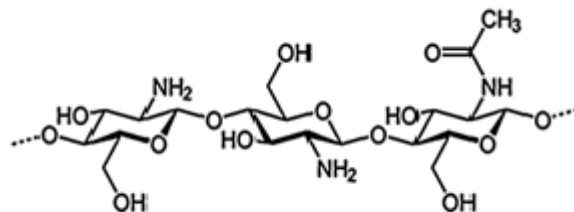


Fig. 7 Estructura del quitosano (Mármol et al. 2011).

2.8 El quitosano en la elaboración de recubrimientos comestibles

Los polietilenos de alta densidad utilizados comúnmente para empacar alimentos tienen la desventaja de favorecer la fermentación de los alimentos, debido al agotamiento del oxígeno en el interior, además propicia el crecimiento de hongos a causa de la condensación de agua dentro del empaque.

El quitosano puede formar recubrimientos semipermeables, el uso de agentes entrecruzantes como el glutaraldehído puede modificar las propiedades en el quitosano para elaborar películas rígidas.

Se ha descrito la combinación con otros polisacáridos, quitosano/pectina, quitosano/hidroxi propil metil celulosa, entre otros (Nicio, 2012). Esto con la finalidad de elaborar recubrimientos duraderos, flexibles y difíciles de romper, algunas de estas propiedades son similares a polímeros comerciales de fuerza media (Shahidi et al. 1999).

2.9 Propiedades antimicrobianas en los recubrimientos y películas elaboradas a partir de quitosano

La actividad antimicrobiana del quitosano contra diferentes grupos de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos aún no se ha descrito con exactitud. Sin embargo, se piensa que la acción antimicrobiana se debe a la interacción de las cargas positivas provenientes del monómero de glucosamina en C-2 y la carga negativa en la membrana de la célula microbiana, lo que conduce a la fuga de constituyentes intracelulares. El quitosano también actúa como un agente quelante que se une selectivamente a trazas de metales y por lo tanto inhibe la producción de toxinas, activa varias defensas en el tejido huésped inhibiendo diversas enzimas lo que evita el crecimiento microbiano (Sudharshan et al. 1992, Shahidi et al. 1999).

2.10 Recubrimientos elaborados empleando pectina

La pectina es un biopolímero aniónico de elevado peso molecular que forma parte de los tejidos de frutos y vegetales. Su estructura molecular está compuesta de ácido galacturónico, algunos de los grupos carboxílicos se encuentran esterificados con metanol. De acuerdo al grado de esterificación, se pueden clasificar como pectinas de alto metoxilo o de bajo metoxilo, ambos grupos tienen propiedades diferentes (Girard et al. 2002). Por otra parte se han elaborado recubrimientos con pectinas de alto metoxilo formando excelentes películas, las mezclas con bioplásticos, por ejemplo, polivinil alcohol en combinación con pectinas cítricas presentan estabilidad térmica hasta 180°C (Lacroix & Vu, 2014; Tharanathan, 2003).

2.11 Recubrimientos elaborados con proteínas de suero de leche

Las proteínas del suero representan aproximadamente el 20 % del total de las proteínas de la leche, estas se obtienen principalmente después de la elaboración del queso (Smithers, 2015).

Existen 5 proteínas principales en el suero: α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúminas, inmunoglobulinas y proteasas-peptonas. Los recubrimientos elaborados a partir de proteínas de leche carecen de sabor, son flexibles y dependiendo de la formulación pueden ser de translucidos a transparentes (Gebhardt & Petkeviciute, 2014).

2.11.1 β -lactoglobulina

La β -lactoglobulina (β) es la proteína más abundante en el suero de la leche su estructura es globular con un peso molecular de 18,4 kDa, posee un centro hidrofóbico y está estabilizada por dos puentes disulfuro. La estructura cuaternaria de esta proteína se ve afectada por pH y tratamiento térmico, en condiciones normales se encuentra como un dímero, se ha reportado que a pH menor a 3 y superior a 8 el dímero se disocia a monómeros (Lacroix & Vu, 2013).

Pérez-Gago et al. (1999) observaron que las proteínas del suero de leche, aún sin haber sido sometidas a ningún tipo de desnaturalización, forman películas en un intervalo de pH de 4-8, esto fue atribuido a su estructura nativa, debido a la hidrofobicidad que presentan, las fuerzas intermoleculares promueven la cohesión y la formación de puentes de hidrógeno para conformar los recubrimientos.

2.12 Inmovilización de microorganismos en recubrimientos

Se ha descrito la incorporación de microorganismos en soportes de quitosano con la finalidad de mejorar las propiedades en los recubrimientos, además de funcionar como controles biológicos (Martínez-Castellanos et al. 2011).

Los microorganismos lácticos probióticos considerados Generally Recognized as Safe (GRAS), son una alternativa para elaborar este tipo de materiales, *L. plantarum* es una bacteria Gram positiva, no esporulada, homofermentativa, ácido tolerante, puede inhibir *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes*

(Chakravorty,2010). La microencapsulación es una forma especial de inmovilización, que es empleada en la industria alimentaria para proteger, aislar o controlar la liberación de una sustancia determinada que podría proporcionar beneficios al consumidor (Corbo et al. 2013).

El propósito de la microencapsulación es preservar la viabilidad de células microbianas protegiéndolas a cambios de pH, estrés osmótico, cambios en la temperatura y del medio ambiente (Rathore et al. 2013). Entre los materiales más frecuentemente utilizados para la encapsulación de probióticos encontramos los materiales poliméricos capaces de formar una matriz protectora reteniendo las BAL.

3 ANTECEDENTES

El método empleado de manera tradicional por su fácil aplicación y bajo costo para preservar el color rojo en el litchi es la fumigación con SO₂ seguida de una inmersión con HCl diluido (Zauberman et al. 1991; Holcroft & Mitcham 1996). Este tratamiento logra preservar el color en el pericarpio durante un tiempo prolongado de almacenamiento, sin embargo existe una creciente preocupación acerca de estos residuos en la fruta, sobre todo para las personas que son sensibles a los sulfitos (ATSDR ,1998).

Se ha propuesto el uso de recubrimientos de quitosano, biopolímero no tóxico, biodegradable y antimicrobiano. Zhang & Quantick (1997) probaron la inmersión de los litchis en tiabendazol (TBZ), posteriormente aplicaron un recubrimiento de quitosano, con el que retrasaron parcialmente la actividad de la PPO, reduciendo la pérdida de peso, inhibiendo de forma significativa el deterioro en las características sensoriales.

Como alternativa a la fumigación con SO₂, se han empleado diferentes tratamientos químicos, Jiang et al. (2004) realizaron experimentos para probar los efectos del ácido clorhídrico (HCl) en la inhibición de la actividad de la PO, la fruta tratada con 1 % de HCl y almacenada a -18 °C durante 12 meses, presentó después de su descongelación, un alto contenido de antocianinas en el pericarpio manteniendo la calidad de la fruta.

Caro et al. (2005) utilizaron recubrimientos de quitosano funcionalizado con ácido cítrico y tartárico, estableciendo como un requisito primordial conocer el nivel de deshidratación de la fruta previo a la aplicación de los recubrimientos para tener una mayor efectividad durante el tratamiento.

Zheng et al. (2006) utilizaron soluciones de nitroprusiato de sodio, reduciendo el pardeamiento en el pericarpio durante 8 días en condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente, preservando además la calidad organoléptica de los litchis.

Martínez-Castellanos et al. (2011) aplicaron una suspensión de *Lactobacillus plantarum*, almacenando la fruta a 10°C con 75% HR. La fruta tratada exhibió la viabilidad de este microorganismo con el cual la producción de ácido láctico *in situ* permitió la estabilidad de las antocianinas a diferencia del control, preservando el color en los litchis.

Liang et al. (2012) reportaron la inmersión de litchis en metabisulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), los frutos tratados con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ no mostraron sulfitos residuales (30 g L^{-1} y 60 g L^{-1}). Indicando que es un método eficaz para retrasar el pardeamiento del pericarpio y la decadencia en las características de calidad poscosecha de los frutos.

Los resultados indicaron que el $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ no impregna el arilo durante la inmersión, a diferencia del SO_2 , que de acuerdo a lo establecido por Underhill et al. (1993) las frutas después de ser fumigadas se encontraban dentro del límite máximo permisible de residuos de SO_2 (135 mg kg^{-1}).

Nicio (2012) sintetizó y caracterizó películas de quitosano-cítrico-Hidroxipropil Metil Celulosa igualmente aplicó el tratamiento en los litchis, estabilizando las antocianinas en el pericarpio, sin embargo establece que la efectividad del tratamiento depende de la calidad de las frutas para obtener mejores resultados.

Téllez (2014) comparó tratamientos elaborados con quitosano químico y biológico obtenido mejores resultados con el quitosano biológico, determinó que el mejor tratamiento fue el que contenía *Lactobacillus plantarum* libre, logrando extender la vida poscosecha hasta 21 días, además realizó un estudio de prefactibilidad de los tratamientos en donde se determinó que la aplicación de Q 5g/L y BAL serían rentables con una recuperación de la inversión de 1 y 2 años respectivamente, tomando en cuenta la infraestructura que tienen los productores de litchi en la región del Papaloapan del Estado de Oaxaca (Barrera & Shirai 2014).

Kumari et al. (2015) aplicaron ácido salicílico (C₇H₆O₃) en combinación con quitosano logrando la reducción en el pardeamiento de los litchis durante 6 días almacenados a 4°C.

Para el caso del rambután también se ha propuesto la combinación de diferentes tratamientos: atmósferas modificadas a diferentes temperaturas y diversos recubrimientos y películas para disminuir el oscurecimiento y la pérdida de agua (Hare et al. 1994; Landrigan et al. 1996).

Sivakumar et al. (2002) emplearon cinamaldehído inhibiendo la germinación de los conidios de *Botryodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Gliocephalotrichum microchlamyosporum*. El cinamaldehído impregnado preservó las características de calidad durante 14 días almacenados a 13.51°C y 95 % HR.

Martínez-Castellanos et al. (2009) evaluó el efecto de *Lactobacillus plantarum*, solo y en combinación con quitosano, la aplicación de lactobacilos produjo la acidificación del pericarpio mejorando significativamente la retención del color y redujo la pérdida de peso debido a la formación de biopelículas.

4 JUSTIFICACIÓN

El litchi y el rambután son frutos no climatéricos subtropicales altamente perecederos, la rápida deshidratación provoca el oscurecimiento en el pericarpio de los frutos, suscitando un rechazo por parte del consumidor. Como consecuencia, el periodo de comercialización se reduce debido a su corta vida de anaquel, generando pérdidas económicas.

Los métodos químicos empleados de manera tradicional en la conservación de las características poscosecha de litchi y rambutan, alteran el sabor y generan problemas ambientales (Sivakumar et al. 2007).

En el presente trabajo, se propone la aplicación de un recubrimiento elaborado a partir de quitosano, un biopolímero catiónico, biodegradable y antimicrobiano que en combinación con el complejo aniónico proteína/polisacárido (β -lactoglobulina/pectina) permitirá la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* (BAL).

Las BAL tienen la capacidad de producir una amplia gama de sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos (láctico y acético), peróxido de hidrógeno, reuterina, nisina u otras sustancias similares a bacteriocinas.

El recubrimiento elaborado presentará una alternativa para reducir el pardeamiento en las frutas, debido a la producción *in situ* de ácido láctico estabilizando las antocianinas por acidificación del pericarpio (Martínez-Castellanos et al. 2009). Lo anterior como alternativa a la fumigación con SO₂ preservando las características de calidad sin ningún residuo químico nocivo para la salud.

5 HIPÓTESIS

Los recubrimientos elaborados a partir de quitosano, pectina/ β -lactoglobulina, permitirán la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* logrando la producción *in situ* de ácido láctico, dicho ácido orgánico disminuirá el pH en el pericarpio ejerciendo un efecto protector sobre las antocianinas presentes, ralentizando el pardeamiento.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Preparar y caracterizar los recubrimientos elaborados a partir de *L. plantarum* y biopolímeros, evaluar su efecto en las características poscosecha de litchi y rambután.

6.2 Objetivos particulares

- I. Obtener y caracterizar quitina mediante fermentación láctica a escala piloto.
- II. Caracterizar el quitosano, obtenido a partir de la desacetilación de la quitina obtenida de un cultivo en estado sólido.
- III. Preparar y caracterizar los recubrimientos elaborados.
- IV. Evaluar la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* en los recubrimientos.

7 METODOLOGÍA

En la figura 8 se presenta la estrategia experimental empleada en la preparación y caracterización de los recubrimientos elaborados a partir de lactobacilos y biopolímeros, evaluar su efecto en las características poscosecha de litchi y rambután.

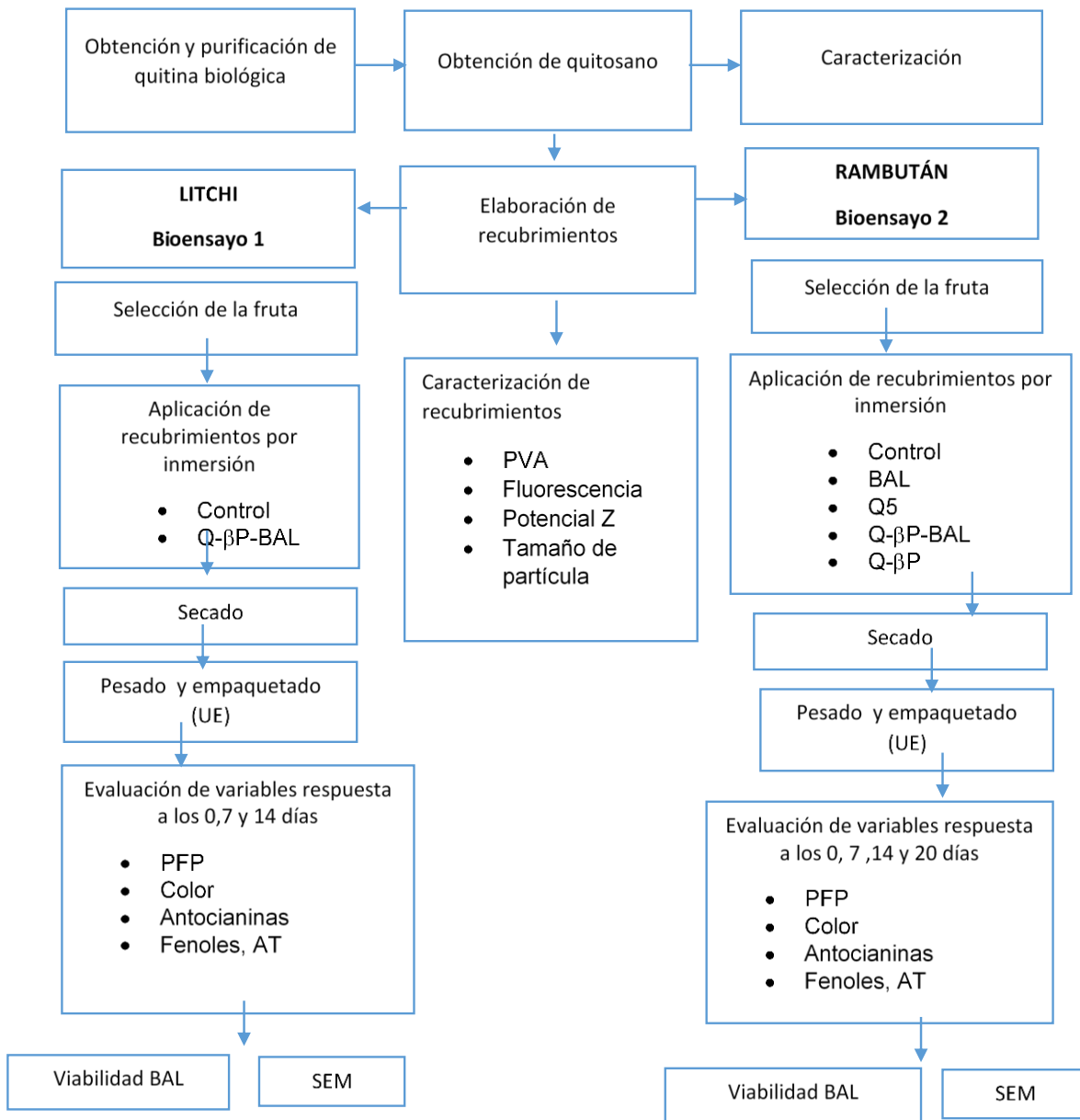


Fig. 8 Metodología general empleada en la realización de esta tesis.

7.1 1° ETAPA: Preparación y caracterización de quitina y quitosano

7.1.1 Extracción biológica de quitina a partir de desechos de camarón

El desecho de camarón utilizado consistió principalmente en cabezas y exoesqueletos obtenidos del acopio, procedentes del mercado de mariscos “La Nueva Viga”, 50 kg de desecho de camarón se mezclaron con 10 % (p/p) de azúcar de caña y el 5 % (v/p) de inóculo *Lactobacillus* spp. En un reactor columna, la mezcla de reacción (fermentación láctica) se dejó fermentar durante 216 h a 30 °C (Cira et al. 2002). Se verificó la fermentación mediante la determinación de pH y acidez total titulable (AT) directamente en las muestras de licor y la fase sólida “quitina cruda” (QC).

7.1.2 Purificación de quitina

La desmineralización (DM) de QC se realizó mediante la siguiente metodología experimental: la quitina cruda se trató con una solución de HCl (0.4N) en una relación 1:15 (p/v). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación constante durante 1 h. Posteriormente se filtró y secó a temperatura ambiente durante 5 días (Cira et al. 2002).

En la etapa de desproteínización (DP) se preparó una solución de NaOH (0.4N) tomando en cuenta la relación 1:15 (p/v), la quitina desmineralizada se mantuvo en agitación constante durante 1h, se filtró y lavó con agua corriente hasta neutralidad y se secó a temperatura ambiente durante 5 días (Cira et al. 2002).

