



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Hidroconservación con inulina/CMC y
nanopartículas de aceite de toronja sobre la
calidad fisicoquímica de pera Beurré D'Anjou
cortada.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ISAAC GARCÍA RESENDIZ

ASESORES:

DRA. MARÍA DE LA LUZ ZAMBRANO ZARAGOZA

DR. RICARDO MOISÉS GONZÁLEZ REZA

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

VOTOS APROBATORIOS



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN SECRETARÍA GENERAL DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis**

Hidroconservación con inulina/CMC y nanopartículas de aceite de toronja sobre la calidad fisicoquímica de pera Beurré D'Anjou cortada.

Que presenta el pasante: **Isaac García Reséndiz**
Con número de cuenta: **415117546** para obtener el título de: **Ingeniero en Alimentos**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Febrero de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	I.A. Alfredo Álvarez Cárdenas	
VOCAL	I.B.Q. Leticia Figueroa Villarreal	
SECRETARIO	Dra. María de la Luz Zambrano Zaragoza	
1er. SUPLENTE	I.A. Verónica Romero Arreola	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ana Elvia Sánchez Mendoza	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

El presente proyecto fue financiado por:

Al proyecto **PAPIIT IN 222520** “Manufactura, evaluación, caracterización y uso de sistemas nanoestructurados en el incremento de vida útil de alimentos” DGAPA-UNAM.

El Programa Interno de Apoyo a Proyectos de Investigación **PIAPI 2060** “Nanosistemas y otras tecnologías emergentes para la conservación de alimentos, refrigerados y/o congelados” de la FES-Cuautitlán.

Isaac García Reséndiz agradece la beca de apoyo para concluir los estudios de licenciatura otorgada a través del proyecto **PAPIIT IT201617**, “Efecto de recubrimientos nanoparticulados y tratamiento con luz UV-C sobre la actividad antioxidante, enzimática e integridad de frutas y hortalizas cortadas” DGAPA-UNAM.

Isaac García Reséndiz, agradece el apoyo técnico para la realización del acondicionamiento y envasado a la **Dra. María de los Ángeles Cornejo Villegas** del Laboratorio 16: Procesos de Transformación y Tecnologías Emergentes en Alimentos-UIM FES-Cuautitlán.

Lugar de realización de la tesis:

Laboratorio de Procesos de Transformación y Tecnologías Emergentes de Alimentos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM.

Agradecimientos personales:

Agradezco a Dios por la vida, porque todo lo que soy se lo debo a Él, porque su amor y fidelidad me han llevado a lugares que jamás pensé alcanzar.

Gracias a mis padres por su apoyo incondicional, por todo su amor, su ejemplo y sus enseñanzas, las cuales llevo escritas en lo profundo de mi corazón y han sido una guía para mi caminar. Gracias a mi familia porque todos me brindaron ánimo y apoyo para continuar con este proyecto.

Doy gracias al señor Carlos, a la señora Gloria y a toda su familia, quienes me abrieron las puertas de su casa y me acogieron como a un hijo. De igual manera a toda la familia de la iglesia Getsemaní, aquellos que me apoyaron, me amaron y fueron verdaderos hermanos y hermanas en todo momento.

Estoy grandemente agradecido con la Dra. Luz Zambrano, el Dr. Ricardo y la Dra. Ángeles, quienes me guiaron en la realización de este trabajo y me apoyaron en todos sentidos. Gracias por toda su paciencia, su amabilidad y su cariño, por encaminar a las nuevas generaciones al progreso.

Gracias a América, Sergio, Lupita, Sara, Gerardo, Brenda y todos mis compañeros, mis colegas y amigos del alma, que brindaron a mi ser apoyo, consuelo y ánimo para seguir adelante. Todos los buenos momentos que compartimos quedan guardados en mi corazón. Siempre los llevo en mis oraciones.

Finalmente, gracias a ti, que lees este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Generalidades de la pera.....	1
1.1.1.Composición química y valor nutricional.....	2
1.1.2.Producción y comercio.....	4
1.2. Productos derivados.....	4
1.2.1.Conservas de fruta rebanada sellados al vacío.....	4
1.2.2.Productos Refrigerados Mínimamente Procesados (PRMP).....	5
1.3. Deterioro de calidad.....	6
1.3.1.Oscurecimiento enzimático.....	6
1.3.2.Daños por microorganismos.....	10
1.3.3.Degradación textural.....	11
1.4. Alternativas de conservación de pera mínimamente procesada.....	14
1.4.1.Refrigeración.....	14
1.4.2.Hidroconservación y recubrimientos.....	15
1.5. Nanotecnología.....	16
1.5.1.Nanomateriales.....	17
1.5.2.Nanopartículas.....	18
1.5.3.Nanopartículas poliméricas.....	22
1.5.4.Componentes de las nanopartículas poliméricas.....	23
1.5.5.Fructanos de agave (Inulina).....	33
1.5.6.Carboximetilcelulosa (CMC).....	34
CAPÍTULO II. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL.....	35
2.1. Problema.....	35
2.2. Objetivos general y particulares.....	36
2.2.1.Objetivo General.....	36
2.2.2.Objetivos Particulares.....	36
2.3. Diseño Experimental.....	37
2.4. Actividades preliminares.....	38
2.4.1.Selección de agente reforzador de textura.....	38
2.4.2.Caracterización de la cámara de refrigeración.....	40
2.4.3.Selección de materia prima.....	41
2.4.4.Desinfección de material para tratamiento y envasado de producto.....	41
2.4.5.Lavado, pelado y rebanado de materia prima.....	41

2.4.6. Determinación del rendimiento del pelado y rebanado de la Pera Berrue D'Anjou.....	42
2.4.7. Preparación de agua para elaboración de dispersiones de conservación.	43
2.4.8. Elaboración de disolución de lactato de calcio.	43
2.4.9. Elaboración de dispersiones de CMC e fructanos de agave.	43
2.4.10. Elaboración de nanopartículas de aceite esencial de toronja.....	43
2.4.11. Determinación de temperatura de envasado.....	45
2.5. Diagrama de procesos para el tratamiento de hidroconservación.....	45
2.6. Técnicas de análisis.....	46
2.6.1. Pruebas al líquido de hidroconservación.	46
2.6.2. Pruebas a la pera Beurré D'Anjou.....	48
2.7. Análisis estadístico.	52
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
3.1. Pruebas preliminares: selección de agente reforzador de textura	53
3.2. Pruebas aplicadas al líquido de hidroconservación.	53
3.3. Pruebas aplicadas a la pera Beurré D'Anjou.....	62
CONCLUSIONES	76
BIBLIOGRAFÍA	77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química de la pera Anjou.....	3
Tabla 2. Composición nutricional de la pera Anjou.	3
Tabla 3. Clasificación de nanomateriales de acuerdo con las dimensiones de sus elementos estructurales.	18
Tabla 4. Clasificación de las nanopartículas de acuerdo con sus características estructurales.	21
Tabla 5. Principales componentes fenólicos de la cáscara de toronja.	27
Tabla 6. Factores y tratamientos experimentales para pera fresca cortada en líquido de hidroconservación.	38
Tabla 7. Codificación y días de muestreo.....	38
Tabla 8. Diseño experimental prueba de reforzador de textura.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las pectinas.....	12
Figura 2. Diferentes estructuras nanocapsulares poliméricas.....	22
Figura 3. Tipos de copolímeros.....	32
Figura 4. Estructura molecular de Pluronic-F127®.	32
Figura 5. División en diferentes niveles del refrigerador.	40
Figura 6. Material preparación de pera.	42
Figura 7. Dimensiones características de gajos de pera.	42
Figura 8. Diagrama de procesos de elaboración de nanopartículas.	44
Figura 9. Diagrama de procesos de tratamiento de la pera.	45
Figura 10. Cambios de pH durante el almacenamiento de pera en líquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos.	55

Figura 11. Cambios de color en liquido de cobertura durante el almacenamiento por inmersión de pera. Índices de color de dispersión sin nanopartículas.	58
Figura 12. Cambios de color en liquido de cobertura durante el almacenamiento por inmersión de pera. Índices de color de dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja.	59
Figura 13. Cambios en la turbidez durante el almacenamiento de pera en liquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos.	61
Figura 14. Absorción de líquido de cobertura durante el almacenamiento de pera, comparación de los diferentes tratamientos.	63
Figura 15. Cambios de color durante el almacenamiento de pera en liquido de cobertura. Índices de color de muestras inmersas en dispersión sin nanopartículas.	65
Figura 16. Cambios de color durante el almacenamiento de pera en liquido de cobertura. Índices de color de muestras inmersas en dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja.	66
Figura 17. Mecanismo de formación de melaninas.	67
Figura 18. Cambios en la dureza de la pera durante el almacenamiento en líquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos.	68
Figura 19. Cambios en el contenido de fenoles totales durante el almacenamiento de pera en líquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos.	70
Figura 20. Cambios en actividad de la enzima PPO durante el almacenamiento de pera en líquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos.	72
Figura 21. Cambios en actividad de la enzima PME durante el almacenamiento de pera en líquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos.	75