7.1.3 Caracterización de quitina biológica (QB)

7.1.3.1 Determinación del contenido de humedad (%H)

El porcentaje de humedad se determinó por diferencia de pesos, 2g de muestra se pesaron en un crisol de cerámica previamente puesto a peso constante a 110 °C durante 24 h. La muestra se dejó secar en una estufa con temperatura controlada durante 24 h a 110°C hasta que alcanzó un peso constante. El cálculo del porcentaje de humedad se realizó empleando la ecuación (1), las muestras se realizaron por triplicado (A.O.A.C, 1990).

$$\% H = \left(\frac{\text{peso muestra humeda} - \text{peso muestra sin humedad}}{\text{peso muestra humeda}} \right) \times 100 \quad (1)$$

7.1.3.2 Determinación del contenido de cenizas (%C)

El porcentaje de cenizas se determinó después de la combustión de las muestras, 2 g de muestra se pesaron en crisoles de cerámica previamente puestos a peso constante durante 24 h a 110 °C. Posteriormente las muestras fueron calcinadas en un mechero dentro de una campana hasta obtener un sólido negro. Este residuo fue introducido dentro de una mufla a 550 °C, durante 24 h. El porcentaje de cenizas se calculó con la ecuación (2), las muestras se realizaron por triplicado (A.O.A.C, 1990).

$$\% C = \left(\frac{\text{peso de crisol con cenizas} - \text{peso del crisol}}{\text{peso de la muestra seca}} \right) \times 100 \quad (2)$$

7.1.3.3 Determinación del contenido de grasa (%G)

El porcentaje de grasa se calculó después de la cuantificación de sustancias extraíbles con éter de petróleo por diferencias de pesos con la ecuación (3), las muestras se realizaron por triplicado (A.O.A.C, 1990).

$$\% G = \left(\frac{\text{peso del vaso con grasa} - \text{peso del vaso}}{\text{peso de la muestra}} \right) \times 100 \quad (3)$$

7.1.3.4 Determinación de nitrógeno total

El nitrógeno total se determinó por el método de Kjeldahl. El método consiste en la digestión de la muestra por calentamiento con ácido sulfúrico H₂SO₄ concentrado en presencia de un catalizador (mezcla reactiva de selenio) para reducir el nitrógeno orgánico de la muestra hasta amoníaco, el sulfato de amonio producido se alcaliniza y se destila para desprender el amoníaco que posteriormente es atrapado y titulado, ecuación (4) (Cira et al. 2002).

$$\text{Nitrogeno total} = \text{Nitrogeno no proteico} + \text{Nitrogeno no proteico} \quad (4)$$

A partir de estos datos se determinó el porcentaje de proteína residual de las muestras utilizando la ecuación (5)

$$\%Proteína\ residual = (Nitrógeno\ total - Nitrógeno\ de\ quitina) \times 6.25 \quad (5)$$

7.1.4 Quitosano

7.1.4.1 Obtención de quitosano

La QB obtenida fue desacetilada con una solución de NaOH al 50% (p/v) en una relación 1:15 (p/v) durante 3.5 h en un reactor de acero inoxidable. La mezcla de reacción se dejó en agitación mecánica a 110 °C y 595 rpm. El quitosano se lavó con agua corriente hasta neutralidad y fue secado para su caracterización.

7.1.5 Caracterización de quitosano

7.1.5.1 Grado de acetilación (DA)

El grado de acetilación del quitosano (DA) se determinó mediante espectroscopia de resonancia magnética nuclear de protón (1H RMN). El quitosano obtenido se disolvió en HCL/D₂O durante 12 h a temperatura ambiente. Las muestras obtenidas fueron analizadas en un espectrómetro Bruker AVANCE-III 500 (Alemania) para 1H a 298 K. El DA se calculó de acuerdo a la integración de las áreas correspondientes a la señal del protón metilo del residuo (1-4)-2 acetamido-2-desoxibeta-D-glucano y los protones H₂ al H₆ de la estructura completa utilizando la ecuación (6) (Pacheco, et al. 2007).

$$DA(\%) = \left(\frac{\frac{1}{3}I_{CH_3}}{\frac{1}{6}H_2-H_6} \right) \times 100 \quad (6)$$

7.1.5.2 Peso molecular determinada mediante viscosidad intrínseca

El peso molecular (M_v) del quitosano se calculó determinando la viscosidad intrínseca. Para determinar el peso molecular el quitosano fue disuelto en una solución de ácido acético glacial (2 %) y acetato de sodio (0.2M). Los parámetros se determinaron empleando la ecuación (7) (Mark-Houwink-Sakurada) donde a y k son constantes para el disolvente empleado (Pacheco, et al. 2007, Shrinivas, et al. 2005).

$$[\eta] = \kappa Mva \quad (7)$$

Donde $k = 1.38 \times 10^{-5}$ L/g; $a = 0.85$

7.2 2° ETAPA: Preparación y caracterización de los recubrimientos

7.2.1 Preparación de la suspensión celular

Lactobacillus plantarum CDBB-B-1115 CINESTAV, fue inoculada en medio de cultivo Man Rogosa Sharpe (MRS) e incubada a 30°C durante 24 h hasta una cuenta de 1×10^9 UFC/mL. Subsecuente la suspensión celular fue preparada mediante centrifugación de dicho cultivo a 959 g durante 15 min a 20° C. El pellet obtenido se lavó con una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.0) 0.02 M (Martínez-Castellanos et al. 2011).

7.2.2 Preparación de solución de quitosano (Q5)

El Q obtenido, se solubilizó en una solución de ácido acético (0.1 N) en una relación 5 (g/L), se dejó en con agitación magnética constante durante 7 días para su total disolución (Téllez, 2014).

7.2.3 Preparación de los complejos poli electrolitos

7.2.3.1 Formulación de quitosano y pectina- β -lactoglobulina (Q- β P)

La pectina (P) se disolvió en agua destilada estéril 0.05% (p/v). Por otra parte se preparó una solución 0.1% (p/v) de β -lactoglobulina (β), el pH de ambas disoluciones se ajustó a (7.0) con una solución de NaOH 0.1 M (Jones et al. 2010).

El complejo aniónico se obtuvo mezclando en relación 1:1 ambas soluciones, posteriormente se agregó el Q5 en la misma proporción mezclando con agitación constante durante 15 min para su total homogenización.

7.2.3.2 Formulación de quitosano, pectina- β -lactoglobulina y BAL (Q- β P-BAL)

La pectina (P) se disolvió en agua destilada estéril 0.05% (p/v). Por otra parte se preparó una solución 0.1 % (p/v) de β -lactoglobulina (β), el pH de ambas disoluciones se ajustó a (7.0) con una solución de NaOH 0.1 M (Jones et al. 2010).

Se agregó la suspensión de *Lactobacillus plantarum* en relación 1:1 a la mezcla obtenida (β P). Finalmente el Q5 se adicionó en la misma proporción, agitando durante 15 min para su total homogenización.

1.1.1 Preparación de recubrimientos

Las películas fueron preparadas por “casting”, se emplearon 30 g de solución formadora de película, en una caja Petri la solución fue vertida, las cajas se colocaron en una estufa a 60 °C durante 24 h, la película fue retirada de la caja con ayuda de un cúter cuidando de no generar fisuras.

Las películas fueron previamente acondicionadas en una cámara ambiental con una HR de 40±5 % con una solución saturada de Mg(NO₃)₂·6H₂O a temperatura ambiente durante 4 días.

7.3 Caracterización de los recubrimientos

7.3.1 Determinación del potencial zeta (ζ)

El potencial zeta (ζ) se determinó utilizando agua como dispersante, con las muestras diluidas en una relación 1:1 se realizó la medición en un equipo Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, U.K) ecuación 8

$$\sigma_0 = \frac{\epsilon}{4\pi J} \Psi_0 \quad (8)$$

Donde:

Ψ_0 : la diferencia de potencial entre a superficie del sólido y un punto en el interior

ϵ : es la constante dieléctrica del ion adherido

σ : es la densidad de carga en la superficie del sólido

J: es el radio medio del ion

7.3.2 Determinación de tamaño de partícula

El tamaño de partícula (D 3,0) y la distribución se determinaron por difracción de rayo láser empleando el analizador de tamaño de gota Malven serie 2000, (Malvern Instruments, Malvern, U.K).

7.3.3 Espesor en las películas

El espesor de las películas se obtuvo empleando un micrómetro digital (Mitutoyo, Japón). Para cada muestra se realizaron cuatro mediciones en distintas áreas de la película. Los valores determinados fueron promediados para obtener el espesor de cada una de las películas

7.3.4 Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La PVA se determinó a $10^{\circ}\text{C} \pm 2$ en un gradiente de HR de 75-90% y 90-75%. Las películas fueron cortadas y colocadas en la parte superior de un vial sujetado con parafilm. Se registró el peso inicial de las celdas de prueba estas fueron transferidas a una cámara ambiental que consistía en un desecador de vidrio con tapa, dentro del vial se encontraba una solución saturada de NaCl para generar una HR de 75% mientras que en la cámara ambiental se colocó una solución saturada KNO_3 de esa manera se obtuvo el gradiente 75/90 de la misma manera se obtuvo el gradiente 90/75 invirtiendo las soluciones. Las cámaras ambientales se mantuvieron a $10^{\circ}\text{C} \pm 2$. La pérdida o ganancia de peso se registró cada 24 h registrando los pesos hasta alcanzar el equilibrio.

Se graficó la diferencia de peso contra el tiempo, obteniéndose la pendiente (J) a partir de este valor se determinó la velocidad de transmisión de vapor de agua (VTVA), así como la PVA con las siguientes ecuaciones 9 y 10

$$VTVA = \frac{J}{t.A} \quad (9)$$

Donde

t : tiempo

A: área expuesta de la película

$$PVA = \left(\frac{VTVA}{pw_1 - pw_2} \right) \times L \quad (10)$$

L: espesor de la película

pw₁: presión parcial de vapor en la celda de prueba

pw₂: presión parcial de vapor en la cámara ambiental

7.3.4.1 Determinación de la viabilidad celular mediante espectrometría de fluorescencia

Para determinar la viabilidad de *L. plantarum* se utilizó el equipo Tecan M1000 PRO, en una microplaca de fluorescencia se colocaron 100_μL del recubrimiento mezclado con 100_μL de la solución de tinción (SYTO ®9/ yoduro de propidio, KIT L13152 Live/Dead BacLight, Molecular probes), la microplaca se dejó en la oscuridad durante 15 min a 30°C. Se fijó una longitud de onda de 485 nm, la determinación de bacterias viables fluorescencia verde se realizó a 530 nm mientras que para las bacterias no viables fluorescencia roja se realizó a 630nm. El porcentaje de viabilidad se calculó de acuerdo a la ecuación 11.

$$\% \text{ viabilidad} = \left(\frac{I_1}{I_2} \right) \times 100 \quad (11)$$

Donde:

I₁: intensidad de fluorescencia verde (530 nm)

I₂: intensidad de fluorescencia roja (630 nm)

7.4 3° ETAPA: Aplicación de los recubrimientos

7.4.1 Diseño experimental para bioensayo con litchi

Para realizar el bioensayo con litchi, se formaron unidades experimentales (UE) con aproximadamente 370 g de litchi, colocados en cajas tereftalato de polietileno (PET) transparentes, empleando frutos seleccionados con base en su grado de madurez,

libre de daño mecánico y de contaminación microbiana. Las UE fueron almacenadas a 10 °C y HR 75%. Se tomaron muestras a los 0, 7 y 14 días.

Se empleó un diseño experimental de bloques completos y aleatorizados donde la fuente de variación fueron los tratamientos aplicados:

- Control (sin tratamiento)
- Q-βP-BAL

Las variables respuesta analizadas para cada UE fueron: PFP (%), color (L^* , a^* y b^*), fenoles y antocianinas. Para el análisis estadístico se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de múltiple de medias (LSD) utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) para evaluar los efectos significativos ($\alpha < 0.05$).

7.4.2 Diseño experimental para bioensayo con rambután

Para realizar el bioensayo con rambután de la misma manera, se formaron UE con aproximadamente 370 g fruta, las cuales se colocaron en cajas PET transparentes, empleando frutos seleccionados con base en su grado de madurez, libre de daño mecánico y de contaminación microbiana. Las UE fueron almacenadas a 10 °C y HR 75%. Se tomaron muestras a los 0, 7, 14 y 20 días.

Se empleó un diseño experimental de bloques completos y aleatorizados donde la fuente de variación fueron los tratamientos:

- Control
- BAL
- Q5
- Q-βP-BAL
- Q-βP

Las variables respuesta analizadas para cada UE fueron: %PFP, color (L^* , a^* y b^*), fenoles y antocianinas. Se realizó un análisis estadístico aplicando un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de comparación de múltiple de medias (LSD)

utilizando el paquete estadístico NCSS (2007) para evaluar los efectos significativos ($\alpha < 0.05$).

7.4.3 Análisis de las unidades experimentales (UE) tratadas con los recubrimientos

7.4.3.1 Pérdida Fisiológica de Peso (PFP)

El cambio de peso en las UE, se determinó durante todo el bioensayo, calculando la pérdida de peso en porcentaje de acuerdo a la ecuación 12.

$$PFP = \left(\frac{P_i - P_f}{P_i} \right) \times 100 \quad (12)$$

Donde

Pi: peso inicial

Pf: peso final

7.4.3.2 Determinación de sólidos solubles totales (SST)

La determinación de SST se realizó empleando un refractómetro (MILTON Mod.LR45227) a 20°C. Se maceró la pulpa de los frutos en un mortero posteriormente se filtró con una gasa de algodón, del jugo obtenido se tomó una gota y se depositó en el refractómetro realizando la lectura correspondiente. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

7.4.3.3 Determinación de Acidez Total Titulable (ATT)

Se cuantificó el porcentaje de ATT expresado como ácido málico presente en el jugo de litchi y rambután mediante una titulación volumétrica ácido-base (A.O.A.C, 2000). Se tomaron 5 ml de jugo procedentes de 10 frutos tomados al azar de cada UE, al cual se le agregaron 3 gotas de fenolftaleína y se tituló con una solución de NaOH (0.1N). La acidez total titulable fue calculada como % de ácido málico mediante la ecuación 13.

$$\% \text{Ácido málico} = \left(\frac{V_{NaOH} \cdot N_{NaOH} \cdot meq(\text{ácido málico})}{V} \right) \times 100 \quad (13)$$

Donde:

V: volumen de la muestra

N: normalidad

meq: mili equivalentes de ácido málico (0.06705)

7.4.3.4 Extracción de fenoles y antocianinas

Para realizar la extracción de fenoles y antocianinas se tomó el pericarpio de 10 frutos de cada UE de litchi y rambután estos fueron depositados en nitrógeno líquido para facilitar el macerado y reducir el tamaño de partícula (Martínez-Castellanos et al. 2011) posteriormente se pesaron 3 gr de epicarpio obtenido, se colocaron en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 45 mL de una mezcla de metanol: HCl 1N en proporción 8.5:15 v/v durante 12 h, con agitación constante, posteriormente se realizó una segunda extracción durante 4h con las mismas condiciones, se obtuvo un volumen final de extracto de 90mL el cual fue centrifugado a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C.

7.4.3.5 Determinación de antocianinas totales mediante espectrometría de absorción

Esta determinación se realizó con un método espectrofotométrico de acuerdo a lo reportado por (Zheng & Tian, 2006). Del extracto metanólico obtenido del punto 7.4.3.4 se leyeron en un espectrofotómetro a tres longitudes de onda (530,620 y 650 nm) con la ecuación 14.

$$A = (A_{530} - A_{620}) - 0.1(A_{650} - A_{620}) \quad (14)$$

7.4.3.6 Determinación de antocianinas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La determinación de antocianinas se realizó mediante HPLC de acuerdo a lo reportado por Hosseinian et al. (2008), para lo cual se tomó una alícuota del extracto metanólico obtenido como se reporta en el punto 7.4.3.4, la alícuota previamente filtrada y se inyectó en un HPLC Agilent Technology Modelo 1260 Infinity equipado con una columna Agilent Eclipse XDBC18 de 15µm y un detector UV-visible.

Se utilizó un gradiente de ácido fórmico (4.5% v/v): metanol en los siguientes tiempos 0'90:10, 30' 75:25, 40' 55:45, 42'10:90 50'90:10.

Para la cuantificación se utilizó un estándar de cianidina-3-rutinósido (Fluka), la principal antocianina presente en el epicarpio de litchi y rambután (Téllez, 2014).

7.4.3.7 Determinación de fenoles totales

El contenido de fenoles totales fue estimado por un método espectrofotométrico y se expresó como equivalentes de catequina. Se tomó una alícuota (0.1 mL) previamente diluida del extracto metanólico obtenido de acuerdo a lo reportado en el punto 7.4.3.4, esta fue transferida a un tubo de ensayo que contenía 7.9 mL de agua destilada se adicionó 0.1 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, después de 5 min se añadieron 1.5mL de una solución de Na_2CO_3 (200g/L) y se dejó reaccionar durante 90 min a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 760 nm y se comparó con una curva de calibración realizada con catequina (Téllez, 2014).

7.4.3.8 Análisis de cambio de color

Para el cambio de color se realizó un análisis al pericarpio de litchi y rambután utilizando un colorímetro Minolta 200 con el cual se determinaron los parámetros cromáticos CIE: L^* , a^* , b^* y h , para esto se tomaron 20 frutos de forma aleatoria y se realizó la determinación eligiendo 3 zonas diferentes las cuales estuviera intactas y libres de oscurecimiento.

7.4.4 Caracterización de los recubrimientos en los frutos

7.4.4.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM) del pericarpio de litchi y rambután

Se cortó una sección del pericarpio de los frutos recubiertos con Q- β P-BAL, las muestras fueron colocadas en glutaraldehído 5 %(v/v) para ser fijadas. Posteriormente las muestras fueron lavadas con una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH 7 cada 30 min durante 10 h, las muestras se deshidrataron con gradientes de etanol al 30, 40, 50, 60, 70,80, 90% y alcohol etílico absoluto durante tres periodos de 20 min en cada solución.

Una vez deshidratadas se secaron a punto crítico y después fueron recubiertas con un baño de oro para su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL JSM-5900LV).

7.4.4.2 Determinación de BAL viables en frutos mediante conteo en placa

Para determinar la viabilidad BAL en los frutos de litchi y rambután, se tomaron 3 frutos, cada uno fue lavado con 100mL de solución salina 0.09%(p/v) estéril durante 1 min. Posteriormente se realizaron diluciones decimales en placas MRS incubando a 30°C por 24h. El crecimiento de *L. plantarum* recuperado, fue determinado por la morfología colonial establecida por Martínez-Castellanos et al. (2011) expresada como unidades formadoras de colonias por gramo de fruto (UFC/g fruto).

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 1° ETAPA caracterización de quitina y quitosano

8.1.1 Quitina

Se realizaron dos fermentaciones de 50 kg, en ambas se realizó un análisis químico proximal a las fracciones obtenidas de QC y QP, los resultados se presentan en la tabla 1.

Tabla 1 Análisis químico proximal en base seca de la quitina obtenida en ambas fermentaciones

Fermentación	Cenizas (%)	Grasa (%)	Proteína (%)	Quitina (%)^a
Camarón	23.85±0.73	10.51±0.29	47.24±0.63	18.45±1.23
Quitina cruda F1	13.06±2.11	10.86±0.34	5.38±0.05	70.71±1.83
Quitina cruda F2	7.79±0.58	5.84±0.10	12.36±0.12	74.01±0.60
Quitina pura F1^a	1.75±0.05	0.80±0.17	1.58±0.30	95.85±0.42

Los resultados mostrados son el promedio de 3 observaciones expresadas en porcentaje (base seca) y error estándar de la media. ^a con respecto a quitina cruda.

El porcentaje de quitina cruda obtenida después de la FAL fue 70.71±1.83 %, y 74.01± 0.60 % para F1 y F2 respectivamente, los valores obtenidos se encuentran dentro de lo reportado por Pacheco et al. (2009) (70-74%).

El porcentaje de desproteización (% DP) obtenido fue 77.01±0.71 % para F1 y 73.84±0.26 en F2, los valores son menores de acuerdo a lo determinado por Cira et al. (2002) 89.4 % y Pacheco et al. (2009) de 91 % estos resultados se atribuyen principalmente a la hidrolisis parcial de enzimas proteolíticas debido al crecimiento de la microflora propia del desecho. Pacheco et al. (2009) atribuyen valores mayores de desproteización cuando las condiciones de temperatura en el reactor durante la FAL son óptimas desde el inicio.

En cuanto al porcentaje de desmineralización (% DM) para la F1 fue 45.26 ± 8.84 % y 67.35 ± 2.41 % para F2, comparado con lo obtenido por Cira et al. (2002) 82.5 % y Pacheco et al. (2009) 94 %, resultan valores menores a lo antes mencionado; esto se debe principalmente a la cantidad de ácido láctico producido por la BAL, la temperatura afecta su crecimiento, el ácido orgánico proveniente de la fermentación no fue suficiente para remover el CaCO_3 presente en el exoesqueleto del camarón.

El porcentaje de quitina pura (QP) obtenida fue 95.85 ± 0.4 %, después de purificar una fracción quitina cruda, el contenido de cenizas, grasa, y proteína se redujo de manera significativa al final de la purificación química.

1.1.2 Caracterización de quitosano

Se utilizó un lote de QP obtenida de la F1, la quitina fue desacetilada durante 3.5 h con NaOH 50 % (p/v). El quitosano obtenido fue caracterizado cuantitativamente mediante humedad, cenizas, grado de acetilación, solubilidad y peso molecular, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 Caracterización del quitosano obtenido

Lote	Humedad (%)	Cenizas (%)	Solubles en ácido acético (%)	Grado de acetilación (%)	Peso molecular (kDa)
Quitosano (F1)	4.65 ± 0.60	1.46 ± 0.05	95.61 ± 0.72	9.91 ± 0.21	285.55 ± 0.19

Los resultados mostrados son el promedio de 3 observaciones expresadas en porcentaje y error estándar de la media.

El quitosano obtenido se encuentra dentro del intervalo de humedad 6-7 % reportado por Pillai et al. (2009) y el contenido de cenizas después de la desacetilación fue de 1.46 % comparado con los quitosanos comerciales; Sigma Chemical 0.2%, Dupont 0.2%, Cho et al. (2008), el porcentaje obtenido es mayor, esto se puede atribuir al tiempo de reacción de la desacetilación química de la quitina.

El grado de desacetilación es un parámetro que nos indica el (%) molar del monómero NH₂, la cantidad de grupos amino pueden variar dependiendo de las técnicas y el tiempo empleado para la desacetilación (Abdel-Rahmana et al. 2015).

El quitosano obtenido presentó un grado de acetilación de 9.91±0.21 %, y 95.61 ± 0.72 % de solubilidad en ácido acético. Ravi Kumar (2000), establece que la solubilidad se produce por la protonación del grupo amino, convirtiendo el quitosano en un polielectrolito, cuando se encuentra en medios ácidos.

El peso molecular del quitosano obtenido es de M_v de 285.55±0.19, de acuerdo a lo reportado por Zheng & Zhu (2003), el quitosano $M_v < 350$ kDa tiene mayor efecto antimicrobiano, debido a que permea la célula microbiana con mayor facilidad interfiriendo con el metabolismo de las bacterias.

8.2 2° ETAPA preparación y caracterización de los recubrimientos

La formación de películas y recubrimientos se lleva a cabo a través de dos procesos: un "proceso húmedo" o casting en donde la formación de película se debe a la evaporación del disolvente, y un "proceso seco", que se basa en el comportamiento termoplástico exhibido por algunas proteínas y polisacáridos (Espitia et al. 2014).

Los recubrimientos propuestos fueron elaborados empleando la técnica "casting" y caracterizados en cuanto a potencial z, tamaño de partícula y permeabilidad al vapor de agua.

8.2.1 Potencial z

Se determinó el potencial z a los complejos solubles con los cuales se elaborarían los recubrimientos. En la Fig. 9 se observa que la pectina presenta mayor carácter aniónico a diferencia del resto de las muestras analizadas, esto se debe a la naturaleza propia del biopolímero, la pectina de alto metoxilo (HMP) posee una gran cantidad de grupos carboxilo esterificados (Espitia et al. 2014).

La β -lactoglobulina se estudió por encima del punto isoelectrico es decir, a un pH (7.0), en el que la proteína está cargada negativamente, permitiendo la formación de un complejo soluble. Wang & Qvist (2000) reportaron la formación de un

complejo soluble con β -lactoglobulina y HMP, por otra parte Jones et al. (2009) realizaron un estudio en el que se determinó que la estabilidad del complejo β -Pectina dependía del pH, la concentración y el tipo de pectina empleada, obteniendo mejores resultados con HMP.

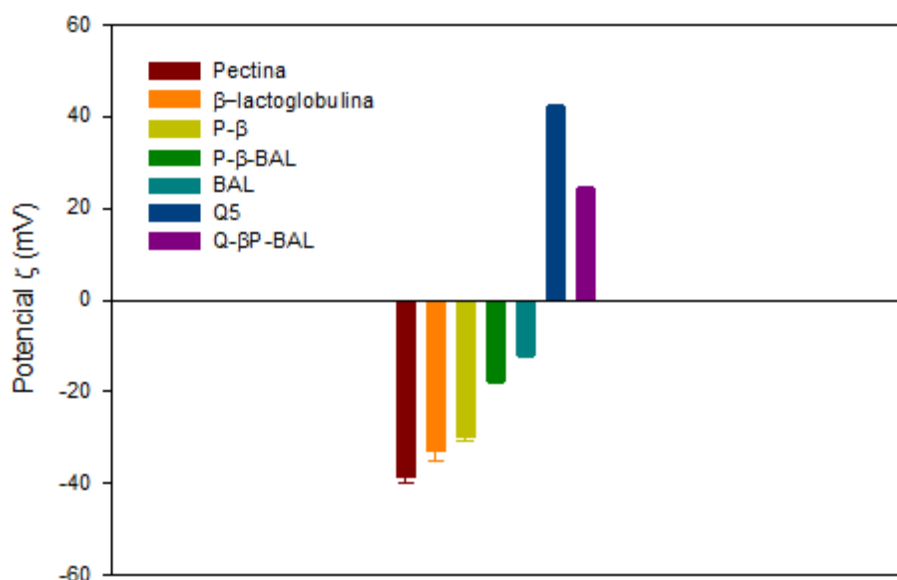


Fig. 9 Potencial ζ de los recubrimientos, biopolímeros y BAL.

En un sistema polisacárido/proteína por lo general el polisacárido lleva carga negativa, mientras que la carga de la proteína varía con el pH de la solución, las macromoléculas son co-solubles cuando ambos están cargados negativamente, el complejo soluble se estabiliza por repulsión electrostática (Sperber et al. 2009).

L. plantarum es una bacteria gram positiva, la pared celular de estas bacterias contiene polialcoholes denominados ácidos teicoicos, algunos de los cuales se enlazan con lípidos para formar ácidos lipoteicoicos. Los ácidos teicoicos se encuentran embebidos en la pared celular, estos ácidos dan a la pared de las bacterias Gram-positivas una carga negativa, debido a la presencia de enlaces fosfodiéster entre los monómeros del ácido teicoico. (Brock, 2004).

El carácter aniónico de la mezcla ternaria (P- β -BAL) se mantiene, permitiendo la interacción con el Q5, el recubrimiento se forma debido a las interacciones electroestáticas de los biopolímeros.

Una vez formado el recubrimiento se muestra en la Fig. 9, un comportamiento catiónico, esto se atribuye a la presencia de los grupos amino que no están interactuando con el complejo polisacárido/proteína, los grupos amino libres del quitosano podrían presentar propiedades antimicrobianas frente a bacterias, levaduras, mohos y hongos. (Van den Broek et al. 2015).

8.2.2 Tamaño de partícula

En la Fig. 10 se muestra el gráfico de los diámetros volumétricos de los recubrimientos, donde se observa que la β -lactoglobulina presenta el menor diámetro volumétrico, seguido por la pectina. También se observa un incremento en el tamaño de partícula conforme se van adicionando los biopolímeros.

El recubrimiento formado por Q- β P-BAL es el de mayor tamaño, la adición de BAL en la red polimérica formada aumenta el diámetro volumétrico a diferencia de Q- β P.

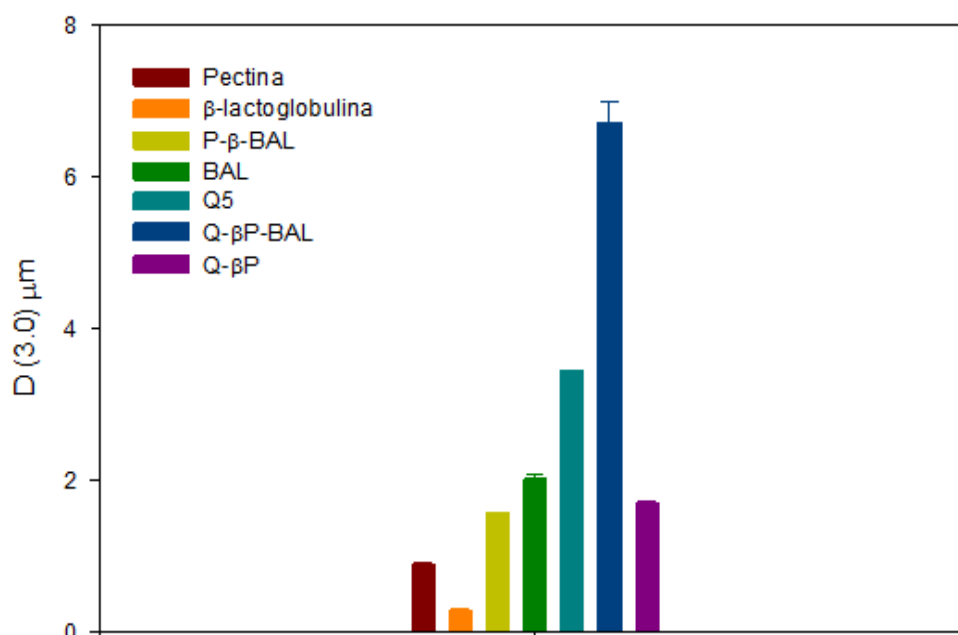


Fig. 10 Diámetro volumétrico de los recubrimientos, biopolímeros y BAL

8.2.3 Permeabilidad al Vapor de Agua y espesor de las películas

La permeabilidad al vapor de agua se determinó a 10 ± 5 °C, en donde la HR dentro de la celda de prueba fue 75 % la cual corresponde a la humedad promedio que tienen las zonas tropicales de producción de litchi y rambután. La cámara ambiental contenía HR de 90 % correspondiente a las condiciones óptimas establecidas para el almacenamiento de los frutos tropicales (Wongs-Aree et al. 2014), de la misma manera se llevó a cabo la prueba invirtiendo los gradientes de humedad, esto con la finalidad de observar el comportamiento de los recubrimientos.

Tabla 3 Espesor de los recubrimientos elaborados, PVA de las películas a dos gradientes de HR 75/90 y 90/75 a 10°C

Recubrimiento	Espesor medio (mm)
Q5	0.0208±0.001
Q-βP-BAL	0.0195±0.001
Q-βP	0.0380±0.001

Los resultados mostrados son el promedio de 4 observaciones expresadas en porcentaje y error estándar de la media.

El espesor se determinó a todos los recubrimientos, los resultados se muestran en la Tabla 3. La película de Q5 tiene un espesor de 0.0208 ± 0.001 mm, Martínez-Castellanos (2009) obtuvo un espesor para películas de quitosano (Q) de 0.021 ± 0.002 mm, López (2013) 0.0608 ± 0.0044 mm, mientras que Hernández (2014) de 0.035 ± 0.01 mm. El espesor de las películas se puede atribuir a la cantidad de solución agregada y a el área superficial en donde se elaboran, de acuerdo a la metodología propia de cada autor.

El espesor del recubrimiento que contenía BAL fue de 0.0195 ± 0.001 mm, Martínez-Castellanos (2009) señaló, el espesor de un recubrimiento QBAL embebido de 0.023 ± 0.002 mm, en el recubrimiento propuesto se agregó una proporción 1:1 de suspensión celular 1×10^9 UFC/mL a la mezcla ternaria Q-βP, la cantidad de suspensión añadida en la red polimérica aumenta de tamaño debido a los microorganismos que encuentran en el recubrimiento (Fig. 10).

La película formada por Q-βP registro un espesor de $0.038\pm 0.001\text{mm}$, este es más delgada en comparación a lo descrito por Espitia et al. (2014) quienes elaboraron películas de pectina, almidón y PVOH plastificado con glicerol mediante el método de extrusión con un espesor de 0.4 mm.

En la Fig. 11 se observan la PVA de los recubrimientos, el recubrimiento Q-βP presenta una permeabilidad al vapor de agua (4.344×10^{-3}) g mm/m²hKPa HR 75/90 y (5.089×10^{-3}) g mm/m²hKPa para HR 90/75.

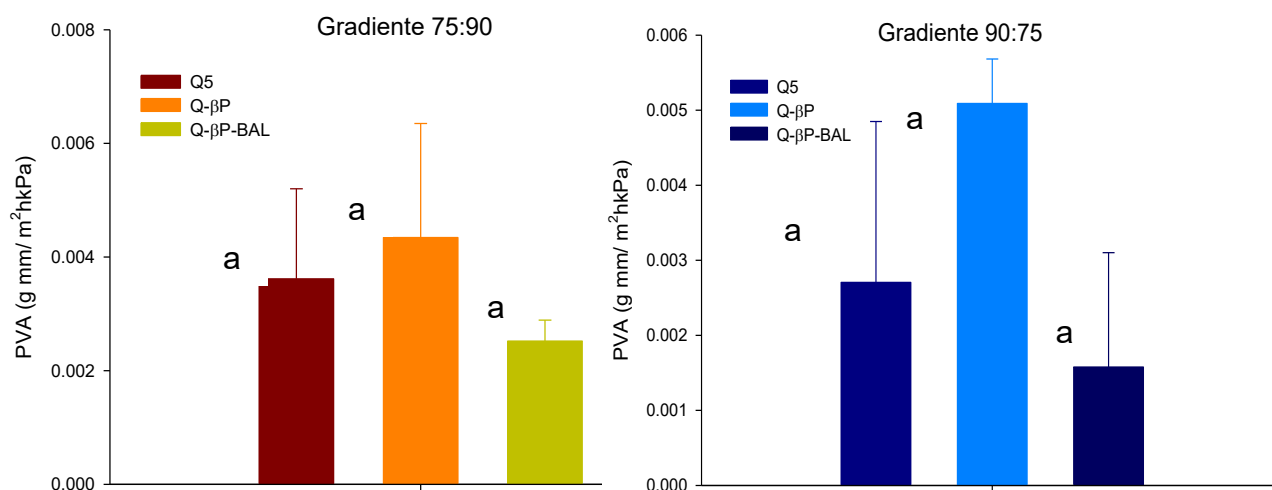


Fig. 11 PVA de las películas a dos gradientes de HR 75/90 y 90/75 a 10 ± 5 °C.

Esto se atribuye principalmente a la naturaleza de los biopolímeros, la pectina es altamente hidrofílica debido al gran número de grupos hidroxilos polares y grupos carboxilo cargados en la molécula, algunos de los grupos ácidos se ionizan y el agua se une tanto a los grupos cargados como a los grupos polares de la molécula (Espitia et al. 2014).

Por otra parte el quitosano no es soluble en agua pura, sin embargo la presencia de grupos amino e hidroxilo pueden interactuar con las moléculas de agua a través de puentes de hidrógeno, Aguirre-Loredo et al. (2016) observaron que a medida que la HR aumenta, la red polimérica de quitosano absorbe más agua y se hincha, facilitando el transporte de solutos a través de la matriz del polímero.

Los recubrimientos analizados a un HR de 75 % no presentan diferencia significativa entre los valores de permeabilidad al vapor de agua, esto resulta favorable, debido a que los recubrimientos Q-βP (4.344×10^{-03}) g mm/m²hKPa y Q-βP-BAL (2.521×10^{-03}) g mm/m²hKPa funcionan como el Q5 (3.616×10^{-03}) g mm/m²hKPa, mostrando baja permeabilidad al oxígeno y vapor de agua.

Comparando los recubrimientos a un gradiente de 90/75, no se observa diferencia significativa, entre Q-βP (5.089×10^{-03}) g mm/m²hKPa y Q-βP-BAL (1.577×10^{-03}) g mm/m²hKPa. La adición de *L. plantarum* al recubrimiento Q-βP-BAL permitió que las BAL al estar embebidas en el recubrimiento redujeran la superficie total de la película elaborada, exponiéndola menos a la transmisión de vapor de agua.

Los valores de permeabilidad al vapor de agua registrados para las película de Q5: para el gradiente 75/90 (3.616×10^{-03}) gmm/m²hKPa y (2.705×10^{-03}) gmm/m²hKPa para 90/75 no mostraron diferencias significativas. López (2013) reportó una PVA de películas de Q de 6.96×10^{-04} para un gradiente 22/75 siendo menor a lo reportado en este trabajo, por otra parte Di Pierro et al. (2011) señalaron valores de PVA en películas de quitosano de 0.6167 g mm/m²hKPa para un gradiente 0/100, Miranda et al. (2003) de 0.2613 g mm/m²hKPa para un gradiente 97/ 85, Nicio (2012) de 7.80×10^{-04} g mm/m²hKPa para un gradiente 75/95 en películas de Quitosano-Cítrico-Hidroxi Propil Metil Celulosa. El aumento en la PVA se encuentra relacionada con el contenido de HR en la cámara de prueba y el uso de plastificantes u otros biopolímeros en la elaboración de los recubrimientos.