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue establecer el efecto de la composición del líquido de conservación, sin y con inulina (fructanos de agave) y carboximetilcelulosa como polisacáridos soporte, nanopartículas de aceite esencial de toronja como agente antioxidante y antimicrobiano, sobre los cambios de calidad fisicoquímica y actividad enzimática de pera Beurré D'Anjou fresca, con y sin pretratamiento con un agente reforzador de textura (lactato de calcio), cortada y envasada en polipropileno cristal, para la selección de la formulación que contribuya en mayor medida a incrementar su tiempo de almacenamiento en refrigeración. Previo al establecimiento de formulaciones y objetivos finales se evaluaron el lactato y el cloruro de calcio para seleccionar aquel que serviría como agente reafirmador de textura en los experimentos posteriores. Se utilizaron distintas técnicas de evaluación de la calidad final de los distintos tratamientos y se compararon con los parámetros del fruto sin tratamiento. Dichas técnicas aplicadas al fruto y al líquido de hidroconservación fueron colorimetría y determinación de pH, además pruebas de dureza en texturómetro, determinación de actividad enzimática de polifenol oxidasa por el método Folin-Ciocalteu y actividad de pectin metil esterasa aplicadas al fruto, y turbidimetría únicamente aplicada al líquido de hidroconservación. Los resultados de las distintas pruebas se analizaron mediante un análisis ANOVA en Minitab para determinar el efecto de cada variable de tratamiento. Se encontró que el pretratamiento con lactato de calcio permitió conservar mejor la textura del fruto a lo largo del tiempo de almacenamiento, y que los polisacáridos de soporte (fructanos de agave y carboximetilcelulosa) actuaron en conjunto con las nanopartículas de aceite esencial de toronja para reducir la oxidación de la pera y prolongar el tiempo de vida útil del producto.

INTRODUCCIÓN

La pera Beurrè D'Anjou (*Pyrus communis*, var. *Anjou*), o simplemente Anjou, es el fruto del peral, árbol de la familia de las Rosáceas, que procede de la región de Angers (anteriormente llamada Anjou) en el centro de Francia (Eladio, 2015). Según cifras de SAGARPA (2018), México aporta al mundo una producción de poco más de 24 mil toneladas de pera, y el principal estado productor es Morelos con 28.8% del total, seguido de Puebla y Michoacán con 20.6% y 20.5% respectivamente. Actualmente existe un alto consumo de frutos mínimamente procesados debido a su frescura y fácil obtención; esto promueve el uso de tecnologías aplicadas a estos productos que les brinden mayor duración y garanticen la reducción de pérdidas postcosecha (Escobar *et al.*, 2014). Los principales efectos que pueden dañar a la pera sin pericarpio incluyen la formación de cavernas en su interior debido a elevadas concentraciones de CO₂, humedad y altas temperaturas (INTA, 2015), deshidratación, daños mecánicos, crecimiento mohos, bacterias, infestación por insectos y oscurecimiento (Zhang *et al.*, 2018).

El oscurecimiento en la fruta es causada principalmente por el daño de membrana celular y la consiguiente oxidación enzimática de los fenoles en presencia de oxígeno por polifenol oxidasas (PPO) liberadas durante el rompimiento de la membrana celular (Lin *et al.*, 2016). Se han estudiado diferentes pretratamientos (Zhang *et al.*, 2018) y tratamientos químicos y físicos con el fin de reducir este efecto (Dong *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2018). Una de las novedades para contrarrestar estos daños es la nanotecnología (Ávalos *et al.*, 2016). Las nanopartículas forman parte de las tecnologías emergentes con aplicaciones en el área de alimentos, ya que permiten el transporte de compuestos bioactivos que confieren al producto resistencia a los microorganismos y a la degradación química y enzimática. Dentro de las sustancias activas utilizadas en la funcionalización de

nanopartículas se encuentran los aceites esenciales, que por su composición química sirven como antioxidantes y antimicrobianos (González-Reza *et al.*, 2018). No obstante, conforme a lo que mencionan Zambrano-Zaragoza *et al.* (2018) para que las nanopartículas se adhieran con mayor facilidad a la superficie del alimento es necesario utilizar un polímero que sirva como matriz de soporte, como en el caso de la carboximetilcelulosa (CMC) y la inulina. El lactato de calcio y el cloruro de calcio están clasificados por la FAO (2018) como un agentes reforzadores de textura, ya que promueven la permanencia de firmeza en los tejidos estructurales de las frutas. Para este proyecto, previo al establecimiento de objetivos, se realizó un experimento para seleccionar uno de estos dos compuestos como agente reafirmante, y finalmente se seleccionó el lactato de calcio para el pretratamiento de la pera. En el presente trabajo de tesis se estudia el efecto de un pretratamiento con lactato de calcio y de la composición del líquido de hidroconservación conformado por inulina/CMC para y nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja sobre la calidad de pera pelada y cortada.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1. Generalidades de la pera.

La pera es el fruto del peral (*Pyrus communis* L.), perteneciente a la familia de las Rosáceas (Eladio, 2015). El peral es un árbol piramidal, redondeado en su juventud, luego oval, que llega hasta 20 metros de altura, con una vida productiva de aproximadamente sesenta y cinco años (González, 1996). En excavaciones arqueológicas se han encontrado vestigios de este árbol que datan de 3,000 años a.C. No existen pruebas que evidencien su consumo entre egipcios, griegos y semitas. Sin embargo, en estado silvestre, se hallaba distribuida por las zonas templadas de Europa y Asia Central. Los responsables de la difusión y mejora de su cultivo fueron los romanos, quienes desarrollaron nuevas variedades de este fruto mediante técnicas de injerto. De hecho, Plinio dejó testimonio escrito de su importancia en la antigua Roma describiendo 38 variedades de pera (FEN, 2011). Hoy por hoy existen muchas variedades naturales e híbridas de pera, de las cuales unas son más dulces que otras. Según su color, pueden ser blancas, amarillas, verdes, rojas o pardas. Aunque en el mundo existen más de 2,000 variedades de peras (SADER, 2016), entre las más comerciales a nivel mundial se encuentran la Red Clapps, Williams (Bartlett), Red Williams (Red Bartlett), Beurrè D'Anjou, Red D'Anjou, Abate Fetel, Packham's Triumph, Golden Russet Bosc y Forelle (Kleppe, 2018).

La variedad Beurrè D'Anjou (*Pyrus communis* var. *Anjou*) proviene muy probablemente de Bélgica o la región de Angers (anteriormente llamada Anjou) en el centro de Francia (Eladio, 2015) y es de ahí de donde recibe su nombre. En México también son conocidas con el nombre de "Pera mantequilla" o simplemente como "Anjou". Las Anjou se reconocen por su apariencia en forma de huevo: con la parte más baja de forma esférica que se afina en la parte

media para terminar con la parte superior redondeada y más pequeña (SADER, 2016). Su piel es color verde brillante y en algunas ocasiones tiene un ligero rubor rojizo (PERAS USA, 2016). El color de su cáscara permanece verde en todas las etapas de su madurez, por lo que no es un indicativo de su madurez o textura. Tiene un sabor suave y una textura bien firme aun siendo jugosa y dulce (Kleppe, 2018). En cuanto al consumo, debido a que esta fruta tiene un sabor muy dulce, normalmente es consumida fresca en cócteles, ensaladas o sola, aunque también es utilizada para la preparación de alimentos como mermeladas, ates, frutos en almíbar, licores y en repostería, por mencionar algunos. Además de la fruta, las hojas del peral también tienen una gran importancia para la elaboración de tés relajantes, mientras que su madera se emplea para construir muebles e instrumentos musicales como violines y guitarras (SADER, 2018).

1.1.1. Composición química y valor nutricional.

De acuerdo con la SADER (2018), la pera es una fruta que contiene importantes nutrientes, entre los cuales destacan las vitaminas A, B, C y K, minerales como cobre, hierro, potasio y magnesio, además de una gran variedad de ácidos saludables. De igual manera su cáscara contiene fitonutrientes y vitaminas que protegen al cuerpo de los radicales libres dañinos. Esta fruta posee fibra tanto soluble como insoluble, que además de ayudar a mantener un sistema digestivo sano, favorece la disminución del colesterol, facilita la eliminación de toxinas, previene enfermedades cardiovasculares y ayuda a mantener un sistema digestivo sano (SADER, 2018).

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) y la Fundación Española de la Nutrición (FEN) reportan la siguiente composición química para pera Anjou (Tabla 1). De igual manera, ambos organismos reportan los siguientes valores de composición nutricional por cada 100g de porción comestible de pera (Tabla 2).

Tabla 1. Composición química de la pera Anjou (USDA, 2019; Fen, 2011).

COMPONENTE	(USDA) (%)	(FEN) (%)
Proteínas	0.44	0.40
Lípidos	0.10	-
Carbohidratos	15.79	10.60
Cenizas	0.37	-
Agua	83.31	86.70

Tabla 2. Composición nutricional de la pera Anjou (USDA, 2019; FEN, 2011).

	UNIDAD	VALOR	
		USDA	FEN
Energía	kcal	66	49
MINERALES			
Calcio	mg	12.00	12.00
Hierro	mg	0.24	0.20
Magnesio	mg	7.00	7.00
Fósforo	mg	13.00	17.50
Potasio	mg	127.00	130.00
Sodio	mg	1.00	2.00
Zinc	mg	0.10	0.14
VITAMINAS			
Niacina	mg	0.151	0.200
Tiamina	mg	0.010	0.030
Riboflavina	mg	0.022	0.030
Vitamina C	mg	4.400	3.000
Vitamina E	mg	0.120	-
Vitamina B ₆	mg	0.026	0.020
Vitamina A (Eq. de retinol)	µg	1.000	10.000
Vitamina K	µg	4.300	-

1.1.2. Producción y comercio.

Según cifras del INTA (2016), en 2013 la producción mundial de pera fue de 22,619,716 toneladas. En ese año, China se colocó como el principal productor con 15,696, toneladas, equivalente a 69.39% del total. En la lista de proincipales productores le siguieron EEUU con 3.17% e Italia con 2.96%. Ese año el aporte de México a la producción mundial fue de 21,730 toneladas equivalentes a 0.096% del total, mientras que en el 2012 ocupó el noveno lugar entre los principales países importadores con un total de 96,671 toneladas importadas.

En México, la SADER (2017) reporta un consumo anual per cápita de 900 g de pera. En cuanto a la producción nacional de este fruto, según datos de la SAGARPA, en el 2018 se cosecharon 29,940 toneladas, y los principales estados productores fueron Puebla con 42,58% del total, Michoacán con 33.36%, Morelos con 7.30% y Veracruz con 6.91%. La SADER (2016) indica que aproximadamente 40 toneladas de este producto se destinan para el mercado internacional, por lo que el restante se conserva en el país para consumo nacional.

1.2. Productos derivados.

Existe una gran variedad de productos derivados de la pera, como jugos y néctares, mermeladas, confituras, jaleas, productos deshidratados, conservas de fruta rebanada selladas al vacío y productos refrigerados mínimamente procesados (Rodríguez & Simón, 2008; PROFECO, 2018; CODEX, 2009). Conocer a profundidad los últimos dos es de especial importancia para este proyecto.

1.2.1. Conservas de fruta rebanada sellados al vacío.

Son productos en que el alimento se conserva en forma de rebanadas y ha sido sometido a un proceso químico o térmico para garantizar una vida útil larga. Su forma de presentación es en botes de cristal o más comúnmente en latas de aluminio. En el caso de conservas de frutas, estas suelen realizarse en un medio líquido denominado almíbar, el cual es una solución azucarada que puede variar de 14 a 24 grados Brix, dependiendo del fruto en

conserva. En estos procesos, las vitaminas hidrosolubles son las más afectadas (especialmente la vitamina C y algunas del grupo B), no sólo por el tratamiento térmico sino también por el tiempo de almacenamiento hasta que el producto final es consumido (Rodríguez & Simón, 2008).

En estos procesos el debido al envasado en caliente se genera una conserva al vacío, por lo que el principal riesgo a evitar es la posibilidad de germinación de esporas de *Clostridium botulinum* (Rodríguez & Simón, 2008). Una vez que se ha enlatado el producto, es sometido a un proceso térmico de esterilización, en donde se manejan altas temperaturas (120-130 °C) en corto tiempo (< 30 minutos), este proceso inactiva las enzimas propias del alimento, evitando la maduración y por lo tanto la pérdida de nutrientes se detiene debido a la ausencia de oxígeno y del contacto del producto con el medio exterior (sustancias gaseosas, líquidas, sólidas o la misma luz) (CANAFEM, 2017).

1.2.2. Productos Refrigerados Mínimamente Procesados (PRMP).

En los recientes años, los consumidores han buscado adquirir alimentos que conserven cualidades de frescura y, al mismo tiempo, sus propiedades nutricionales y atributos sensoriales, como color, olor, sabor y textura. Es entonces cuando surge el concepto de alimentos mínimamente procesados, los cuales se caracterizan por no tener o contener bajas cantidades de aditivos sintéticos e incluir en su procesamiento tecnologías principalmente no térmicas que permitan conservar la calidad nutricional y sensorial (Alzamora *et al.*, 2016). La creciente demanda por PRMP ha llevado a la industria alimentaria a desarrollar nuevos procesos y tecnologías de conservación (Mohammed & Mohammad, 2015). Sin duda las frutas y vegetales son un buen ejemplo de alimentos mínimamente procesados. De acuerdo con Rodríguez y Simón (2008), se trara de frutas u hortalizas que han sufrido un ligero tratamiento adicional (pelado, recorte, troceado, escaldado, etc.) en comparación con los productos frescos, y cuya vida útil es habitualmente menor que la de los últimos, por lo que deben ser mantenidos en refrigeración y someterse a otras técnicas de conservación (atmósferas modificadas, disminución de pH, recubrimiento superficial, irradiaciones, adición de conservadores, etc.) para prolongar su vida de anaquel. La principal ventaja de

estos productos es la comodidad de su consumo, así como el ahorro de tiempo, ya que la mayoría están listos para ser consumidos o utilizados en la elaboración de distintos platillos. Debido a la creciente demanda de estos productos, principalmente en Europa y Norteamérica, se han estudiado nuevas técnicas para prolongar la vida de estos productos, como el uso de pulsos de campos eléctricos, pulsos de luz de alta intensidad, ultrasonido de alta potencia, campos magnéticos oscilantes, irradiación microondas y nanotecnología (Mohammed & Mohammad, 2015).

1.3. Deterioro de calidad.

El valor de los productos frescos-cortados radica principalmente en las características de frescura y conveniencia (facilidad de obtención e ingesta para el consumidor). Sin embargo, operaciones tales como pelado, cortado, desmenuzado y rebanado aumentan en gran medida el daño tisular de los productos recién cortados y pueden resultar en varios deterioros bioquímicos, como el oscurecimiento, la producción de sabores desagradables, la pérdida de textura, degradación del valor nutricional y cambios en la calidad microbiana de los productos. Entre las diversas alteraciones podemos citar cambios en la transpiración, la actividad enzimática, la pérdida de agua, el sabor, el aroma, los perfiles de compuestos volátiles y la proliferación microbiana, y para la mayoría de los productos, la tasa de respiración acelerada representa el factor principal que provoca la inacceptabilidad de los alimentos (Del Nobile & Conte, 2013).

1.3.1. Oscurecimiento enzimático.

Las frutas pueden clasificarse en climatéricas o no climatéricas de acuerdo con su tasa de respiración y producción de etileno durante la maduración (Paul *et al.*, 2012). Los frutos climatéricos son aquellos en que la velocidad de respiración y producción de etileno al inicio de la maduración aumenta considerablemente, fenómeno que no se observa en frutos no climatéricos (Lindo-García *et al.*, 2019). Los frutos climatéricos muestran un comportamiento autocatalítico en la producción de etileno, lo que les permite continuar madurando aún después de ser separados del árbol (Van de Poel *et al.*, 2014). Las peras en

general son clasificadas como climatéricas, aunque las variedades invernales, una vez cortadas del árbol, maduran más lento que las variedades de verano y requieren temperaturas menores para iniciar su producción de etileno (Lindo-García *et al.*, 2019). Más allá de la autocatálisis de etileno, existen numerosos estudios que enlistan una gran cantidad de factores que promueven el oscurecimiento en frutas y verduras, incluyendo el daño por frío, oscurecimiento enzimático, peroxidación de la membrana lipídica, presencia de elementos minerales, daños por gas, daños físicos durante la cosecha y procesamiento térmico (Kou *et al.*, 2015). Dentro de estos, el oscurecimiento enzimático es el proceso de mayor importancia relacionado con el oscurecimiento en frutas.