8.2.4 Viabilidad del recubrimiento determinada por fluorescencia

La viabilidad del recubrimiento Q-βP-BAL se determinó mediante fluorescencia, el colorante SYTO 9 (fluorescencia verde) se utiliza para evaluar células viables, mientras que el yoduro de propidio (fluorescencia roja) entra sólo en aquellas células con membranas citoplasmáticas dañadas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Porcentaje de viabilidad en el recubrimiento Q-βP-BAL a 10°C y HR 75 %

Tiempo	0 días	7 días	14 días	21 días
% viabilidad	89.91±0.12	73.24±0.07	58.01±0.17	14.63±0.04

Los resultados mostrados son el promedio de 4 observaciones expresadas en porcentaje y error estándar de la media

Rajam et al. (2012), estudiaron que la combinación de proteína de suero desnaturalizada con una matriz de alginato de sodio fue capaz de mejorar la supervivencia de los probióticos, confiriendo protección y liberación controlada en condiciones ácidas y biliares.

Gebara et al. (2013), microencapsularon *L. acidophilus* La5 en una cápsula de pectina recubierta con proteínas de suero leche, el microencapsulado presentó una mejora en la viabilidad del microorganismo, principalmente cuando se expone a condiciones que simulan el tránsito a través del tracto gastrointestinal.

Khem et al. (2016), observaron el comportamiento de las proteína de suero en la protección de *L. plantarum* logrando la viabilidad de la bacteria durante ocho semanas, esto se atribuyó a las interacciones hidrófobas entre las células y las porciones hidrófobas expuestas en las proteínas del suero durante el secado por pulverización.

En la Tabla 4 se observa que la viabilidad del recubrimiento se mantiene durante 21 días y disminuye de manera paulatina, esto puede atribuirse a que la BAL está utilizando la pectina como fuente de carbono, este biopolímero es estructuralmente complejo, parcialmente esterificado, se encuentra ramificado con una gama de azúcares neutros, tales como ramnosa, galactosa, o arabinosa además de tener propiedades prebióticas (Espitia et al. 2014).

Por otra parte Ma et al. (2016), reportaron que el sistema proteolítico de *L. plantarum* desempeña un papel clave para hidrolizar las proteínas en péptidos y funcionar como fuente de nitrógeno, encontraron seis aminoácidos esenciales (Ile, Leu, Val, Tyr, Met, y fenilalanina) y al menos una purina (adenina o guanina) los cuales fueron identificados específicamente como nutrientes mínimos para la fermentación en la

leche. Estos aminoácidos se encuentran en la estructura de la β -lactoglobulina (Fennema, 1993).

8.3 3° ETAPA Aplicación de los recubrimientos

8.3.1 Bioensayo litchi

8.3.1.1 Pérdida fisiológica de peso (PFP)

La PFP en litchi es importante, la fruta pierde humedad una vez cosechada, la desecación acelera la pérdida del color rojo debido al incremento en la actividad de las enzimas PPO y PO (Underhill & Simons, 1993).

Los litchis recubiertos con Q- β P-BAL presentan diferencia significativa en cuanto a PFP a diferencia del control el cual no tiene ningún tipo de tratamiento Fig. 12.

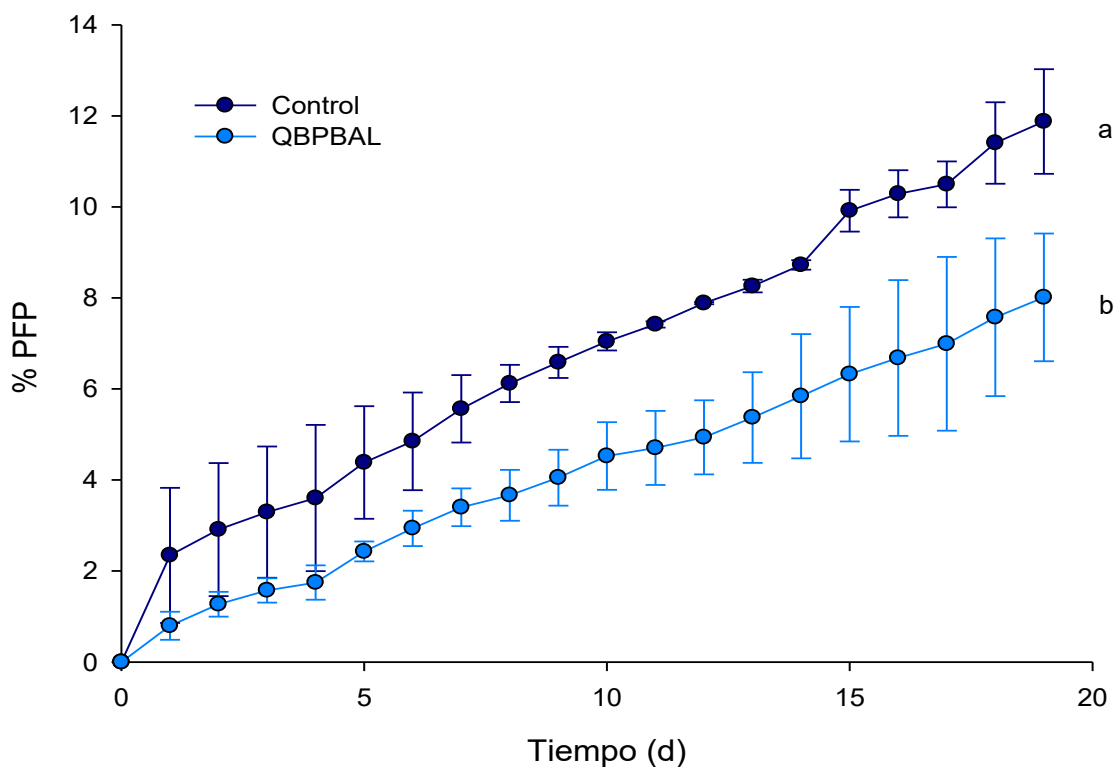


Fig. 12 PFP determinado en litchis tratados con el recubrimiento y el control almacenados a 10 °C y HR 75 %. Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.05$).

El % PFP al final del bioensayo para la fruta con recubrimiento Q-βP-BAL fue de 8.01 ± 1.40 % mientras que para el control fue 11.87 ± 1.14 %. De acuerdo a lo reportado por Téllez (2014) la PFP fue del 10 % utilizando recubrimientos de quitosano biológico y comercial, el quitosano por sí mismo es empleado para formar barreras semipermeables que evitan la PFP en frutas. El recubrimiento Q-βP-BAL muestra valores menores a lo reportado por Nicio (2012) PFP 13 % y Martínez-Castellanos et al. (2011) PFP 12 %.

8.3.1.2 Cambio de color en el pericarpio

En la Fig.13 se observan las imágenes tomadas durante el bioensayo. Las frutas tratadas con Q-βP-BAL presentan mayor calidad visual con respecto a la fruta sin tratamiento al día 14.

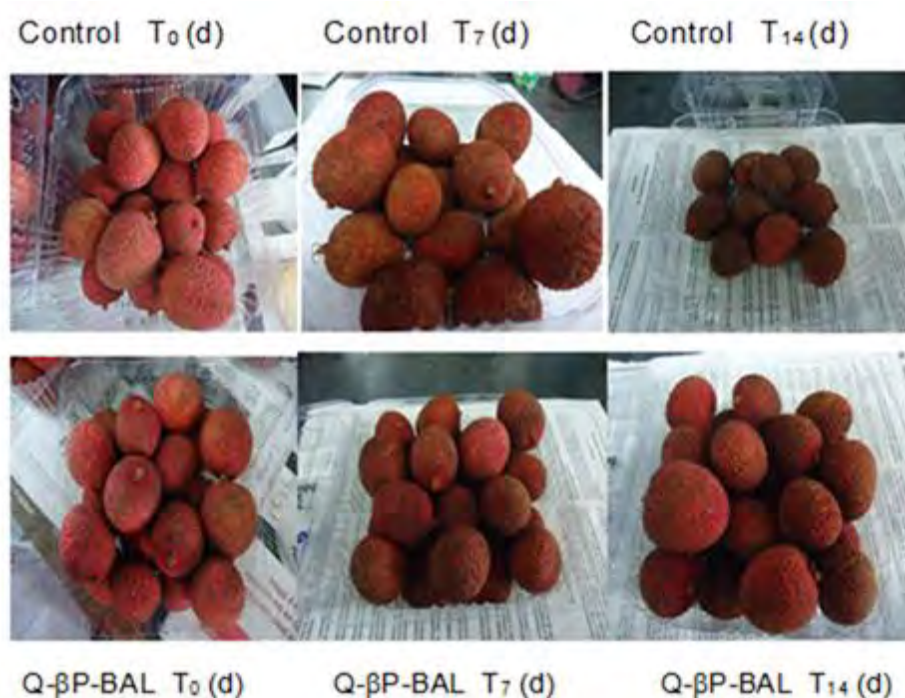


Fig. 13 Calidad visual del litchi tratados con Q-βP-BAL y control. Fotos tomadas en los días 0,7 y 14 de almacenamiento a 10°C y HR 75 %

Con respecto al cambio en la calidad de color determinada por sistema colorimétrico, se observa que la luminosidad (L^*) disminuye con el paso de los días, tornando las frutas opacas.

Los valores de L^* determinados para el control ($L^* 35.12$) y Q- β P-BAL ($L^* 35.67$), no presentan diferencia significativa al final de bioensayo, estos valores son mayores a lo reportado por Martínez-Castellanos (2009), L^* (25). El matiz (h^*) fue determinado para el control ($h^* 26.33$) y para el recubrimiento ($h^* 27.17$), del mismo modo no presentan diferencia significativa, el resultado se puede atribuir a la calidad inicial de la fruta empleada para el bioensayo.

Con respecto a croma (C^*) al día 14 existe una diferencia significativa entre el recubrimiento C^* (33.60) y el control C^* (31.97), el ácido láctico producido por los microorganismos ejerce un efecto protector sobre las antocianinas, manteniendo el color rojo en el pericarpio, los resultados son mejores a lo reportado por Martínez-Castellanos et al. (2011) quienes determinaron un decremento progresivo en la saturación del color de $C^* 30$ a $C^* 23$ al final de su trabajo experimental. (Fig. 14).

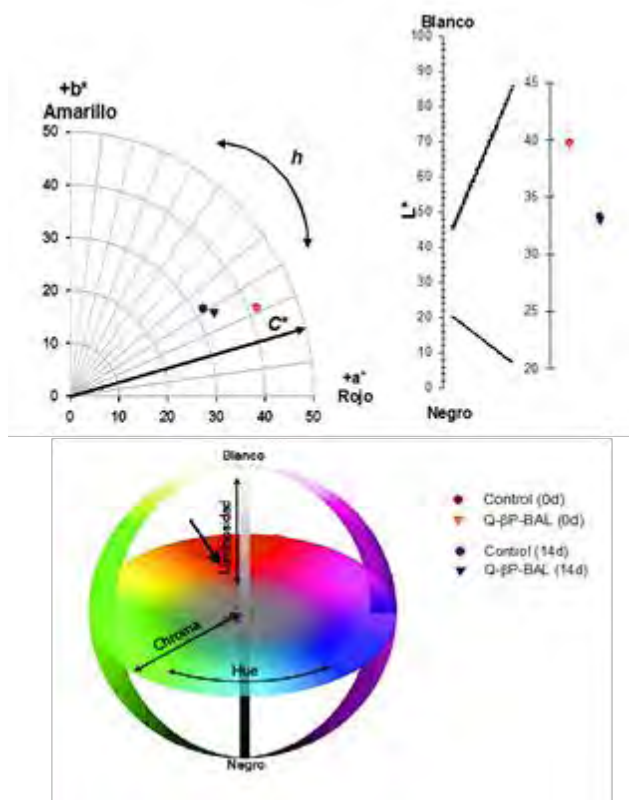


Fig. 14 Cambio en la calidad de color CIE (C^* , L^* , a^*) sistema colorimétrico, durante el almacenamiento de los litchis tratados con el recubrimiento y control, almacenados a 10 °C y HR 75 %.

8.3.1.3 Determinación de antocianinas

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles que le otorgan al litchi su color rojo brillante característico, los resultados obtenidos de concentración de antocianinas por HPLC se muestran en la Fig. 15.

De acuerdo a lo descrito por Lee (1991), el pericarpio de litchi contiene siete tipos de antocianinas: cianidina-3-rutinósido la más abundante, seguida de cianidina-3-glucósido, cianidina-3-galactosidasa, malvidina-3-acetilglucósido, pelargonidina-3-glucósido y quercetin-3-rutinósido. Las antocianinas se encuentran disueltas en la savia vascular de la célula vegetal, que es ligeramente ácida.

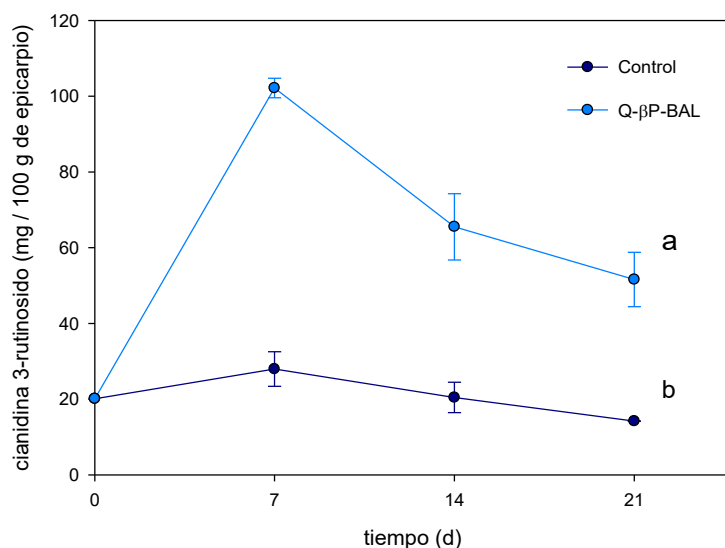


Fig. 15 Concentración de cianidina-3-rutinósido determinado en el pericarpio de litchi almacenado a 10°C y HR 75 %

El recubrimiento aplicado muestra diferencias significativas a los 7 y 14 días, se observa que el ácido láctico producido *in situ* tiene un efecto protector sobre los pigmentos, esta descrito que a pH < 3 las antocianinas permanecen estables, lo que también se relaciona con los resultados presentados en la Tabla 4. Durante el mismo periodo de tiempo, la viabilidad de BAL prevalece, las antocianinas permanece estables como catión flavilo, prevaleciendo así el color rojo (Martínez-Castellanos et al. 2011).

Caso contrario al control, la rápida desecación que sufre el pericarpio del litchi provoca que las vacuolas que contienen los pigmentos se deterioren. A pH más alto, la antocianina se convierte a una forma incolora (carbinol), las antocianinas se vuelven inestables, por lo que pueden ser degradadas enzimática o no enzimáticamente (Sivakumar, 2006).

De acuerdo a lo descrito por Y. M. Jiang & Fu (1999) los litchis almacenados sin tratamiento a 60 y 70 %HR perdieron el color rojo después 2 días de almacenamiento, en la Fig. 15 observamos un comportamiento similar a lo ya descrito, la concentración de antocianinas disminuye de forma significativa.

Tabla 5. Características de calidad de los litchis almacenados a los 14 días a 10°C y HR 75 %

Tratamiento	ATT (%)	STT (°Brix)	pH	Fenoles
Control	0.19±0.07 a	18.5 ± 0.5 a	4.68± 0.21 a	71.61± 6.01a
Q-βP-BAL	0.18±0.06 b	18.36± 0.6 a	4.80± 0.26 b	72.0± 6.82 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($\alpha < 0.05$)

La concentración de sólidos solubles totales (SST) en la pulpa es una estimación del contenido de azúcar en la fruta y la calidad comestible de la misma. Los valores obtenidos, 18.5± 0.5°Brix con respecto al control y 18.36± 0.56 °Brix para el recubrimiento, se encuentran dentro del intervalo estimado 18 y 20 °Brix (FAO). Los resultados obtenidos son menores a lo descrito Martínez-Castellanos et al. (2011) quienes reportaron 18.96± 0.20 °Brix para el control, y 18.6 ± 0.30 °Brix para la fruta con *L. plantarum*, esto depende de la especie de litchi y la calidad inicial de la fruta utilizada para el análisis (Nicio, 2012).

En los frutos no climatéricos el contenido de SST aumenta, mientras que los valores de acidez total titulable (ATT) disminuyen. Durante el periodo de maduración los ácidos orgánicos disminuyen a medida que se utilizan como sustratos para la respiración. El agotamiento de dichos ácidos se acompaña de una disminución en el contenido de almidón y un aumento de los azúcares responsable de la dulzura en los frutos.

Paull et al. (1984) describen la presencia de ácido málico en litchis maduros, los valores obtenidos de ATT se encuentran dentro de lo especificado para litchi especie Mauritius' y 'Brewster' (0.2 a 1.1) % de ácido málico, al igual que el pH (4.7-5.1).

8.3.1.4 Micrografías electrónicas de barrido del pericarpio de litchi con el recubrimiento Q- β P-BAL

Underhill & Simons (1993) describieron el pericarpio de litchi como una estructura leñosa y continua de 1-3 mm de espesor, la superficie del pericarpio se compone de segmentos y protuberancias de textura áspera (Fig. 16 a y b).

Los análisis por SEM mostraron que el recubrimiento se distribuyó sobre la superficie del pericarpio (Fig. 16 c y d), el recubrimiento con *L. plantarum* se encuentra sobre la superficie de la fruta, adhiriéndose en la superficie irregular del litchi (Fig. 16 d y e), lo que pudiera aumentar la viabilidad del microorganismo, fungiendo como protección.

Al día 14 (Fig. 16 f) del bioensayo se observan algunas estructuras globulares y pequeños agregados esto puede atribuirse a la que pectina y β -lactoglobulina empleados en el recubrimiento.