El oscurecimiento enzimático está mayoritariamente asociado con la acción de las polifenol oxidasas (PPO), sin embargo existen otras enzimas responsables en menor grado. La principal catalizadora de la alteración del color en los alimentos, la polifenol oxidasa (PPO) es una enzima ampliamente distribuida en la escala filogenética, encontrándose tanto en organismos procariotas como eucariotas. Recibe distintos nombres según el material biológico del que proceda. Así, se denomina tirosinasa en animales y organismos procariotas, y polifenol oxidasa en vegetales. La polifenol oxidasa se localiza siempre en orgánulos celulares, concretamente en cloroplastos y mitocondrias. Se puede hallar de dos formas distintas, bien unida a membranas, como a la membrana tilacoidal de los cloroplastos, o bien en forma soluble. Es de destacar el hecho de que la proporción de fracción soluble de PPO aumenta durante la maduración del fruto (Pérez, 2003).

La PPO es una metaloenzima oxidorreductasa intracelular que contiene 0.2% de cobre y cataliza la oxidación de sustratos polifenólicos a quinonas, que subsecuentemente polimerizan en pigmentos cafés y oscuros. Como resultado de esta reacción no sólo se altera el color y se degrada la capacidad antioxidante del fruto, sino que, debido a la condensación de las quinonas con otros compuestos como aminoácidos, proteínas, fenoles y azúcares, se tienen pérdidas de sabor y nutricionales del producto (Tinello & Lante, 2018). Según la Comisión para la Nomenclatura Enzimática, todas las enzimas pueden agruparse en seis clases. Las enzimas involucradas en el oscurecimiento enzimático pertenecen al grupo 1 o grupo de las oxidorreductasas, constituido por deshidrogenasas, reductasas, oxidasas,

transhidrogenasas, peroxidasas y oxigenasas. Es conveniente distinguir entre dos subclases de enzimas, las oxigenasas y las oxidasas. Las oxigenasas catalizan la incorporación tanto de átomos de oxígeno como de oxígeno molecular en el sustrato, dando lugar en la mayoría de los casos a la formación de grupos hidroxilo. Pueden incorporar un átomo de oxígeno por mol de sustrato (se denominan entonces monooxigenasas) o dos átomos de oxígeno (dioxigenasas). Las oxidasas, sin embargo, catalizan la transferencia de electrones desde su sustrato al oxígeno, reduciendo este último a peróxido, superóxido o agua, pero sin incorporar ningún átomo de oxígeno al sustrato. Las oxidasas son frecuentemente metaloproteínas (Pérez, 2003).

Para su clasificación y fácil identificación, el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB, por sus siglas en inglés) asigna a cada enzima un número EC (por las iniciales de Enzyme Commission), el cuál consiste en las siglas "E.C." seguido de los números de clase y subclase que corresponden a la categorización de enzimas dictada por el mismo organismo. Bajo la genérica denominación de polifenol oxidasa, quedan comprendidas dos tipos de enzimas. El primer tipo lo constituyen las catecol oxidasas (E.C. 1.10.3.1) y el segundo tipo las lacasas (E.C.1.10.3.2.). Las primeras (catecol oxidasas) catalizan dos reacciones distintas:

- Reacción 1 o Actividad cresolasa: hidroxilación de monofenoles en la posición orto para obtener *o*-difenoles. Reacción 2 o Actividad catecolasa:
- oxidación de *o*-difenoles a sus correspondientes *o*-quinonas.

Estas dos reacciones enzimáticas consumen oxígeno y son conocidas en la literatura por el apelativo de actividad monofenolasa (o cresolasa) y actividad *o*-difenolasa (o catecolasa). La actividad cresolasa de la enzima es reflejo de un comportamiento de oxigenasa, mientras que la actividad catecolasa es un claro exponente de la actividad enzimática de una oxidasa. la hidroxilación de monofenoles (reacción 1) es propia de una monofenol monooxigenasa o tirosinasa, monofenolasa o cresolasa y la oxidación a quinonas (reacción 2) propia de una difenol oxidasa, difenolasa o catecolasa. Es por ello que en las publicaciones especializadas

aparece la denominación E.C. 1.14.18.1 junto a la de E.C. 1.10.3.1 para referirse ambas a la enzima que cataliza la hidroxilación de monofenoles. Se ha cuestionado que las lacasas estén involucradas en los procesos de oscurecimiento enzimático ya que están ausentes en la mayoría de los vegetales (Pérez, 2003).

El oscurecimiento enzimático acelerado de las frutas es consecuencia de lesiones causadas al producto durante la cosecha, procesamiento postcosecha y almacenamiento (Zhang *et al.*, 2019). Cualquiera de estos daños, cambian la textura o el color del tejido, debido a la destrucción de los compartimentos celulares del fruto, que permiten que los sustratos de naturaleza fenólica sean accesibles a la enzima polifenol oxidasa, dando lugar a polímeros oscuros (Morante *et al.*, 2014). El oscurecimiento enzimático puede contemplarse como una transformación que conlleva dos etapas, una catalizada por enzimas y otra posterior no enzimática. La primera fase enzimática se traduce en una conversión de monofenoles en quinonas. Esta transformación tiene lugar en dos pasos: hidroxilación de monofenoles en *o*-difenoles, y oxidación de estos *o*-difenoles a *o*-quinonas, que corresponden a las dos actividades consecutivas realizadas por la polifenol oxidasa. La segunda fase del oscurecimiento, que no es de carácter enzimático, presenta mayor complejidad, pues las *o*-quinonas producidas en la primera fase son inestables en disolución acuosa e increíblemente reactivas. El conjunto de reacciones que componen el oscurecimiento de vegetales desembocará en la formación de pigmentos llamados melaninas. Pero este mecanismo de reacción de oscurecimiento en sus fases no enzimáticas aún no ha sido elucidado. De todos modos, las reacciones que se suceden de oxidación y polimerización se han clasificado según si involucran o no a compuestos fenólicos de nuevo. Las reacciones en cadena posteriores en las que sí se implican los compuestos fenólicos dependen de los potenciales de oxidación de las diferentes parejas de fenol/quinona presentes. Este tipo de reacciones puede llevar tanto a condensaciones de gran peso molecular (polímeros) como a la regeneración del fenol originario o de una *o*-quinona diferente a la primaria por una oxidación en cadena. Las *o*-quinonas son tan reactivas que al reaccionar con otro fenol pueden dar lugar a dímeros del fenol de partida (Pérez, 2003).

Hasta el momento se carece de una certeza respecto al beneficio que obtiene el fruto de la PPO, sin embargo se ha atribuido a los compuestos coloreados responsables del oscurecimiento vegetal un efecto tóxico hacia ciertos microorganismos. Además, dichas oxidasas pueden estar involucradas con la producción de compuestos fenólicos, precursores de la síntesis de lignina para el reforzamiento de paredes vegetales, proceso éste que tiene un papel importante en las respuestas de defensa de las plantas. El estudio de esta enzima ha tomado importancia en modelos de interacción planta-insecto, en los cuales la protección de la planta contra herbívoros parece darse debido al mal sabor que presentan las hojas por su alto contenido de quinonas, las cuales son producidas por dichas enzimas. Así mismo, se ha considerado un efecto antimicrobiano para proteger zonas lesionadas en frutos, promovido por la PPO, debido a la disminución del pH provocado por *o*-quinonas, melaninas y compuestos resultados de la actividad de dicha enzima (Roquesa & Higuera, 2007). No obstante, las melaninas formadas por la actividad de esta enzima siempre resultarían en una pérdida de calidad para el consumidor.

1.3.2. Daños por microorganismos.

Además del oscurecimiento enzimático, las frutas y verduras también son propensas al deterioro microbiano debido a su alto contenido de azúcares, pectina y una actividad de agua alta. Dentro de los principales agentes microbianos y los más peligrosos que atacan a las frutas y hortalizas se encuentran *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp.* No obstante, los casos de presencia de estos microorganismos en frutas son menores y se deben principalmente a contaminación cruzada (Mohammed & Mohammad, 2015). Si bien en términos generales las frutas y hortalizas presentan una susceptibilidad menor al deterioro microbiano al de otros productos de origen animal o considerados perecederos, debido principalmente a las cubiertas protectoras (cáscaras) que impiden el acceso de los microorganismos a las estructuras interiores, y en el caso de las frutas, al bajo pH, el exceso de humedad puede promover el crecimiento de hongos en su superficie. Así mismo, siempre existe el riesgo de contaminación por insectos o plagas debido a inadecuadas prácticas de cultivo y recolección (Rodríguez & Simón, 2008).

Especialmente en frutos mínimamente procesados existe un mayor susceptibilidad a hongos fitopatógenos, los cuales pueden provocar grandes pérdidas en la producción de frutas y hortalizas. Estos microorganismos son capaces de producir sustancias, como resultado de su metabolismo secundario, como las micotoxinas, que se distribuyen con facilidad en el sustrato y pueden llegar a ser perjudiciales aún cuando se encuentran en concentraciones muy bajas, poniendo en entredicho su inocuidad, ya que un 25 % de las cosechas de alimentos a nivel mundial están contaminadas con algún tipo de micotoxinas, lo cual representa un fuerte riesgo para la salud de la población de países importadores de alimentos que no controlan estos contaminantes (Trigos, Ramírez, & Salinas, 2008). Las micotoxinas son sustancias venenosas producidas por algunos hongos que se encuentran mayormente en las siembras de granos y en nueces, pero también y en otras frutas y vegetales. Existen muchos de ellos y continuamente se descubren nuevos. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) estima que un 25% de las cosechas a nivel mundial son afectadas por las micotoxinas, de las cuales las aflatoxinas son las más notorias (USDA, 2010).

1.3.3. Degradación textural.

Otro factor clave en la calidad de frutas frescas peladas es la textura. En la industria, la mayoría de los procesos como el blanqueo, la congelación, la deshidratación, la pasteurización y la esterilización aplicados para preservar frutas y verduras causan daños físicos irreversibles en los tejidos celulares. La hidrólisis y la despolimerización de la pectina, la degradación de las paredes celulares, la descomposición celular debido a la senescencia, y la absorción de líquido, son factores que causan el ablandamiento de la fruta (Khodaei & Hamidi-Esfahani, 2019). Sin embargo, los efectos negativos del procesamiento sobre la textura se pueden superar aplicando diferentes procesos, que implican el uso de la enzima pectin metil esterasa (PME).

La pared celular es una estructura semirrígida y dinámica que rodea a la célula vegetal y define la morfología distintiva de la planta. La pared celular en crecimiento está compuesta

por un esqueleto de microfibrillas de celulosa embebidas en una matriz gelatinosa formada por pectina, hemicelulosa, enzimas y proteínas estructurales. Las pectinas (Figura 1) son un extenso grupo de polisacáridos complejos que son sintetizados en el aparato de Golgi y son transportados a la pared celular por vesículas secretoras. Las pectinas se clasifican en: homogalacturonanos (HG), ramnogalacturonanos I (RG-I) y ramnogalacturonanos II (RG-II) y en algunas especies particulares también se pueden encontrar xilogalacturonanos y apiogalacturonanos. Las pectinas son sintetizadas en el cis-Golgi, posteriormente son metilesterificadas en su carboxilo C₆ en el Golgi medio por las pectin metiltransferasas (PMT) y modificadas por la adición de cadenas laterales al esqueleto en el trans Golgi, dando lugar a RG-I, RG-III y xilogalacturonanos.

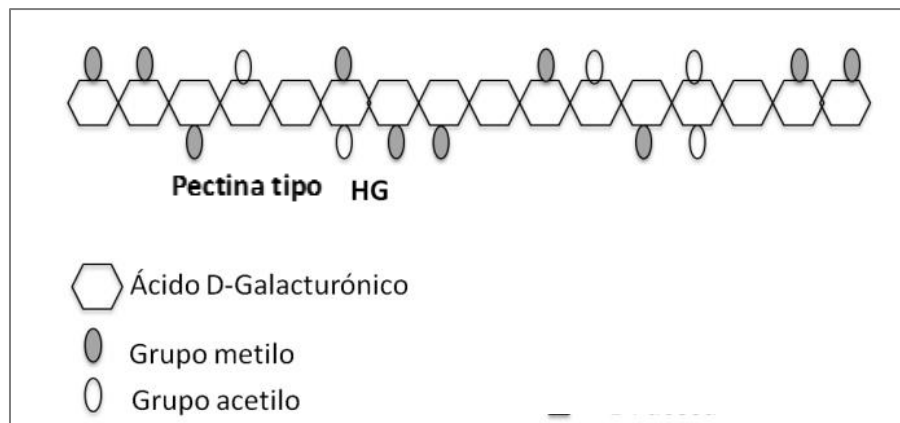


Figura 1. Estructura de las pectinas (Salazar & Gamboa, 2013).

La estructura fina de la matriz de pectina es modificada extensamente in muro durante el desarrollo y en respuesta a requerimientos funcionales locales por la acción de enzimas modificadoras incluyendo pectin metil esterases (PME), que remueven el grupo metilo del ácido galacturónico, dejando la cadena de estos ácidos libres, lo cual incrementa la susceptibilidad de los polímeros pécticos a la degradación por enzimas como poligalacturonasa (PG) (Díaz-Cruz *et al.*, 2016), que degradan a las pectinas demetil esterificadas al hidrolizar el enlace α -1,4 del ácido galacturónico (Salazar & Gamboa, 2013). Más específicamente, la PME (E.C. 3.1.1.11) es una enzima hidrolítica del grupo éster metílico que cataliza reacciones de acuerdo con los mecanismos de doble desplazamiento, la

desesterificación mediante la transferencia de los grupos carboxilo C₆ en los complejos de pectina-PME a moléculas de agua que alteran el grado y el patrón de esterificación de metilo y la transacilación a través de la transferencia de los grupos carboxilo C₆ a los grupos hidroxilo de otras moléculas de pectina, dando como resultado la formación de pectinas de alto peso molecular con nuevos enlaces de éster no metoxi (Salazar & Gamboa, 2013).

Cuando las pectinas son demetil esterificadas pueden ocurrir diversos procesos que incluyen la relajación o el aumento en la rigidez de la pared, la alteración en la adhesión celular y la generación de fragmentos de oligogalacturónidos (OGA). Los residuos con carga negativa del ácido galacturónico pueden interactuar con diferentes moléculas. Por un lado, se favorece la hidratación de la pared y, en consecuencia, se incrementa su relajación y por otro lado la interacción de un mínimo de nueve residuos de ácido galacturónico con calcio (Ca⁺²) promueve un aumento en la rigidez de la pared al establecerse una interacción entre dos moléculas de HG adyacentes (Salazar & Gamboa, 2013). El mecanismo de reafirmación en este método se basa en la desmetilación de la pectina natural en los tejidos vegetales por la acción de PME y la quelación del calcio agregado o natural con los grupos carboxilo libres generados en las moléculas de pectina. Tal quelación provoca la formación de redes entre las moléculas de pectina (el modelo de caja de huevo), estabiliza la pectina y aumenta la firmeza de los tejidos vegetales. Algunas de las aplicaciones exitosas de la reafirmación enzimática mediante el uso de PME incluyen acondicionar las fresas antes de la congelación, fabricación de mermeladas, reafirmar las manzanas, fresas y frambuesas antes de la pasteurización. Además de los PME comerciales, el PME in situ en el producto también se puede usar para reafirmar frutas y verduras. Algunos de los reactivos utilizados industrialmente para conseguir estos efectos son el lactato y el cloruro de calcio (Beigi *et al.*, 2015). Para este proyecto, previo al establecimiento de objetivos, se realizó un experimento para seleccionar uno de estos dos compuestos como agente reafirmante. El procedimiento se detalla en la sección de actividades preliminares. Se llegó a la conclusión de que el lactato de calcio es más eficiente para el pretratamiento de la pera.

1.4. Alternativas de conservación de pera mínimamente procesada.

1.4.1. Refrigeración.

La conservación de alimentos por frío se fundamenta en un principio general de la fisicoquímica que enuncia que la movilidad molecular disminuye al disminuir la energía (temperatura) del sistema, y en consecuencia la velocidad de reacciones químicas y de los procesos biológicos es menor. En contraste con alimentos tratados con calor, las bajas temperaturas no se enfocan en la destrucción de microorganismos o enzimas, sino solo en disminuir su actividad en la mayor medida posible (Berk, 2018). Cuando los vegetales se exponen a condiciones de temperaturas bajas, por encima de las de congelación, se produce la inactivación de aquellas enzimas que catalizan reacciones de deterioro, la disminución en la velocidad de reproducción y crecimiento de muchas especies de microorganismos patógenos y alterantes. A temperaturas de refrigeración, la velocidad de respiración del tejido vegetal se reduce (Parzanese, 2012). La ventaja de la conservación por refrigeración de frutos yace en que, bajo las condiciones adecuadas de temperatura, humedad, luz y tiempo de almacenamiento, no se alteran las propiedades sensoriales del producto ni se alteran sus valores nutricionales, caso contrario al tratamiento por calor (Aste, Del Pero, & Leonforte, 2017).