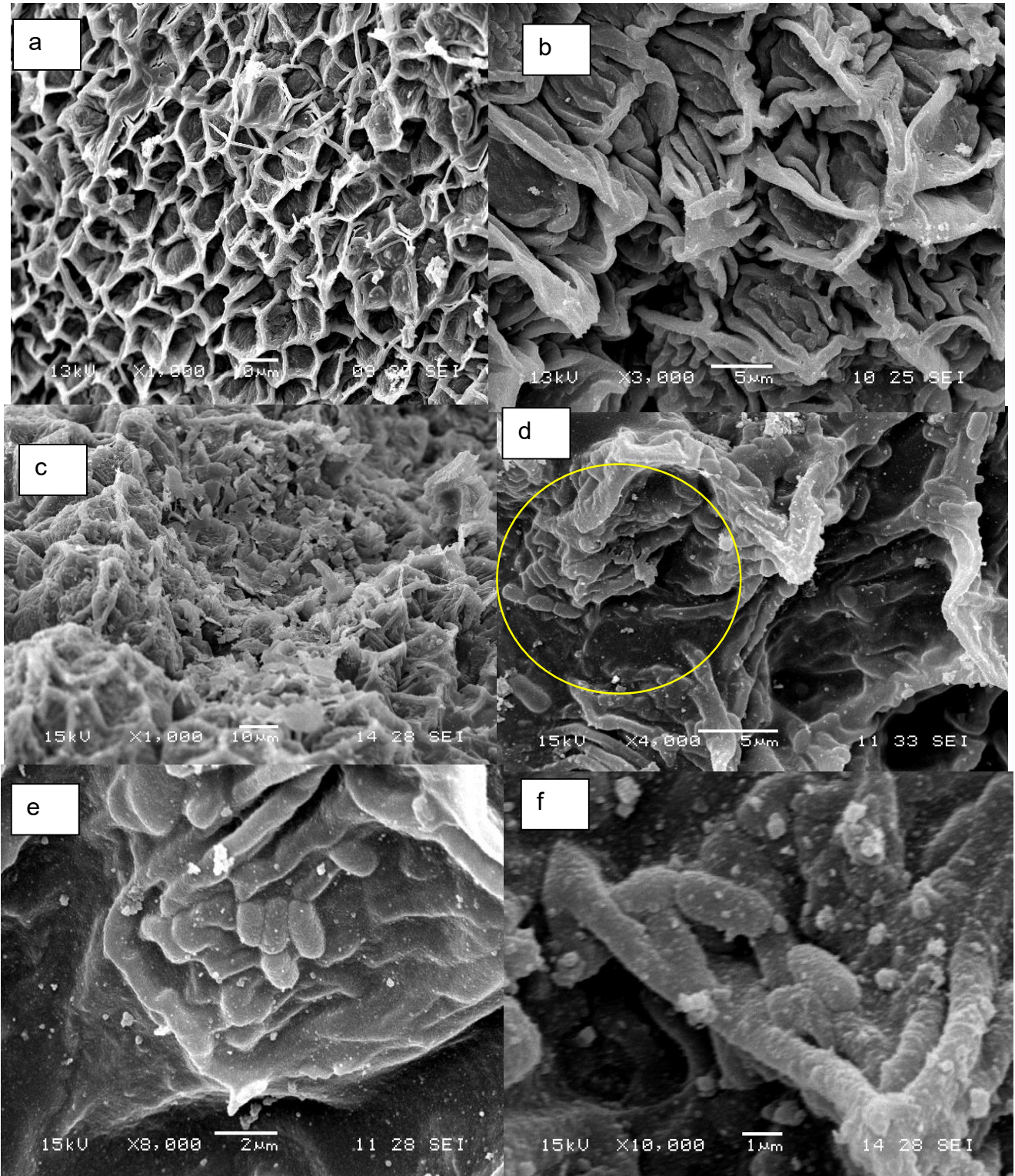


Fig. 16 Micrografías obtenidas por Microscopía electrónica de Barrido (MEB) a 1000, 3000, 4000, 8000 y 10000X aumentos. En la imagen a se muestra la superficie del litche almacenado a 10°C y HR 75 %; a y b (control), c y d superficie de litche con el recubrimiento Q-βP-BAL; e litche t (0); f litche t (14).

8.3.1.5 Recuperación de BAL viables en litchi

Martínez-Castellanos et al. (2011) reportaron la viabilidad de *L. Plantarum* durante 20 días a una temperatura de 10°C y HR 75 %. Mediante la determinación por fluorescencia, se confirmó la viabilidad de BAL en las mismas condiciones de almacenamiento.

Por otro parte, la viabilidad del microorganismo en el pericarpio de litchi, se observa en la (Fig. 17) Yang et al. (2006) encontraron que el pericarpio de litchi posee polisacáridos de carga neutra compuestos principalmente por 65,6% manosa, 33,0% de galactosa y 1,4% arabinosa, que sirven como fuente de carbono para los microorganismos, además la matriz polimérica en la que se encuentran embebidos podría ejercer un efecto protector.

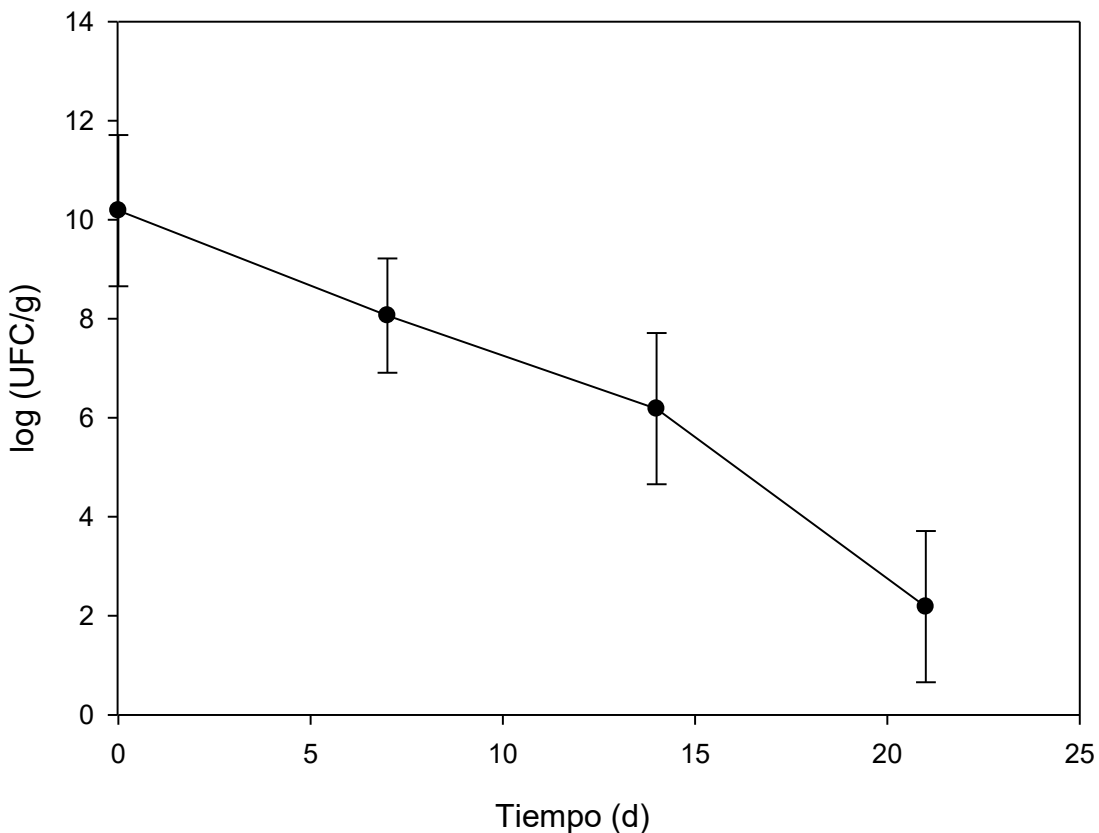


Fig. 17 Recuperación de BAL en frutos de litchi almacenados a 10°C y HR 75 %. Siembra en placa por extensión en agar MRS.

8.3.2 Bioensayo rambután

De acuerdo a los resultados obtenidos con el recubrimiento Q- β P-BAL en litchi, se decidió comparar el efecto que tendría la BAL libre, Q5 y Q- β P en el bioensayo 2.

8.3.2.1 Pérdida Fisiológica de Peso (PFP)

El análisis estadístico determinado para la PFP, no se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos. La PVA reportada anteriormente para el gradiente de HR 75% de la misma forma no mostró diferencia significativa. Con este gradiente de humedad se evita la pérdida acelerada de agua en rambután. Los recubrimientos: Q5, Q- β P-BAL y Q- β P, funcionaron como una barrera que evitó la pérdida de vapor de agua. Martínez-Castellanos et al. (2009) determinaron que los frutos tratados con BAL presentaron valores más bajos de PFP. Este resultado lo atribuyen al desarrollo de los lactobacilos sobre el pericarpio, dado que los microorganismos metabólicamente activos podrían secretar exopolisacáridos que generarían un efecto protector sobre la fruta.

Wall et al. (2011) indicaron que la temperatura óptima de almacenamiento en rambután es de 8-10 °C, igualmente encontró que el incremento en la respiración durante el almacenamiento estaba directamente relacionada con las condiciones de temperatura y la HR.

8.3.2.2 Cambios de color en el pericarpio de rambután

En la Fig. 18 se observa que el cambio de color durante el bioensayo, al día 7 de almacenamiento se observa que la fruta aún mantiene su color, las condiciones de almacenamiento propuestas resultaron favorables para la conservación de los frutos.

Al día 14 se observó que los espiternos de la fruta comienzan a oscurecerse, estas estructuras son más vulnerables a la deshidratación, lo que provoca el cambio de color en los mismos, se ha descrito que la cantidad de PO y PPO en estas estructuras es mayor que en el pericarpio (Wall et al. 2011), la coloración sobre el pericarpio de las frutas con los tratamientos: BAL, Q5, Q- β P-BAL y Q- β P prevalece, la formación de recubrimientos evita la deshidratación.

Por otra parte se puede apreciar que los espiternos comienzan a oscurecerse, a medida que pasa el tiempo el pardeamiento progresa hacia la base de los filamentos y se extiende sobre el pericarpio.

Al final del bioensayo el rambután con Q-βP-BAL presenta mayor cantidad de zonas de coloración roja a diferencia de los demás tratamientos. Estas zonas pueden contener una gran carga de BAL viables que metabólicamente podrían encontrarse activadas, generando un pH ácido sobre la superficie del pericarpio en donde se encuentran.

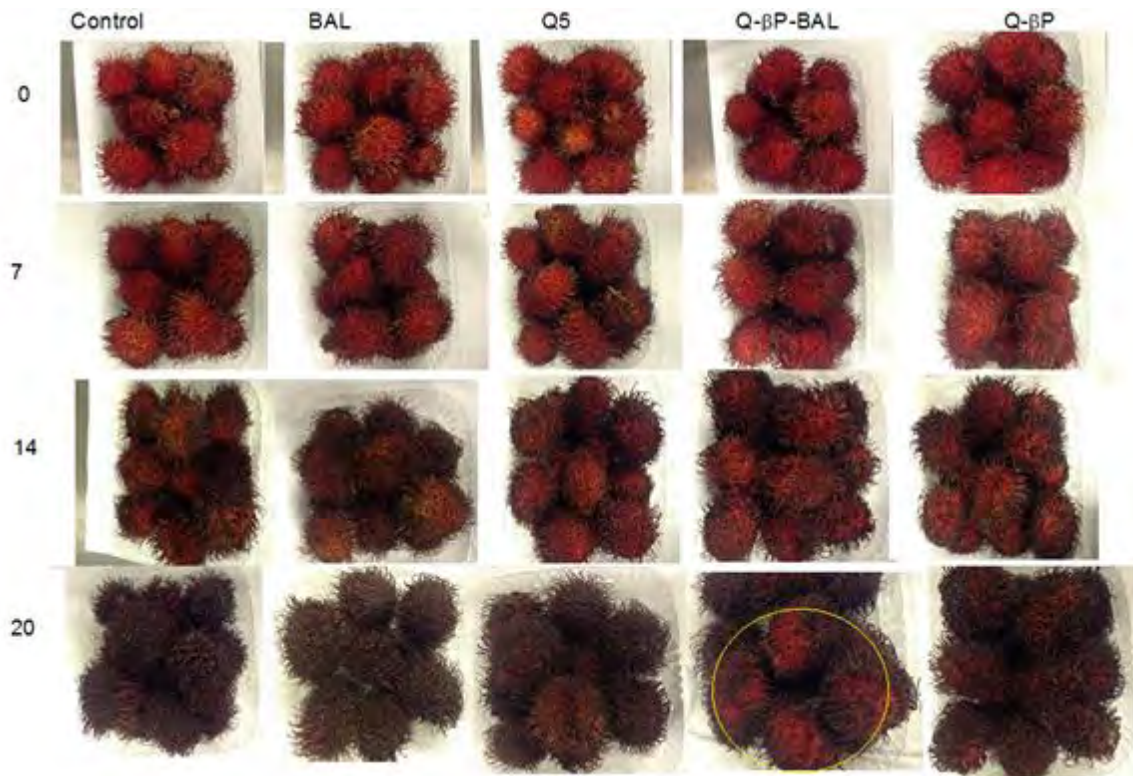


Fig. 18 Calidad visual del rambután tratados con los diferentes tratamientos empleados. Fotos tomadas en los días 0, 7,14 y 20, almacenados a 10°C y HR 75%

El control y la suspensión de BAL, presentaron contaminación por hongos al final del bioensayo, el efecto anti fúngico del quitosano en las mezclas poliméricas disminuyó la contaminación por fitopatógenos.

En la Fig. 19 se reporta los parámetros L^* , h^* y C^* determinados para los diferentes recubrimientos empleados. De acuerdo al análisis estadístico realizado los valores de L^* y h^* no son significativamente diferentes, mientras que el valor de C^* para el tratamiento Q- β P-BAL (C^* 32.24), presenta diferencias significativas con respecto a los demás recubrimientos, el análisis se realizó en las zonas de mayor coloración para todos los tratamientos.

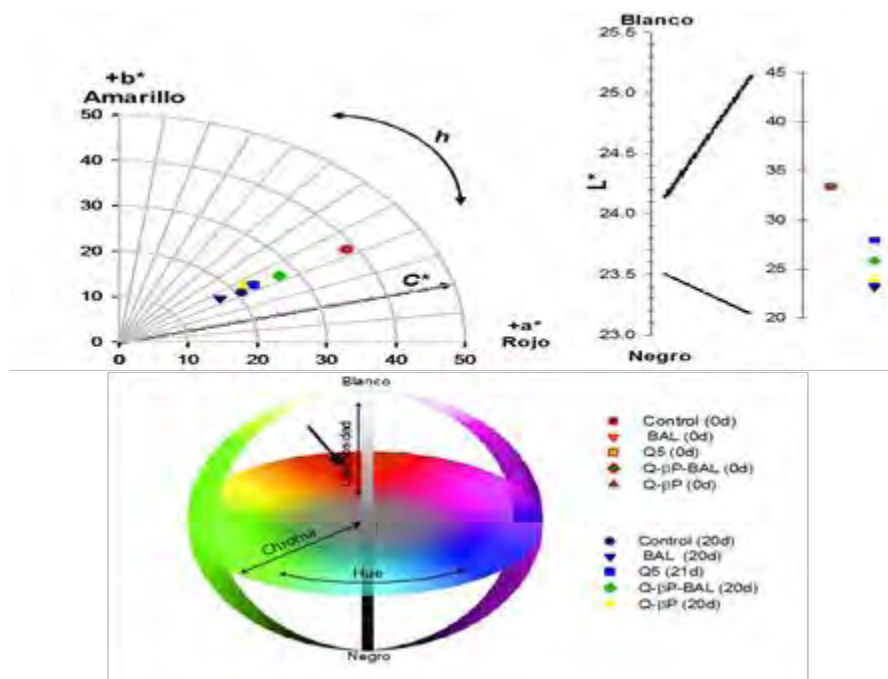


Fig. 19 Cambio en la calidad de color CIE (C^* , L^* , a^*) sistema colorimétrico, durante el almacenamiento del rambutám tratados con el recubrimiento y control, almacenados a 10 °C y HR 75 %.

8.3.2.3 Antocianinas

La aplicación de *L. plantarum* en el recubrimiento polimérico Q- β P tiene un efecto sobre la degradación de las antocianinas (Fig. 20 y 21) a diferencia de los recubrimientos sin BAL, de acuerdo a lo reportado por Martínez-Castellanos et al. (2009,2011) los microorganismos ejercen un efecto sobre las antocianinas a las mismas condiciones de almacenamiento.

La concentración de cianidina-3-rutinósido (Fig. 20) determinada para el pericarpio de rambután muestra que el recubrimiento Q- β P-BAL y BAL estabiliza la degradación de las antocianinas. A los 7 días existe una cantidad importante de dichos pigmentos, esto podría atribuirse a la gran cantidad de microorganismos que se encuentran activos (Fig. 26), el ácido láctico que se produce *in situ* favorece la forma estable de las antocianinas como catión flavilo.

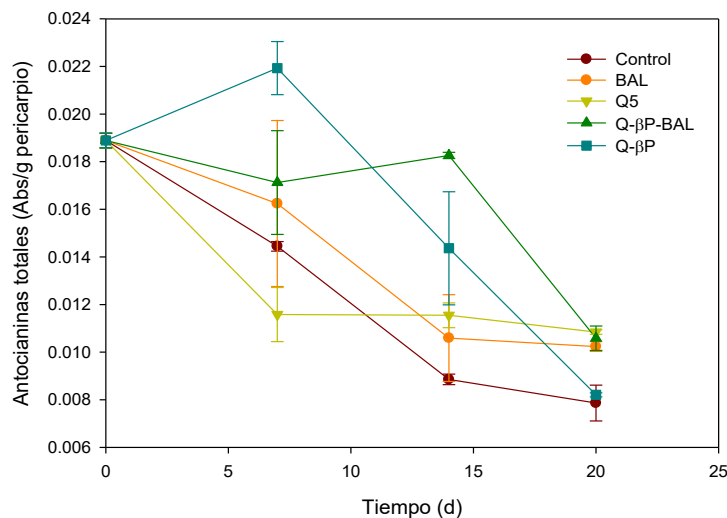


Fig. 20 Antocianinas totales medias por absorbancias (A/g pericarpio) en rambután almacenados a 10 °C y HR 75 %

Al tiempo final del bioensayo se observa que las antocianinas determinadas por HPLC en el tratamiento Q- β P-BAL, resultan significativamente diferentes del resto de los tratamientos, esto atribuido a la viabilidad determinada en el recubrimiento por el método de fluorescencia y cuenta en placa. Además de la protección que brindan los biopolímeros empleados para su microencapsulación, mismos que contribuyen a la estabilidad, para evitar la degradación de las antocianinas en contraste al uso de la suspensión de BAL, en este trabajo presentó contaminación por fitopatógenos, que podrían afectar la viabilidad de la bacteria inhibiendo su desarrollo.