Es muy importante considerar las variables del proceso para evitar daños por frío en algún producto. La temperatura es la más importante de estas variables, principalmente en alimentos hortofrutícolas, ya que para conservar su frescura deben mantener sus metabolitos en estado líquido, por lo que no pueden ser sometidos a temperaturas de -1.5 a 0°C. Por otro lado, algunos frutos de origen tropical y subtropical, como el plátano, presentan sensibilidad a las bajas temperaturas que se manifiesta por diferentes alteraciones y manchas en la piel, conocidas generalmente como lesión o daños por frío, y que provocan pérdida de la calidad comercial (Cáceres *et al.*, 2019).

1.4.2. Hidroconservación y recubrimientos.

Desde la antigüedad han existido diversos métodos por los que un alimento es conservado en medios líquidos (salmueras, almíbares). Estas técnicas de conservación modifican tanto el líquido de inmersión como las características organolépticas del alimento debido a diferentes procesos, como acidificación y migración de solutos del medio a la matriz del alimento. En la búsqueda de una alternativa que permita aprovechar al máximo las características del líquido de conservación sin modificar las propiedades organolépticas del alimento, la unidad de instrumentación agropecuaria EMPRABA, una empresa vinculada al Ministerio de Agricultura brasileño ha desarrollado un método denominado hidroconservación que se basa en utilizar las propiedades de capacidad calorífica y conductividad térmica del agua para conservar los alimentos. (OEPM, 2006). Este proceso consiste en la inmersión del alimento en agua (o alguna disolución acuosa) que mediante las propiedades antes mencionadas promueve la conservación del alimento amortiguando los efectos producidos por la temperatura ambiente y sus cambios bruscos, sin agregar al medio elementos que pudieran alterar los atributos sensoriales del alimento. Con este propósito, la hidroconservación echa mano de algunas otras tecnologías que le permitan prolongar la vida del producto, tales como el uso de recubrimientos comestibles y nanotecnología.

Los términos “recubrimiento comestible” y “película comestible” se suelen utilizar para referirse a la delgada capa de un material que cubre la superficie de un alimento para protegerlo, conservar sus propiedades e incluso hacerlo más atractivo al consumidor, y que se puede ingerir junto con el alimento sin necesidad de ser removido. La diferencia entre estos términos radica en que una película es un material de barrera independiente, mientras que un recubrimiento se aplica y se forma directamente sobre la superficie de los alimentos (Bourtoom, 2008). Estas tecnologías son bastante útiles cuando se habla de productos mínimamente procesados, ya que se trata de alimentos que por su bajo grado de procesamiento y debido a los requerimientos de manejo, almacenamiento y transporte, son altamente susceptibles a deshidratarse, deteriorarse, contaminarse y perder su apariencia, sabor y valor nutricional (Embuscado & Huber, 2009). Los recubrimientos para alimentos están compuestos por sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus

siglas en inglés), que se definen como aquellas que son agregadas intencionalmente a un alimento y que son reconocidas por la FDA o alguna otra asociación gubernamental de alimentación (con respaldo científico) como segura para ser ingerida bajo las condiciones de uso (FDA, 2019).

De acuerdo con Acevedo-Fani *et al.* (2017) los recubrimientos en alimentos se pueden utilizar para inmovilizar ingredientes activos en la superficie del alimento. El líquido de hidroconservación puede ser el medio que contenga partículas de dichos ingredientes activos que promuevan la conservación de los alimentos, actuando en conjunto con las partículas de algún agente formador de película que permita inmovilizar los ingredientes activos en la superficie del alimento. Los compuestos activos pueden encontrarse de diversas formas en el medio de hidroconservación. Hoy en día los recubrimientos comestibles incorporados con nanoestructuras como sistemas de liberación controlada de sabores, colorantes, sustancias antimicrobianas y antioxidantes representan una de las alternativas más viables para prolongar la vida útil de los alimentos (González-Reza *et al.*, 2018).

1.5. Nanotecnología.

En los últimos años ha habido un notable incremento en el estudio y la aplicación de nanoestructuras en varias áreas del conocimiento, incluida la ciencia de los alimentos. La mejor definición de nanotecnología es esta: La nanotecnología es el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control y la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nano escala (Díaz, 2012). Esta ciencia ha sobresalido debido a las propiedades de los nanomateriales como vehículos de liberación controlada para sustancias bioactivas, pero también debido a que promueven la solubilidad y biodisponibilidad de dichos compuestos y los protegen durante la manufactura y el almacenamiento (Pathakoti *et al.*, 2017).

La aplicación de la nanotecnología en el sector alimentario generalmente apunta a mejorar la sensibilidad sensorial (sabor, color, sabor, textura, consistencia), nutricional (mejor absorción y biodisponibilidad de nutrientes), mejorar las características de los alimentos y

nuevos suplementos para la salud, desarrollo de nuevos materiales de envasado de alimentos (mejorando las propiedades mecánicas, antimicrobianas, y las propiedades de barrera en comparación con materiales de mayor escala) y también al desarrollo de nanosensores acumulados para obtener mejores condiciones de monitoreo y trazabilidad de productos durante el almacenamiento y el transporte. Por lo anteriormente mencionado, la nanotecnología presenta productos más seguros, más baratos, duraderos, mejor diseñados, e incluso inteligentes, que tienen amplias aplicaciones en el hogar, las comunicaciones, la medicina. Así mismo, la nanotecnología se puede utilizar en el sector alimentario para mejorar las características sensoriales y nutricionales de los alimentos, y para desarrollar suplementos para la salud y nuevos materiales de envasado de alimentos, reducir el uso de sustancias no GRAS e inclusive para prolongar la vida útil del producto (Prasad, Kumar & Kumar, 2017). Para comprender por completo el tema de la nanotecnología es necesario definir los nanomateriales.

1.5.1. Nanomateriales.

Los nanomateriales se pueden definir como un "material insoluble o biopersistente fabricado intencionalmente con una o más dimensiones externas, o una estructura interna, en la escala de 1 a 100 nanómetros", como se detalla en el reciente Reglamento de Cosmética de la CE [(CE) No 1223 / 2009]]. Otra definición dada por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), es "cualquier material que tenga una o más dimensiones en el rango de nanoescala" (Prasad, Kumar & Kumar, 2017). En la actualidad existen una gran diversidad de nanomateriales o materiales nanoestructurados, los cuales pueden clasificarse de diferentes maneras, por su procedencia, su naturaleza química, por su tamaño o de acuerdo a las dimensiones debido a sus elementos estructurales, grupos, moléculas o cristales (Cornejo, 2015). En esta última los materiales se identifican en base a las dimensiones que no están confinadas al rango de nanoescala (<100nm) (Ashby, Ferreira & Schodek, 2009). A continuación, en la Tabla 3, se presenta la clasificación dimensional de los nanomateriales.

Tabla 3. Clasificación de nanomateriales de acuerdo con las dimensiones de sus elementos estructurales (Bajpai *et al.*, 2018; Cornejo, 2015).

ESTRUCTURA	DEFINICIÓN	NANOMATERIALES
Cero Dimensional (0D)	Las tres dimensiones (x, y, z) son menores a 100 nm. Los electrones están confinados en las tres dimensiones.	<ul style="list-style-type: none"> • Nanopartículas. • Nanoclusters. • Puntos cuánticos.
Unidimensional (1D)	Dos de sus dimensiones son menores a 100 nm. Los electrones están confinados en dos dimensiones.	<ul style="list-style-type: none"> • Nanovarillas. • Nanotubos. • Nanocables. • Nanocampanas. • Nanofibras.
Bidimensional (2D)	Una dimensión es menor a 100 nm. Los electrones se encuentran confinados en esa dimensión.	<ul style="list-style-type: none"> • Nanopelículas delgadas. • Monocapas. • Películas multicapas.
Tridimensional (3D)	Ninguna dimensión es menor a 100 nm, por lo que los electrones no están confinados y se mueven libremente.	<ul style="list-style-type: none"> • Policristales. • Nanobolas. • Nanobobinas. • Nanoflores.

Dentro de los nanomateriales se encuentran aquellos que son el objetivo de este estudio: las nanopartículas, las cuales son una entidad discreta cuyas tres dimensiones se encuentran en nanoescala (Prasad, Kumar & Kumar, 2017).

1.5.2. Nanopartículas.

El término "nanopartículas" es muy general e identifica principalmente partículas ultrafinas medibles dentro de la escala nanométrica. La definición de nanopartícula difiere según los materiales, los campos y la aplicación a la que se refiere. En un sentido estricto, se consideran partículas menores de 10–20 nm, pero, en general, todas las partículas en el rango de 1 nm – 1 mm aún pueden definirse como nanopartículas. Los parámetros principales de las

nanopartículas son su forma (incluidas las relaciones de aspecto cuando corresponde), el tamaño y la subestructura morfológica de la sustancia (Bhushan, 2016; Quintanar-Guerrero *et al.*, 2008).

Las propiedades de los materiales a nanoescala pueden ser muy diferentes de los macromateriales. Las nanopartículas representan un puente entre materiales a gran escala y estructuras atómicas, iónicas o moleculares. Los materiales a gran escala deben tener propiedades físicas constantes independientemente de su tamaño, mientras que a escala nanométrica, a menudo se observan propiedades dependientes del tamaño (Bhushan, 2016). Esto puede basarse en nanomateriales que tienen un área de superficie relativa aumentada y los efectos cuánticos, que pueden predominar en el comportamiento de la materia a nanoescala. Estas áreas de contacto más altas y los efectos de puntos cuánticos pueden mejorar o cambiar propiedades, como la reactividad, la resistencia y las características eléctricas (Prasad, Kumar & Kumar, 2017).

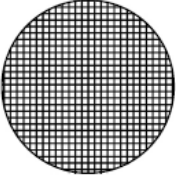

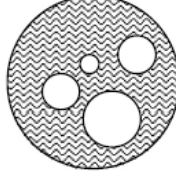

Los cambios en las propiedades físicas con el tamaño de partícula se denominan "efectos de tamaño": al disminuir el tamaño de partícula, las partículas sólidas generalmente tienden a mostrar diferentes propiedades de los materiales a grande escala debido a la mayor importancia de la superficie sobre la masa. Incluso las propiedades físicas como el punto de fusión y la constante dieléctrica pueden cambiar. Además, es importante subrayar que el "efecto de tamaño" no solo permite discriminar entre las propiedades físicas de la materia a gran escala en comparación con las nanopartículas, sino también distinguir entre las nanopartículas que tienen diferentes distribuciones de tamaño. Para materiales mayores de un micrómetro, la fracción de átomos, iones o moléculas en la superficie es insignificante en relación con la fracción correspondiente a su volumen. En las nanopartículas, la fracción de átomos, iones, moléculas ubicadas en la superficie se vuelve mayor y, por lo tanto, más activa porque está sujeta a fuerzas de interacción asimétricas debido a un estado de enlace diferente, los enlaces en la interfaz entre sólido y vacío (o líquido o atmósfera) están rotos. Esto afecta las propiedades de la partícula en sí o su interacción con otros materiales (Bhushan, 2016).

Dentro de las ventajas que ofrecen las nanopartículas es de destacar que los sistemas nanoparticulados muestran ser prometedores como vectores activos debido a su capacidad para liberación de sustancias (Cruz *et al.*, 2006; Amaral *et al.*, 2007) su tamaño subcelular permite una absorción intracelular relativamente mejor comparada con otros sistemas particulados (Furtado *et al.*, 2001), pueden mejorar la estabilidad de sustancias activas (Ourique *et al.*, 2008) y pueden ser biocompatibles con tejidos y células cuando son sintetizadas a base de materiales igualmente biocompatibles o biodegradables (Elaissari *et al.*, 2009).

Existen diferentes formas de clasificar las nanopartículas. La más general es de acuerdo a su estructura morfológica, la cual se presenta en la Tabla 4, y que incluye a las nanopartículas de matriz simple, nanopartículas de membrana-núcleo, de dispersión y combinadas. Las nanopartículas desarrolladas en este experimento son del tipo membrana-núcleo, las cuales consisten en un núcleo interior de un sola fase rodeado por una membrana exterior. Dentro de este tipo de nanopartículas podemos encontrar una subclasificación basada en el tipo de moléculas que conforman la membrana exterior, la cual incluye las nanopartículas poliméricas y las nanopartículas lipídicas.

Las nanopartículas lipídicas son aquellas en que, como su nombre lo dice, se utiliza un lípido para conformar la membrana exterior. Los lípidos son moléculas insolubles en agua compuestas por un extremo polar y un cuerpo no polar que se someten a un autoensamblaje supramolecular en medios acuosos. Este autoensamblaje es impulsado por la hidrofobicidad que obliga a las moléculas anfifílicas a exponer el extremo polar de la molécula al agua, confinando la parte no polar en el núcleo de la micela. Viceversa, cuando las moléculas anfifílicas se inyectan en un solvente no polar, se obtienen micelas inversas. En las micelas inversas, los grupos polares están en el núcleo y la parte no polar del lípido afuera. El tamaño de las micelas puede controlarse tanto por la naturaleza de las moléculas anfifílicas como por las condiciones ambientales, entre las cuales se encuentran la concentración de lípidos, la temperatura o el pH (Cassano & Vollani, 2018).

Tabla 4. Clasificación de las nanopartículas de acuerdo con sus características estructurales (Augustin & Oliver, 2012).

NANOPARTÍCULAS	DESCRIPCIÓN ESQUEMÁTICA
1. De matriz simple: Partículas que consisten de una sola fase.	
2. De membrana-núcleo: Consiste en un núcleo interno de una fase rodeado por una capa externa de otra fase. La carcasa puede estar compuesta de una monocapa o múltiples capas concéntricas.	
3. Dispersión: Consiste en una fase dispersa como partículas pequeñas dentro de otra fase (matriz).	
4. Combinación. Alguna combinación de lo anterior (1 a 3) p. Ej. un núcleo en dispersión atrapado dentro de una membrana.	

Por otro lado, se encuentran las nanopartículas poliméricas, en las cuales la membrana exterior se encuentra formada por un material polimérico. Un polímero es una molécula grande (macromolécula) compuesta de unidades estructurales repetitivas. Por polimerización, muchas moléculas pequeñas (es decir, monómeros) se combinan y conectan mediante enlaces químicos covalentes (Wallner & Lang, 2013). En alimentos, existen diferentes materiales poliméricos que se utilizan debido a que son sustancias GRAS, entre los

cuales se encuentran principalmente los compuestos por carbohidratos y por proteínas. Las nanopartículas desarrolladas durante esta experimentación son de tipo polimérico.

1.5.3. Nanopartículas poliméricas.

Generalmente se definen como partículas sólidas coloidales que incluyen a las nanoesferas y a las nanocápsulas, y que pueden ser preparadas por polimerización o con polímeros preformados (Elaissari *et al.*, 2009). Las nanocápsulas se diferencian de las nanoesferas en que son una forma de contenedor, en el que la envoltura del material sólido rodea un núcleo líquido o semisólido a temperatura ambiente. Por otro lado, las nanoesferas son partículas de densa matriz polimérica, cuya masa entera es sólida (Vauthier & Bouchemal, 2008). Pueden ser hidrofílicas o lipofílicas de acuerdo al método de preparación y a los materiales utilizados. Además, teniendo en cuenta las limitaciones operativas de los métodos de preparación, pueden transportar el principio activo en sus superficies o embeberlo en la matriz lipídica (Elaissari *et al.*, 2009; Vauthier & Bouchemal, 2008). En la Figura 2 se presentan diferentes estructuras nanoparticulares.