El Q5 y el control presentan un comportamiento similar, mostrando la pérdida de pigmentos al final del estudio (Fig. 19 y 20). En varios trabajos se ha descrito que el quitosano tiene la capacidad de formar recubrimientos con baja permeabilidad al vapor de agua, este biopolímero puede ser una alternativa para evitar el deterioro en las frutas (Ravi Kumar 2000; Rinaudo 2006).

De acuerdo a los resultados obtenidos el quitosano presentó mejores propiedades que cuando se agregó el microorganismo láctico, resultados similares se han descrito por Téllez (2014).

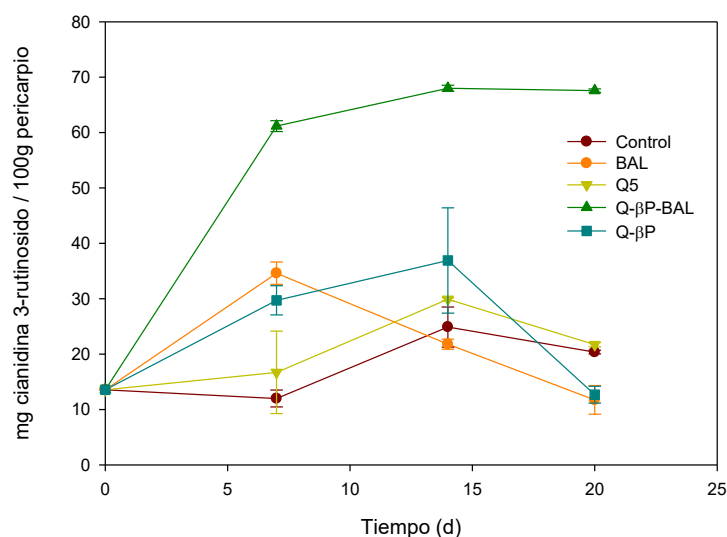


Fig. 21 Concentración de cianidina-3-rutinósido determinada en los pericarpios de rambutanes almacenados a 10 °C y HR 75 %

Simpson et al. (1976) propusieron dos posibles mecanismos para la degradación no enzimática de antocianinas: la hidrólisis de los enlaces 3 - glucosídico para producir la aglicona más lábil, y la apertura hidrolítica del anillo de pirilio para formar una chalcona sustituida, este comportamiento se observó en los recubrimientos.

A medida que el pardeamiento se incrementa en el rambután, el contenido de fenoles se comporta de manera similar provocado la oxidación fenólica, en la (Fig. 22) se observa que el comportamiento general de los tratamientos fue la disminución de dichas estructuras, lo cual resulta favorable, ya que al interactuar las enzimas con los compuestos fenólicos, estos se degradan, con lo que puede prevalecer el color.

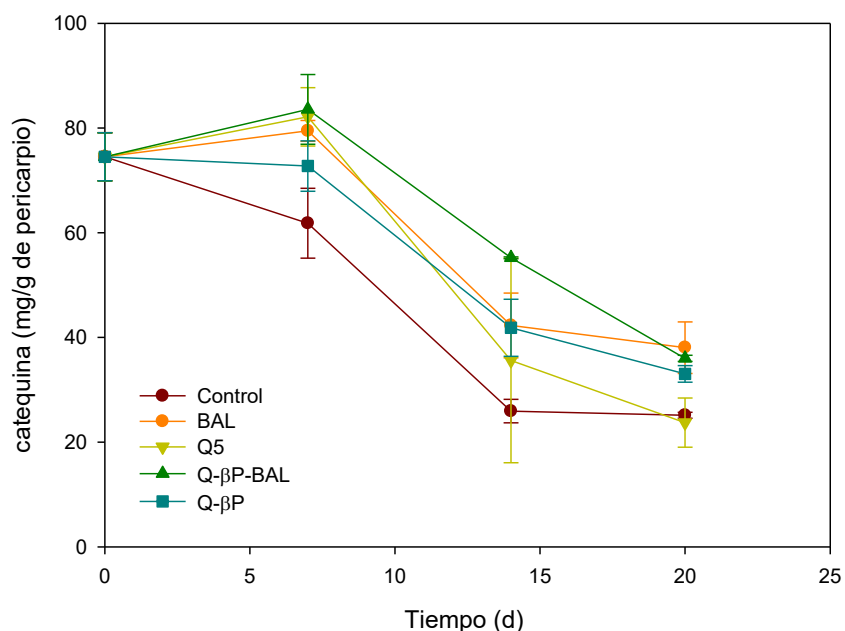


Fig. 22 Concentración de fenoles determinada en los pericarpios de los rambutanes almacenados a 10 °C y HR 75 %

Srisornkompon et al. (2013) establecen que el quitosano puede estimular la producción de fenilalanina amonio liasa, que es de gran importancia en la producción de catequinas, Téllez (2014) obtuvo mayor producción de fenoles en el tratamiento con Q5 g/L y BAL, en la Fig. 22 se observa que los tratamientos con Q5 al día 7 presentan mayor cantidad de fenoles, la disminución en la concentración de fenoles podría disminuir la oxidación de las antocianinas.

8.3.2.4 Características del jugo de rambután

El sabor atractivo en el rambután resulta del equilibrio entre los azúcares y ácidos presentes en el arilo. El rambután maduro contiene de 17 a 21% de SST y de 0.18 a 0.55% de ATT con un intervalo de pH de 4.25 a 4.60, estos valores varían de acuerdo a la especie y la zona de cultivo (Kosiyachinda et al. 1987).

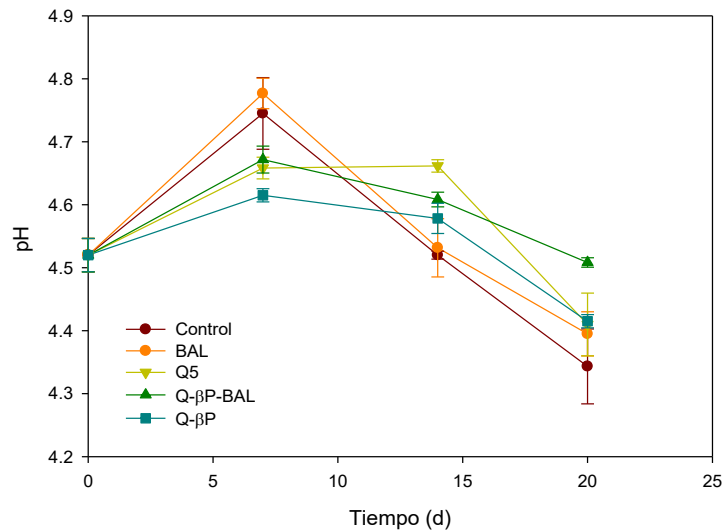


Fig. 23 Cambios de pH determinado en el jugo de los rambutanes almacenados a 10 °C y HR 75 %

Se determinó el pH (Fig. 23), SST (Fig. 24) y el ATT (Fig. 25) en el jugo de rambután, se observó que el pH disminuyó conforme avanza el tiempo, para el día 20 el pH se mantiene dentro del intervalo establecido, lo que indica que los recubrimientos no afectan la calidad sensorial de la fruta.

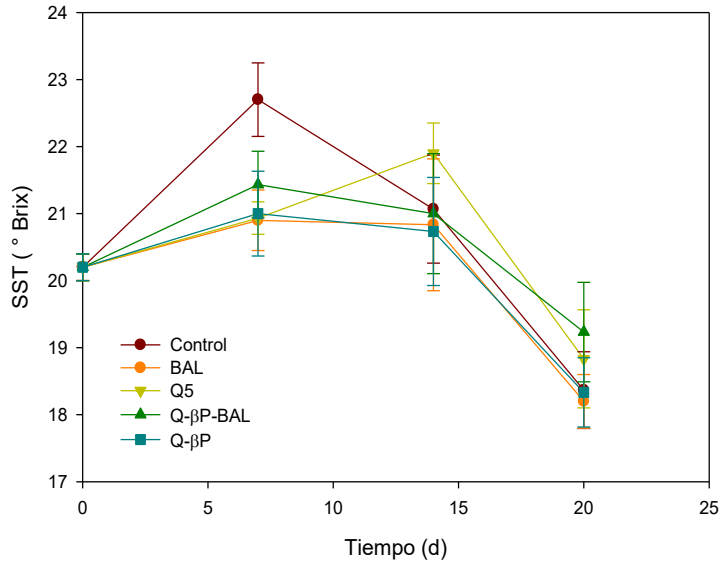


Fig. 24 Cambios de SST determinado en el jugo de rambután, almacenados a 10°C y HR 75 %
 Se observó que al final del bioensayo los valores obtenidos se encuentran dentro de lo estimado, la disminución de pH y SST hablan del proceso natural de senescencia de las frutas.

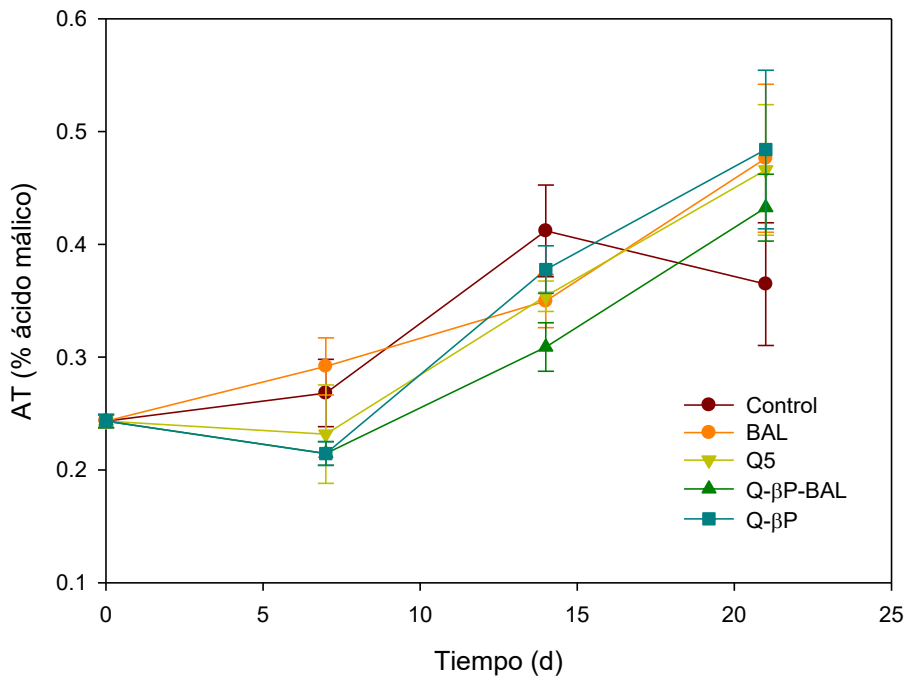
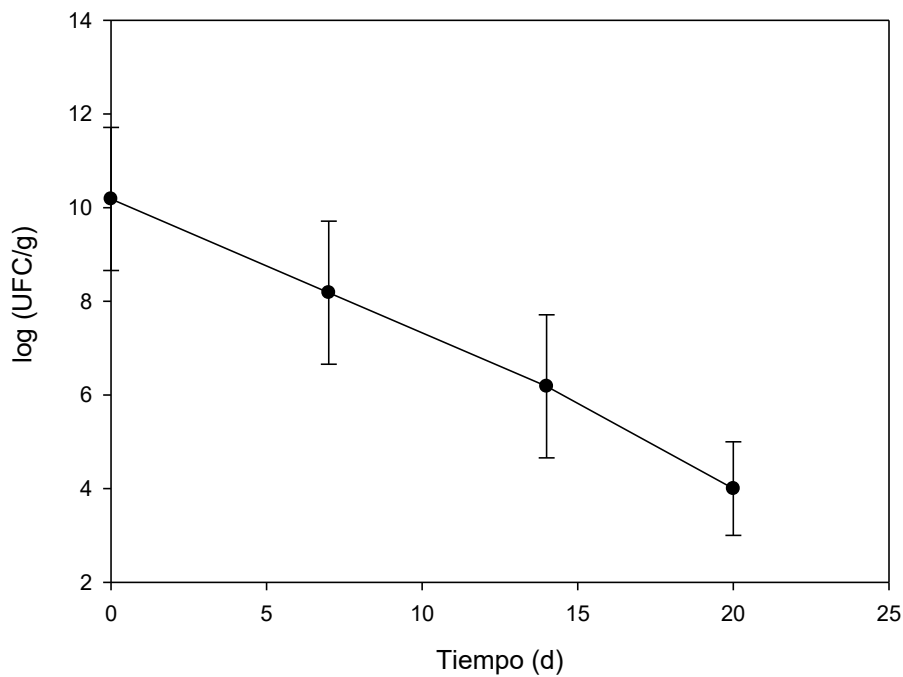


Fig. 25 ATT determinada en el jugo de rambután, almacenados a 10°C y HR 75 %

A medida que el pH disminuye la ATT aumenta, el ácido málico presente en el rambután es de 0.18 a 0.55 %, atribuido nuevamente a la variedad y especie de la fruta.

8.3.2.5 Recuperación de BAL viables en rambután

En la Fig. 26 se observa una gran cantidad de bacterias en el recubrimiento al inicio del bioensayo. Kondo et al. (2002), identificó; ramnosa, arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa en el pericarpio de rambután, tal como lo describen Martínez-Castellanos et al. (2009), estos monosacáridos pueden apoyar el crecimiento microbiano.



Col 1 vs Col 2
Fig. 26 Recuperación de BAL en frutos de rambután almacenados a 10°C y HR 75 %. Siembra en placa por extensión en agar MRS.

8.3.2.6 Micrografías electrónicas de barrido del pericarpio de rambután con el recubrimiento Q- β P-BAL

En la Fig. 27 (a y b) se observa la morfología irregular del rambután, las estructuras características denominadas espiternos se encuentran recubiertos. El tratamiento Q5 y Q- β P forman recubrimientos homogéneos sobre la superficie del fruto. Como se observa en la micrografía el recubrimiento Q- β P-BAL forma una superficie lisa y homogénea sobre el cual los microorganismos lácticos se encuentran microencapsulados Fig. 26 (c y d), al inicio del bioensayo existe una gran cantidad de bacilos cortos los cuales se encuentran embebidos en la matriz polimérica Fig. 27 (e).

Al final del bioensayo Fig. 27 (f) se observan estructuras globulares y pequeños agregados, los que podrían relacionarse con la pectina y la β -lactoglobulina empleados en la preparación del recubrimiento. Se observa que la cantidad de microorganismos disminuye, además se ve la presencia de un segmento de hifa, indicando el inicio de contaminación por fitopatógenos al día 20 del bioensayo.

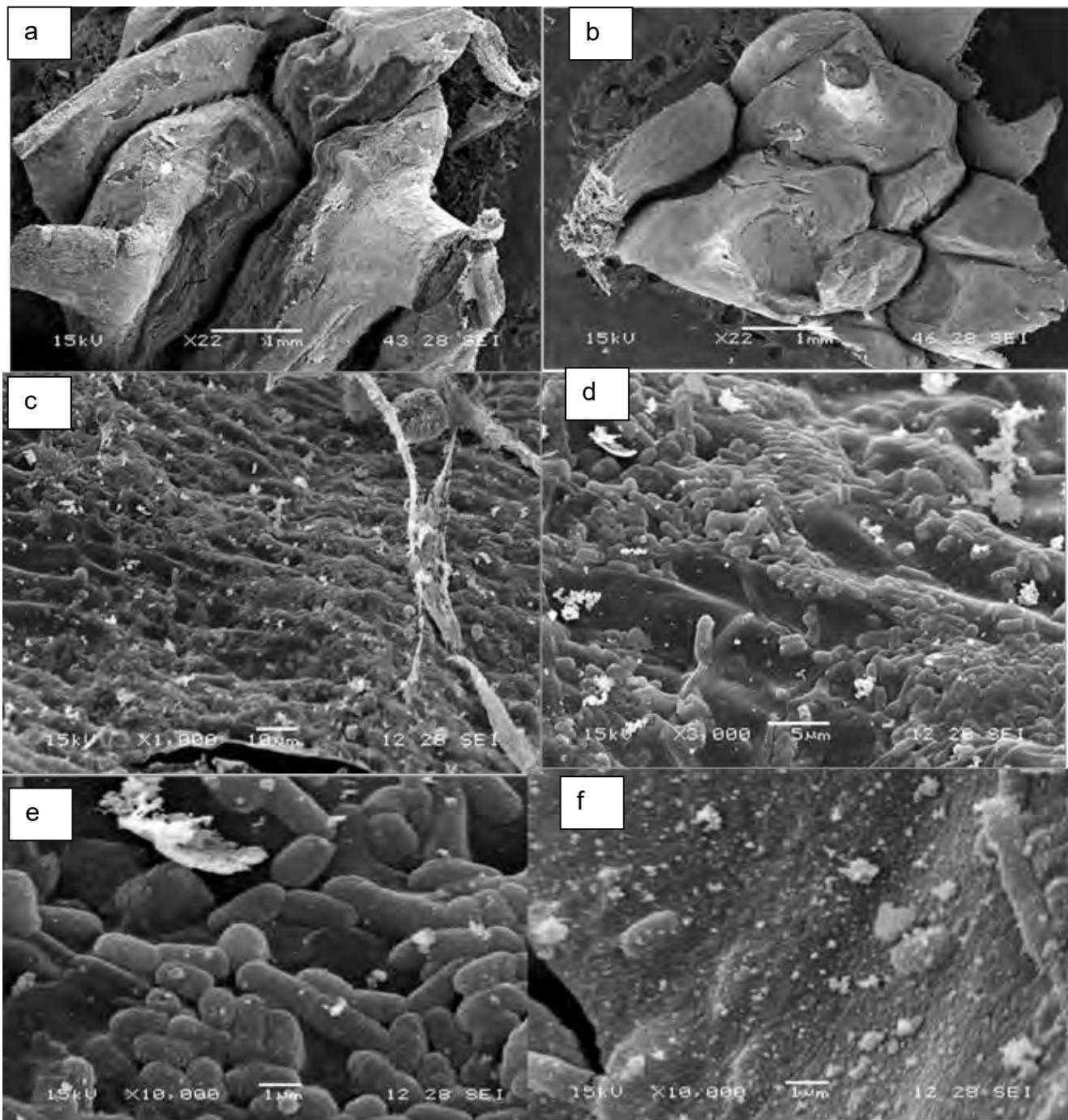


Fig. 27 Micrografías obtenidas por Microscopia electrónica de Barrido a 10,000 X de la superficie de rambután almacenado a 10°C y HR 75%; a Q5, b Q-βP; c y d Q-βP-BAL, e rambután Q-βP-BAL t (0); f rambután Q-βP-BAL t (20).

9 CONCLUSIONES

La fermentación ácido láctica es un proceso adecuado para la obtención de quitina, permite recuperar productos de alto valor agregado tales como pigmentos, proteínas y CaCO_3 a partir de desecho de camarón.

En su evaluación como recubrimiento, el mejor tratamiento fue Q- β P-BAL el cual preservó el color rojo en litchi durante 14 días y en rambután durante 20 días. La combinación de biopolímeros empleados en la elaboración del recubrimiento Q- β P-BAL, permitió la viabilidad *L. plantarum*, dicho microorganismo logró estabilizar la degradación de las antocianinas debido a la acidificación *in situ* del pericarpio.

Las condiciones de almacenamiento propuestas 10°C y HR 75%, ralentizaron la deshidratación de las frutas con lo que se redujo la pérdida en la calidad visual, además de conservar las características poscosecha en las mismas.

10 BIBLIOGRAFÍA

A.O.A.C., (1990). *Official Methods of Analyses of the Association of Official Analytical Chemists*. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Abdel-Rahmana, M., Rasha, M., Radim, A., Abdel-Mohsen, C., Moustafa M., Foudac, A., Solimand, F., Mohamedd, K. (2015). Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 80, 107–120.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1998). Toxicological Profile for Sulfur Dioxide.

Aguas-atlahua, A., García-pérez, E., & Trinidad-santos, O. R. A. (2014). Calidad de fruto de litchi (*litchi chinensis* sonn.) producido en el estado de Veracruz, México fruit quality of lychee (*litchi chinensis* sonn.) produced in Veracruz state, México, 37(4), 373–380.

Aguirre-Loredo, A., Rodríguez-Hernández, B., Eduardo Morales-Sánchez, A., Gómez-Aldapa, C. (2016). Effect of equilibrium moisture content on barrier, mechanical and thermal properties of chitosan films. *Food Chemistry* 196, 560–566.

Badui D.S. Química de alimentos. 5ra edición. México. Alhambra Mexicana, 2006.

Barrera, J. y Shirai, K. (2010). Informe final. Validación tecnológica del proceso biológico químico para obtención de quitina, quitosano, pigmentos, hidrolizados proteicos y calcio a partir de desechos de crustáceos”. Programa de Vinculación Productiva en su componente de Desarrollo Tecnológico. (Reconversión Productiva). SAGARPA.

Benkeblia, N., Tennant, D. P. F., Jawandha, S. K., & Gill, P. S. (2011). Preharvest and harvest factors influencing the postharvest quality of tropical and subtropical fruits. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Woodhead Publishing Limited.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª edición. Prentice-Hall. Madrid, 2004.

Caro, Y., & Joas, J. (2005). Postharvest control of litchi pericarp browning (cv. Kwai Mi) by combined treatments of chitosan and organic acids. *Postharvest Biology and Technology*, 38(2), 137–144.

Chakravorty, M. (2010). *Lactobacillus Plantarum*.

Cho Y. I., No H. K., Meyers S. P. (1998). Physicochemical Characteristics and Functional Properties of Various Commercial Chitin and Chitosan Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (46), 3839–3843.

Cira, L., Huerta, S., Hall, G. M., & Shirai, K. (2002). Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry*, 37(12), 1359–1366.

Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Gallo, M., Speranza, B., & Sinigaglia, M. (2013). Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*: Performances and in vivo applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, (18), 196–201.

Depósito de documentos de la FAO. Las frutas y hortalizas frescas como productos perecibles. [En línea] (Actualizado a cierre de año de 2007).

Disponible en:

[http://www.fao.org/docrep/x5055s/x5055S02.htm#Fisiologia de frutas y hortaliza](http://www.fao.org/docrep/x5055s/x5055S02.htm#Fisiologia%20de%20frutas%20y%20hortaliza)

Espitia, P. J. P., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. D. J., Soares, N. D. F. F., & McHugh, T. H. (2014). Edible films from pectin: Physical-mechanical and antimicrobial properties. A review. *Food Hydrocolloids*, (35), 287–296.

Fabra, M. 2014. Biopolymers and Food Packing Applications. En: M. Fabra, A. López Rubio, J. Lagaron. *Smart Polymers and their Applications*. España: Woodhead, 476-509.

Fennema, O.R. Introducción a la ciencia de los alimentos. 1era Edición. España. Reverté. 1993.

Garcés, F., Hernández, M. (2010). La lluvia ácida un fenómeno fisicoquímico de ocurrencia local. *Revista Lasallista de Investigación*, 1(2), 67-73.

Garz, G. A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: *Revisión*. *Acta Biol. Colomb.*, 13(3), 27–36.

Gebara, C., Chaves, K. S., Ribeiro, M. C. E., Souza, F. N., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 51(2), 872–878.

Gebhardt, R., & Petkeviciute, I. (2014). β -Lactoglobulin films with spiral cracks. *Food Structure*, 1(2), 155–163.

Gibson GR, Roberfroid MB (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr*, (125): 1401-1412.

Gimeno. M, Ramírez, J., Martínez, C., Pacheco, N., García, R., Bázana. E., Shirai, K. 2007. One- Solvent Extraction Of astaxanthin from lactic acid fermented shrimp wastes. *J. Agric. Food Chem.*, (55), 10345-10350.

Girard, M., Turgeon, S. L., & Gauthier, S. F. (2002). Interbiopolymer complexing between β -lactoglobulin and low- and high-methylated pectin measured by potentiometric titration and ultrafiltration. *Food Hydrocolloids*, 16(6), 585–591.

Hare, T. J. O., Prasad, a, & Cooke, a W. (1994). Postharvest Biology and Techn ~ ogy Low temperature and controlled atmosphere storage of rambutan. *Postharvest Biology and Technology*, (4), 147–157.

Hernández, C., (2014). Microencapsulación de aceite de neem en quitosano, caracterización y evaluación in vivo. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.

Holcroft, D. M., & Mitcham, E. J. (1996). Postharvest physiology and handling of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Postharvest Biology and Technology*, (9), 265–281.

Hosseinian F., Li W y Beta T. 2008. Measurement of anthocianins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry*. 109, 916-924.

Instituto Nacional de Investigación Forestales, Agrícolas y Pecuarias, INIFAP. 2001. El litchi: Alternativa para la diversificación frutícola en la Huasteca Potosina. [En línea] (Actualizado a cierre de Octubre de 2001).

Disponible en:

<http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/792/117.pdf?sequence=1>

Jiang, Y., & Fu, J. (1999). Postharvest browning of litchi fruit by water loss and its prevention by controlled atmosphere storage at high relative humidity. *LWT-Food Science and Technology*, 32(5), 278–283.

Jiang, Y., Duan, X., Joyce, D., Zhang, Z., & Li, J. (2004). Advances in understanding of enzymatic browning in harvested litchi fruit. *Food Chemistry*, 88(3), 443–446.

Jiang, Y., Li, Y., & Li, J. (2004). Browning control, shelf life extension and quality maintenance of frozen litchi fruit by hydrochloric acid. *Journal of Food Engineering*, 63(2), 147–151.

Jiang, Y. M., & Fu, J. R. (1999). Postharvest Browning of Litchi Fruit by Water Loss and its Prevention by Controlled Atmosphere Storage at High Relative Humidity, 283, 278–283.

Jiang, Y., Yao, L., Lichter, A., & Li, J. (2003). Postharvest biology and technology of litchi fruit, 1(April), 76–81.

Joas, J., Caro, Y., Ducamp, M. N., & Reynes, M. (2005). Postharvest control of pericarp browning of litchi fruit (*Litchi chinensis* Sonn cv Kwaï Mi) by treatment with chitosan and organic acids. *Postharvest Biology and Technology*, 38(2), 128–136.

Jones, O. G., Decker, E. a., & McClements, D. J. (2009). Formation of biopolymer particles by thermal treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, 23(5), 1312–1321.

Jones, O. G., Lesmes, U., Dubin, P., & McClements, D. J. (2010). Effect of polysaccharide charge on formation and properties of biopolymer nanoparticles created by heat treatment of β -lactoglobulin–pectin complexes. *Food Hydrocolloids*, 24(4), 374–383.

Kader, a. a., & Yahia, E. M. (2011). Postharvest biology of tropical and subtropical fruits. *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Woodhead Publishing Limited.

Khem, S., Small, D. M., & May, B. K. (2016). The behaviour of whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum*. *Food Chemistry*, 190, 717–723.

Kosiyachinda S , Lam P , Mendoza D B Jr , Broto W and Wanichkul K. (1987), 'Maturity indices for harvesting of rambutan' , in Lam P F and Kosiyachinda S , Rambutan: Fruit Development, *Postharvest Physiology and Marketing in ASEAN*. ASEAN Food Handling Bureau , 32 – 38.

Kondo, S., Nimitkeatkai, H., Kanlayanarat, S. (2002). Cell wall metabolism during development of rambutan fruit. *Journal of Horticult. Sci. Biotechnol.* 77, 300–304.

Kumari, P., Barman, K., Patel, V. B., Siddiqui, M. W., & Kole, B. (2015). Reducing postharvest pericarp browning and preserving health promoting compounds of litchi fruit by combination treatment of salicylic acid and chitosan. *Scientia Horticulturae*.

Lacroix, M., & Vu, K. D. (2013). Edible Coating and Film Materials: Proteins. *Innovations in Food Packaging: Second Edition*. Elsevier Ltd.

Lacroix, M., & Vu, K. D. (2014). Edible Coating and Film Materials. *Innovations in Food Packaging*. Elsevier Ltd.

Landrigan, M., Morris, S. C., Eamus, D., & McGlasson, W. B. (1996). Postharvest water relationships and tissue browning of rambutan fruit. *Scientia Horticulturae*, 66(3-4), 201–208.

Lee, H. S., & Wicker, L. (1991). Quantitative changes in anthocyanin pigments of lychee fruit during refrigerated storage. *Food Chemistry*, (40), 263–270.

Liang, Y. S., Chen, N. L., & Ke, L. S. (2012). Influence of dipping in sodium metabisulfite on pericarp browning of litchi cv. Yu Her Pau (Feizixiao). *Postharvest Biology and Technology*, 68, 72–77.

López, M., (2013). Síntesis y caracterización de materiales con base en quitosano, obtenido mediante desacetilación heterogénea de quitina extraída por un método biológico. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.

Ma, C., Cheng, G., Liu, Z., Gong, G., & Chen, Z. (2016). Determination of the essential nutrients required for milk fermentation by *Lactobacillus plantarum*. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 884–889.

Mármol, Z., Páez, G., Rincón, M., Araujo, K., & Aiello, C. (2011). Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones Chitin and Chitosan friendly polymer. A review of their applications. *Revista Tcnocientífica URU*, 53–58.

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

Martínez-Castellanos, G., Pelayo-Zaldívar, C., Pérez-Flores, L. J., López-Luna, A., Gimeno, M., Bárzana, E., & Shirai, K. (2011). Postharvest litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) quality preservation by *Lactobacillus plantarum*. *Postharvest Biology and Technology*, 59(2), 172–178.

- Martínez-Castellanos, G., Shirai, K., Pelayo-Zaldívar, C., Pérez-Flores, L. J., & Sepúlveda-Sánchez, J. D. (2009). Effect of *Lactobacillus plantarum* and chitosan in the reduction of browning of pericarp Rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Food Microbiology*, 26(4), 444–449.
- Miranda, P., Cárdenas, G., López, D., Sagahon, L. (2003). Comportamiento de películas de quitosano compuesto en un modelo de almacenamiento de aguacate. *Revista de la Sociedad Química de México*. 4-47.
- Nicio, A., (2012). Síntesis y caracterización de películas de quitosano-cítrico-HPMC. México: Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química.
- Nussinovitch, A. (2013). Biopolymer Films and Composite Coatings. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*. Elsevier.
- Pacheco, N., Garnica-González, M., Ramírez-Hernández, J. Y., Flores-Albino, B., Gimeno, M., Bárzana, E., & Shirai, K. (2009). Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 100(11), 2849–54.
- Paull, R. E., Reyes, M. E. Q., & Reyes, M. U. (1995). Litchi and rambutan insect disinfestation: treatments to minimize induced pericarp browning. *Postharvest Biology and Technology*, 6(1-2), 139–148.
- Pérez-Gago, M.B., & Krotcha J.M., 1999. Water vapor permeability of whey protein emulsions films as affected by pH. *J Food Sci*, 64, 645-698.
- Piermaria, J., Diosma, G., Aquino, C., Garrote, G., & Abraham A. (2015). Edible Kefiran Films as Vehicle for Probiotic Microorganisms. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 32. 193–199.
- Pillai C, Paul W, Sharma C. (2009). Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*. (34), 641-678.
- Rajam, R., Karthik, P., Parthasarathi, S., Joseph, G. S., & Anandharamakrishnan, C. (2012). Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, 4(4), 891–898.
- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116(2), 369–381.
- Ravi Kumar, M. N. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1–27.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Prog. Polym. Sci.*, 31(7), 603–632.

Salgado, P. R., Ortiz, C. M., Musso, Y. S., Di Giorgio, L., & Mauri, A. N. (2015). Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science*, 5, 86–92.

Saltveit, M.E., 1997. Physical and Physiological changes in minimally processed fruits and vegetables. *Phytochemistry of fruits and vegetables*. Oxford University Press, New York. Pp. 205-220.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, SIAP 2014. Agricultura Producción Anual. [En línea] (Actualizado a cierre de año de 2014).

Disponible en:

<http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-cultivo/>

Shahidi, F., Arachchi, J. K. V., & Jeon, Y. J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology*, 10(2), 37–51.

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

Shrinvas, M., Stevens, W. (2005). Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal Chemistry Technology Biotechnology*., (80), 1080-1087.

Simpson, L., Lee, C., Rodriguez J., & Chichester, C. (1976), 'Metabolism in senescent and stored tissues'. *Chemistry and biochemistry of plant pigment*, 128 – 155.

Sivakumar, D., & Africa, S. (n.d.). Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: Volume 3: Cocona to mango. Woodhead Publishing Limited.

Sivakumar, D., & Korsten, L. (2006). Influence of modified atmosphere packaging and postharvest treatments on quality retention of litchi cv. Mauritius. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 135–142.

Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R., Wijesundera, R. L., & Abeyesekere, M. (2002a). Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde. *Crop Protection*, 21(9), 847–852.

Smithers, G. W. (2015). Whey-ing up the options – Yesterday, today and tomorrow. *International Dairy Journal*, 48, 2–14.

Sperber, B. L. H. M., Schols, H. a., Cohen Stuart, M. a., Norde, W., & Voragen, A. G. J. (2009). Influence of the overall charge and local charge density of pectin on the complex formation between pectin and β -lactoglobulin. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 765–772.

Srisornkompon, P., Pichyangura, R., Chadchawan, S., (2013) Chitin and Chitosan Research. (2) 130-149.

Sudharshan, N.R., Hoover, D., Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6, 257-272.

Téllez, L., (2014). Preparación, caracterización de recubrimientos de *Lactobacillus plantarum* con quitosano y su aplicación en la conservación de la calidad poscosecha de litchi y rambután. Tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.

Tharanathan, REC. (2003). Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology*, 14(3), 71–78.

Underhill, S. J. R., & Simons, D. H. (1993). Lychee (*Litchi chinensis* Sonn.) pericarp desiccation and the importance of postharvest micro-cracking. *Scientia Horticulturae*, 54(4), 287–294.

Van den Broek, L. a. M., Knoop, R. J. I., Kappen, F. H. J., & Boeriu, C. G. (2015). Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydrate Polymers*, 116, 237–242.

Wall, M. M., Sivakumar, D., & Korsten, L. (2011). Rambutan (*Nephelium lappaceum* L.). Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. Woodhead Publishing Limited.

Wang, Q., & Qvist, K. B. (2000). Investigation of the composite system of β -lactoglobulin and pectin in aqueous solutions. *Food Research International*, 33(8), 683–690.

Wongs-Aree, C., & Noichinda, S. (2014). *Chapter 10 - Postharvest Physiology and Quality Maintenance of Tropical Fruits. Postharvest Handling*. Elsevier.

Yahia, E. M., De Jesus Ornelas-Paz, J., & Elansari, a. (2011). Postharvest technologies to maintain the quality of tropical and subtropical fruits. Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits. Woodhead Publishing Limited.

Yingsanga, P., Srilaong, V., Kanlayanarat, S., Noichinda, S., & McGlasson, W. B. (2008). Relationship between browning and related enzymes (PAL, PPO and POD) in rambutan fruit (*Nephelium lappaceum* Linn.) cvs. Rongrien and See-Chompoo. *Postharvest Biology and Technology*, 50(2-3), 164–168.

Zauberman, G., Ronen, R., Akerman, M., Weksler, A., Rot, I., & Fuchs, Y. (1991). Post-harvest retention of the red colour of litchi fruit pericarp 1. *Scientia Hort.*, 47(2978), 89–97.

Zhang, D., & Quantick, P. C. (1997). Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit, 12, 195–202.

Zhang, Z., Pang, X., Xuewu, D., Ji, Z., & Jiang, Y. (2005). Role of peroxidase in anthocyanin degradation in litchi fruit pericarp. *Food Chemistry*, 90(1-2), 47–52.

Zheng, X., & Tian, S. (2006). Effect of oxalic acid on control of postharvest browning of litchi fruit. *Food Chemistry*, 96(4), 519–523.

11 ANEXOS

Análisis estadístico de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias LSD. PVA

PVA 90/75

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamieto	2	3.367732E-06	1.683866E-06	0.76	0.541824	0.100250
S	3	6.673764E-06	2.224588E-06			
Total (Adjusted)	5	1.00415E-05				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q- β P-BAL	2	2.52128E-03	
Q5	2	3.61556E-03	
Q- β P	2	4.344238E-03	

PVA 75/90

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	2	1.285853E-05	6.429264E-06	2.65	0.216913	0.229480
S	3	7.264806E-06	2.421602E-06			
Total (Adjusted)	5	2.012333E-05				
Total	6					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q- β P-BAL	2	1.577821E-03	
Q5	2	2.705541E-03	
Q- β P	2	5.089575E-03	

Análisis estadístico de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias LSD.

LITCHI

PFP

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	1	125.701	125.701	142.41	0.000000*	1.000000
B: tiempo	19	603.9078	31.78462	36.01	0.000000*	1.000000
AB	19	17.26042	0.9084432	1.03	0.452409	0.590345
S	40	35.3058	0.882645			
Total (Adjusted)	79	782.175				
Total	80					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q- β P-BAL	40	4.14125	Control
Control	40	6.64825	Q- β P-BAL

pH

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	1	7.520834E-02	7.520834E-02	16.58	0.000439*	0.974096
B: tiempo	2	1.645379	0.8226896	181.42	0.000000*	1.000000
AB	2	3.940416E-02	1.970208E-02	4.34	0.024527*	0.697123
S	24	0.1088333	4.534722E-03			
Total (Adjusted)	29	1.66612				
Total	30					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Control	15	4.680666	Q- β P-BAL
Q- β P-BAL	15	4.807333	control

Antocianinas HPLC cianidina 3- rutinosido

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: C1	1	4743.317	4743.317	236.81	0.000005*	1.000000
B: C2	2	4040.191	2020.095	100.85	0.000024*	1.000000
AB	2	2796.453	1398.227	69.81	0.000070*	1.000000
S	6	120.1793	20.02989			
Total (Adjusted)	11	11700.14				
Total	12					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
CONTOL	6	22.83661	Q-βP-BAL
Q-βP-BAL	6	62.59973	CONTOL

AT ácido málico (%)

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	1	1.38108E-03	1.38108E-03	9.52	0.005054*	0.841478
B: tiempo	2	0.1483763	7.418816E-02	511.60	0.000000*	1.000000
AB	2	8.169087E-03	4.084543E-03	28.17	0.000001*	0.999999
S	24	3.480321E-03	1.450134E-04			
Total (Adjusted)	29	0.1397874				
Total	30					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q-βP-BAL	15	0.1828051	control
Control	15	0.1999699	Q-βP-BAL

SST (° BRIX)

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	1	0.16	0.16	0.42	0.519952	0.096633
B: tiempo	2	1.121667	0.5608333	1.49	0.242488	0.291768
AB	2	0.215	0.1075	0.28	0.754168	0.090929
S	30	11.32333	0.3774444			
Total (Adjusted)	35	12.82				
Total	36					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q-βP-BAL	18	18.36667	
Control	18	18.5	

Fenoles (mg catequina/g pericarpio)

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	1	0.9264063	0.9264063	0.02	0.884812	0.052309
B: tiempo	2	43.72531	21.86266	0.50	0.609265	0.125750
AB	2	305.5916	152.7958	3.51	0.041000*	0.615893
S	34	1478.399	43.48232			
Total (Adjusted)	39	1926.63				

Total 40
 * Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Control	20	71.615	
Q-βP-BAL	20	72	

ANALISIS DE COLOR LITCHI

L*

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power α= 0.05
A: TRATAMIENTO	1	13.85433	13.85433	1.98	0.160393	0.289063
B: TIEMPO	2	1769.869	884.9343	126.50	0.000000*	1.000000
AB	2	13.59382	6.796912	0.97	0.379675	0.218262
S	294	2056.626	6.995328			
Total (Adjusted)	299	3523.106				
Total	300					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q-βP-BAL	150	35.1292	
CONTROL	150	35.67285	

a*

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power α= 0.05
A: TRATAMIENTO	1	18.75817	18.75817	1.11	0.292814	0.182835
B: TIEMPO	2	4851.01	2425.505	143.61	0.000000*	1.000000
AB	2	425.0026	212.5013	12.58	0.000006*	0.996375
S	294	4965.633	16.88991			
Total (Adjusted)	299	10830.42				
Total	300					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q-βP-BAL	150	33.1048	
CONTROL	150	33.73739	

b *

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: TRATAMIENTO	1	22.25685	22.25685	4.33	0.038291*	0.545537
B: TIEMPO	2	25.72835	12.86417	2.50	0.083563	0.499909
AB	2	12.91346	6.456729	1.26	0.286199	0.272291
S	294	1510.878	5.13904			
Total (Adjusted)	299	1589.747				
Total	300					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q- β P-BAL	150	16.157	CONTROL
CONTROL	150	16.84607	Q- β P-BAL

h *

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: TRATAMIENTO	1	32.89259	32.89259	1.84	0.175880	0.272197
B: TIEMPO	2	1936.784	968.3922	54.20	0.000000*	1.000000
AB	2	196.1593	98.07964	5.49	0.004565*	0.848074
S	294	5252.939	17.86714			
Total (Adjusted)	299	7677.945				
Total	300					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q- β P-BAL	150	26.33304	
CONTROL	150	27.17072	

Croma

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: TRATAMIENTO	1	38.00225	38.00225	2.50	0.115169	0.350297
B: TIEMPO	2	4068.97	2034.485	133.66	0.000000*	1.000000
AB	2	360.1627	180.0813	11.83	0.000011*	0.994401
S	294	4475.196	15.22176			
Total (Adjusted)	299	9437.78				
Total	300					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q-βP-BAL	150	36.95584	CONTROL
CONTROL	150	37.85624	Q-βP-BAL

Se analizó el parámetro a y croma al día 14 para verificar si existían diferencias significativas con los siguientes resultados

a* día 14

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: TRATAMIENTO	1	151.6523	151.6523	7.15	0.008573*	0.755403
S	118	2503.885	21.21936			
Total (Adjusted)	119	2655.537				
Total	120					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
CONTROL	60	27.26648	Q-βP-BAL
Q-βP-BAL	60	29.51483	CONTROL

Croma día 14

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: TRATAMIENTO	1	79.5049	79.5049	4.59	0.034154*	0.565837
S	118	2042.53	17.30958			
Total (Adjusted)	119	2122.035				
Total	120					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
CONTROL	60	31.97685	Q-βP-BAL
Q-βP-BAL	60	33.60478	CONTROL

Análisis estadístico de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias LSD.

RAMBUTAN

PFP

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	4	0.1204497	3.011243E-02	0.80	0.527927	0.247155
S	90	3.385036	3.761151E-02			
Total (Adjusted)	94	3.505486				
Total	95					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q5	19	0.3218535	
Q- β P-BAL	19	0.3218535	
Q- β P	19	0.3815628	
CONTROL	19	0.398753	
BAL	19	0.3996838	

pH

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	4	2.971067E-02	7.427667E-03	7.66	0.000026*	0.996193
B: tiempo	3	0.9776447	0.3258815	335.96	0.000000*	1.000000
AB	12	0.186892	1.557433E-02	16.06	0.000000*	1.000000
S	85	0.08245	0.00097			
Total (Adjusted)	104	1.557796				
Total	105					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
CONTROL	21	4.53381	BAL, Q5, Q- β P-BAL
QBP	21	4.53381	BAL, Q5, Q- β P-BAL
BAL	21	4.560952	CONTROL, QBP, Q- β P-BAL
Q5	21	4.568572	CONTROL, QBP
Q- β P-BAL	21	4.585238	CONTROL, QBP, BAL

SST (° BRIX)

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	4	4.9664	1.2416	3.30	0.014581*	0.819602
B: tiempo	3	114.3989	38.13298	101.29	0.000000*	1.000000
AB	12	13.8304	1.152533	3.06	0.001265*	0.986166
S	85	32	0.3764706			
Total (Adjusted)	104	198.2339				
Total	105					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
BAL	21	20.00952	Q5, Q- β P-BAL, CONTROL
QBP	21	20.04762	Q5, Q- β P-BAL, CONTROL
Q5	21	20.50476	BAL, QBP
Q- β P-BAL	21	20.50476	BAL, QBP
CONTROL	21	20.6381	BAL, QBP

Antocianinas HPLC cianidina-3-rutiosido

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	4	6724.39	1681.097	183.01	0.000000*	1.000000
B: tiempo	3	2818.204	939.4014	102.27	0.000000*	1.000000
AB	12	3340.517	278.3764	30.30	0.000000*	1.000000
S	20	183.7186	9.185928			
Total (Adjusted)	39	13066.83				
Total	40					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
CONTROL	8	17.70052	QBP, Q- β P-BAL
BAL	8	20.42708	Q- β P-BAL
Q5	8	20.47174	Q- β P-BAL
QBP	8	23.21737	CONTROL, Q- β P-BAL
Q- β P-BAL	8	52.57368	CONTROL, BAL, Q5, QBP

AT (%) ácido málico

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	4	1.842706E-02	4.606764E-03	3.39	0.012921*	0.830071
B: tiempo	3	0.6702362	0.2234121	164.48	0.000000*	1.000000
AB	12	7.818444E-02	6.51537E-03	4.80	0.000007*	0.999758
S	80	0.1086625	1.358281E-03			
Total (Adjusted)	99	0.8948714				
Total	100					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
Q-βP-BAL	20	0.3016962	CONTROL, Q5, QBP, BAL
CONTROL	21	0.3333068	Q-βP-BAL
Q5	19	0.3338363	Q-βP-BAL
QBP	20	0.3351675	Q-βP-BAL
BAL	20	0.3480411	Q-βP-BAL

Antocianinas totales (ABS/ g pericarpio)

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power α= 0.05
A: tratamiento	4	1.346159E-04	3.365397E-05	18.78	0.000000*	1.000000
B: tempo	3	7.997498E-04	2.665833E-04	148.79	0.000000*	1.000000
AB	12	2.501749E-04	2.084791E-05	11.64	0.000000*	1.000000
S	50	8.958488E-05	1.791698E-06			
Total (Adjusted)	69	1.335382E-03				
Total	70					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
CONTROL	14	1.160164E-02	BAL, QBP, Q-βP-BAL
Q5	14	1.240457E-02	QBP, Q-βP-BAL
BAL	14	1.328936E-02	CONTROL, QBP, Q-βP-BAL
QBP	14	1.541336E-02	CONTROL, Q5, BAL
Q-βP-BAL	14	1.583336E-02	CONTROL, Q5, BAL

Fenoles (mg catequina/ g pericarpio)

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power α= 0.05
A: tratamiento	4	1909.115	477.2786	10.27	0.000002*	0.999682
B: tiempo	3	32341.4	10780.47	231.86	0.000000*	1.000000
AB	12	1402.067	116.839	2.51	0.009538*	0.946780
S	60	2789.74	46.49566			
Total (Adjusted)	79	38131.92				
Total	80					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
CONTROL	16	46.8475	Q5, QBP, BAL, Q-βP-BAL
Q5	16	53.9975	CONTROL, Q-βP-BAL
QBP	16	55.52875	CONTROL, Q-βP-BAL
BAL	16	58.57875	CONTROL
Q-βP-BAL	16	62.3225	CONTROL, Q5, QBP

ANALISIS DE COLOR PARA RAMBUTAN

L*

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	4	60.7122	15.17805	0.20	0.940805	0.092141
B: tiempo	3	8154.901	2718.3	35.01	0.000000*	1.000000
AB	12	1667.113	138.9261	1.79	0.045473*	0.890070
S	1030	79983	77.6534			
Total (Adjusted)	1049	89165				
Total	1050					

* Term significant at alpha = 0.05

Prueba de medias: Fisher's LSD

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
QBP	210	28.00671	
Q- β P-BAL	210	28.3511	
CONTROL	210	28.66076	
BAL	210	28.71695	
Q5	210	28.77314	

a*

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha=0.05$
A: tratamiento	4	1034.127	258.5318	16.97	0.000000*	1.000000
B: tiempo	3	27902.04	9300.679	610.54	0.000000*	1.000000
AB	12	3014.204	251.1837	16.49	0.000000*	1.000000
S	1030	15690.59	15.23358			
Total (Adjusted)	1049	49807.7				
Total	1050					

* Term significant at alpha = 0.05

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
BAL	210	23.99774	Q5, CONTROL, QBP, Q- β P-BAL
Q5	210	25.4251	BAL, CONTROL, QBP, Q- β P-BAL
CONTROL	210	26.25657	BAL, Q5, Q- β P-BAL
QBP	210	26.71698	BAL, Q5
Q- β P-BAL	210	27.45595	BAL, Q5, CONTROL

b*

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha= 0.05$
A: tratamiento	4	165.3184	41.32961	4.86	0.000690*	0.958249
B: tiempo	3	8898.57	2966.19	348.96	0.000000*	1.000000
AB	12	938.2772	78.18977	9.20	0.000000*	1.000000
S	1030	8755.053	8.500051			
Total (Adjusted)	1049	18720.45				
Total	1050					

* Term significant at alpha = 0.05

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
BAL	210	15.31472	QBP, CONTROL, Q- β P-BAL
Q5	210	15.805	Q- β P-BAL
QBP	210	16.05395	BAL, Q- β P-BAL
CONTROL	210	16.19209	BAL, Q- β P-BAL
Q- β P-BAL	210	16.76186	BAL, Q5, QBP, CONTROL

h*

Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha= 0.05$
A: tratamiento	4	198.8789	49.71973	3.21	0.012506*	0.829468
B: tiempo	3	889.7184	296.5728	19.13	0.000000*	1.000000
AB	12	931.3075	77.60896	5.01	0.000000*	0.999974
S	1030	15969.05	15.50393			
Total (Adjusted)	1049	18482.49				
Total	1050					

* Term significant at alpha = 0.05

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
QBP	210	31.31109	BAL
Q- β P-BAL	210	31.37601	BAL
CONTROL	210	31.84091	BAL
Q5	210	32.03723	
BAL	210	32.74635	QBP, Q- β P-BAL, CONTROL

Croma

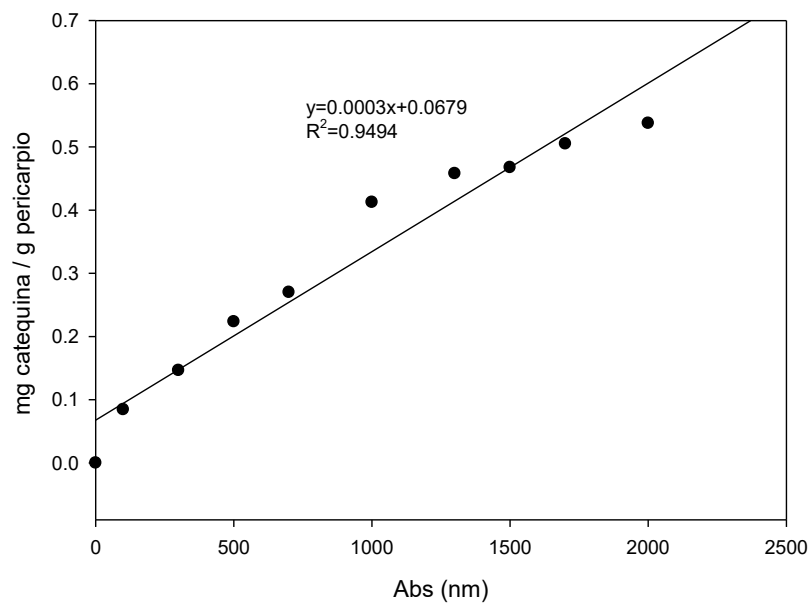
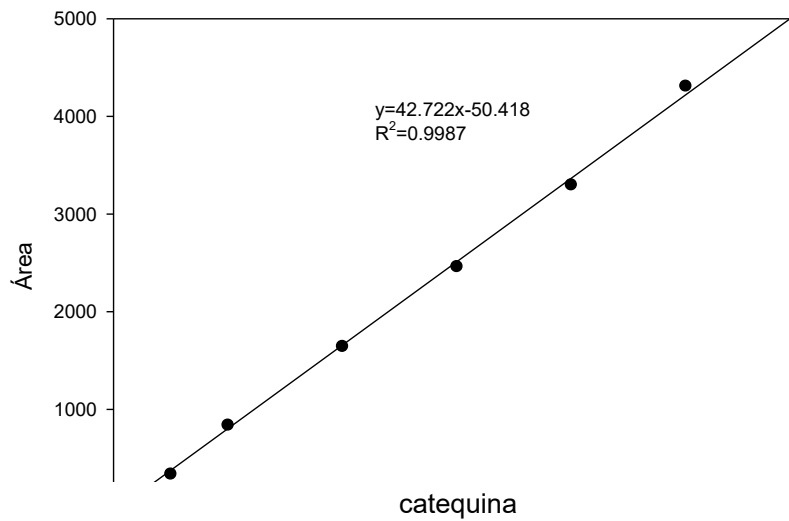
Variable	G.L	S.C	C.M	F	Nivel Probabilidad	Power $\alpha= 0.05$
A: tratamiento	4	1137.464	284.3659	15.07	0.000000*	1.000000
B: tiempo	3	37061.19	12353.73	654.49	0.000000*	1.000000
AB	12	3675.457	306.288	16.23	0.000000*	1.000000
S	1030	19441.63	18.87537			
Total (Adjusted)	1049	63193.98				
Total	1050					

* Term significant at alpha = 0.05

Fisher's LSD Multiple-Comparison Test

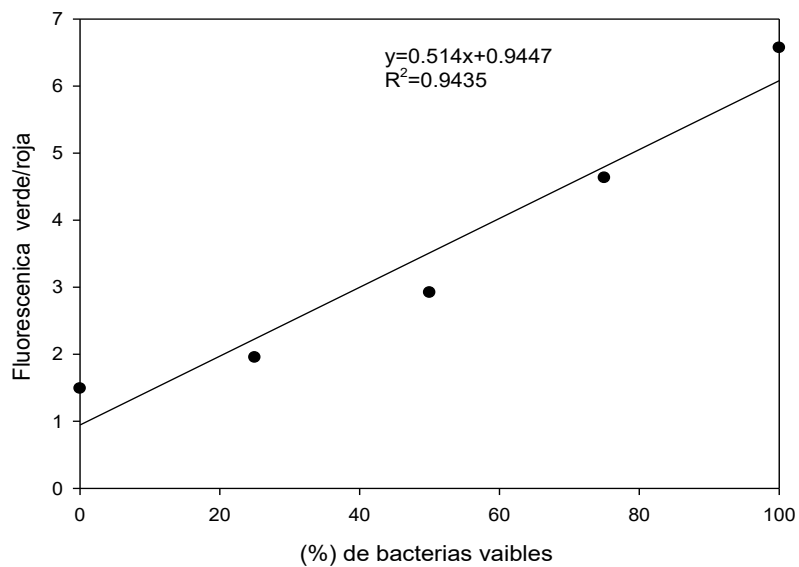
Tratamiento	Repeticiones	Media	Diferencia entre grupos
BAL	210	28.56084	Q5, CONTROL, QBP, Q-βP-BAL
Q5	210	30.01917	BAL, CONTROL, QBP, Q-βP-BAL
CONTROL	210	30.92309	BAL, Q5, Q-βP-BAL
QBP	210	31.2488	BAL, Q5, Q-βP-BAL
Q-βP-BAL	210	32.24833	BAL, Q5, CONTROL, QBP

Determinación de antocianinas HPLC



Col 1 vs Col 2
Plot 1 Regr

2D Graph 6



Col 1 vs Col 2
Plot 1 Repr