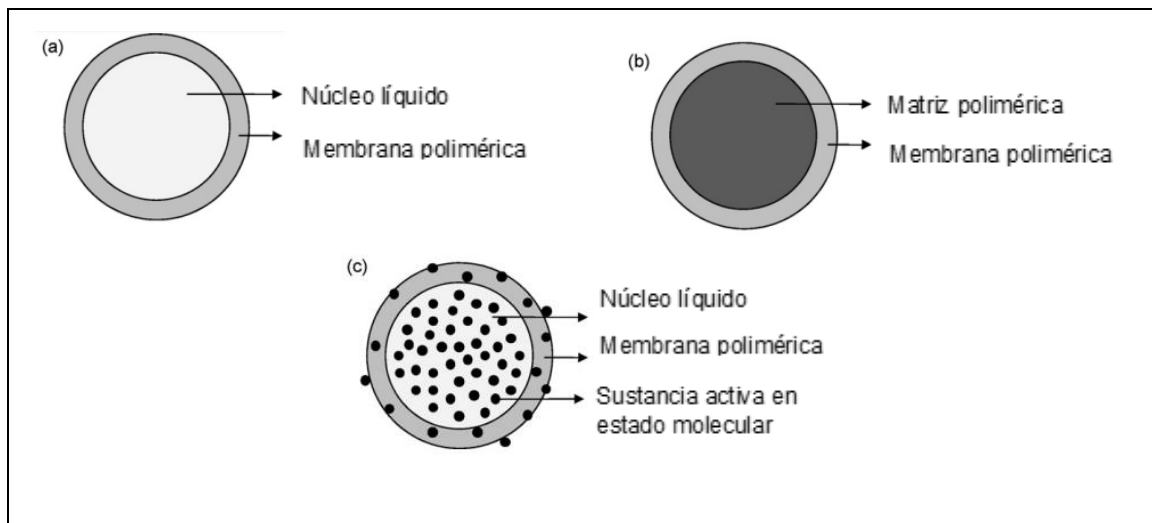


Figura 2. Diferentes estructuras nanocapsulares poliméricas: (a) nanocápsulas con núcleo líquido, (b) nanoesferas de matriz polimérica y (c) nanocápsulas con sustancia activa en dispersión molecular (Elaissari *et al.*, 2009)

De acuerdo con Zambrano-Zaragoza *et al.* (2018) es posible conferir propiedades funcionales a un recubrimiento alimenticio cuando se encapsulan moléculas antioxidantes o antimicrobianas en nanopartículas poliméricas, las cuales se adhieren al alimento por medio del recubrimiento alimenticio.

1.5.4. Componentes de las nanopartículas poliméricas.

1.5.4.1. Membrana polimérica.

Existe un gran número de polímeros naturales y sintéticos que pueden utilizarse para formar las membranas de las nanopartículas poliméricas, no obstante, estos deben cumplir con una serie de requisitos para ser aptos para consumo humano. En primer lugar, no deben ser tóxicos. En segundo lugar, deben ser biodegradables o al menos fáciles de eliminar del cuerpo en un breve periodo de tiempo, permitiendo repetir la ingesta sin riesgos a la acumulación descontrolada en el cuerpo. Como tercer requisito, es necesario que sean compatibles con el alimento en el que se utilizará y útiles para la liberación de la sustancia activa de acuerdo con los propósitos del investigador (Vauthier & Bouchemal, 2008). Tanto en nanoesferas como en nanocápsulas, el tipo de polímero utilizado tiene un papel clave en las características más significantes de las nanopartículas poliméricas en relación con el compuesto activo; por ejemplo, en la eficiencia de encapsulación/atrapamiento de la sustancia activa, la tasa de liberación, el proceso de degradación y la capacidad protectora, entre otras (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2018).

A lo anterior hay que sumar que en la actualidad existe en consumidores y productores una mayor preocupación ambiental y ecológica, y que si dejar del lado la seguridad alimentaria, los ha llevado a buscar materiales biológicos que sustituyan a los aditivos alimentarios artificiales. Una de estas alternativas son los biopolímeros, los cuales son usualmente derivados de proteínas, lípidos, celulosa, almidones y otros polisacáridos, incluidos los que son artificialmente sintetizados a partir de monómeros naturales (Vahedikia *et al.*, 2019).

A pesar de que los biopolímeros proteicos tienen grandes ventajas por su abundancia en la naturaleza, por ser sustancias GRAS y por sus excelentes propiedades funcionales, tales como biodegradabilidad, citocompatibilidad y alto valor nutricional (Wang & Zhang, 2019), suelen presentar ciertas desventajas en comparación con materiales sintéticos; dentro de estas desventajas se incluyen menor temperatura de degradación y mayor permeabilidad. Como respuesta a estos inconvenientes se ha recurrido al uso de aditivos y al uso de nanotecnología, ya que como se mencionó con anterioridad, las características químicas, biológicas, eléctricas, térmicas, mecánicas, ópticas y magnéticas de nanomateriales son diferentes de los materiales a grande escala (Kassai, 2018).

Dentro de los biopolímeros de fácil obtención en la actualidad podemos encontrar a la zeína. La zeína es la principal proteína del maíz, ya que representa un poco más de la mitad de las proteínas totales del endospermo del grano. Es una prolamina rica en ácido glutámico (21–26%), leucina (20%), prolina (10%) y alanina (10%), pero deficiente en aminoácidos básicos y ácidos, como lo son el triptófano y lisina (Shukla & Cheryan, 2001). Se obtiene como subproducto de fácil extracción en la industria del jarabe de maíz. Biológicamente es una mezcla de 4 proteínas: α -zeína (19 y 22 kDa), β -zeína (14 kDa), γ -zeína (16 y 27 kDa) y δ -zeína (10 kDa) (Yong *et al.*, 2015). Las α -zeínas son las de mayor importancia económica y contribuyen con más del 70% del total de la composición total de la zeína (Liu *et al.*, 2019; Kassai, 2018). La zeína se encuentra en "cuerpos zeínicos" de 1 mm distribuidos uniformemente en todo el citoplasma de las células de endospermo de maíz entre gránulos de almidón de 5–35 μ m (Shukla & Cheryan, 2001). Esta proteína es conocida por su solubilidad en solventes binarios alifáticos inferiores que contienen un alcohol y agua, como el etanol y el isopropanol acuosos, y por su insolubilidad en agua sola (Lawton, 2002).

El primer uso comercial importante de zeína fue para recubrimientos. Cuando el Shellac era escaso durante la Segunda Guerra Mundial, la zeína estaba en gran demanda como reemplazo en lacas, barnices y revestimientos (Lawton, 2002). La gelificación de la zeína podría ser el resultado de la desnaturalización consecuente a la solución y / o debido a la presencia de "cuerpos" insolubles que actúan autocatalíticamente para precipitar o gelificar la zeína (Shukla & Cheryan, 2001). A lo largo de la historia, debido a sus propiedades de barrera y

formadoras de película, así como por sus ventajas sobre otras proteínas, la zeína ha sido ampliamente estudiada, y más recientemente, con aplicaciones en el campo de nanotecnología (Gaona-Sánchez *et al.*, 2015; Gezer *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2014; Kashiri *et al.*, 2017; Panchapakesan *et al.*, 2012; Wang, Fu, & Wang, 2009, citados por Spasojevic *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Kassai, 2018).

1.5.4.2. Núcleo líquido.

Algunos componentes de interés en los alimentos que sirven como matriz de ciertas nanoestructuras se encuentran naturalmente en la escala submicrométrica (lípidos, proteínas y carbohidratos, principalmente), lo que facilita el proceso de nano estructuración en formas individuales o conjugadas. En este proyecto se utilizó un núcleo líquido, compuesto por aceite esencial de toronja.

1.5.4.2.1. Aceite esencial de toronja.

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos y volátiles obtenidos de diferentes partes de las plantas (hoja, tallo, corteza, brote, flor o semilla) y son ampliamente utilizados como saborizantes y aromatizantes (Aliakbarlu *et al.*, 2013). Cerca de 3000 aceites esenciales extraídos de distintas plantas han sido reportados, pero sólo 300 tienen importancia económica y uso dentro de las industrias de fragancias, alimentos, farmacéutica, agrícola y sanitaria (Basak & Guha, 2018).

Existen varios métodos para extraer aceites esenciales. Estos pueden incluir el uso de dióxido de carbono líquido, microondas, y principalmente destilación a baja o alta presión empleando agua hirviendo o vapor caliente. Debido a sus propiedades bactericidas y fungicidas, los usos farmacéuticos y alimenticios de estas sustancias, están cada vez más extendidos como alternativas a los productos químicos sintéticos, ya que permiten proteger el equilibrio ecológico. En esos casos se prefiere la extracción por destilación al vapor o por presión en frío, como en cítricos (Bakkali *et al.*, 2008).

Cada aceite esencial es una mezcla compleja de terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, y sus derivados oxigenados, tales como alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, cetonas, fenoles y óxidos), compuestos fenólicos y fenilpropanoides derivados del ácido mevalónico y del ácido siquímico, respectivamente (Basak & Guha, 2018). Los terpenos son combinaciones de varias unidades de 5 carbonos (C5) llamadas isoprenos. Los terpenos forman los bloques de construcción de los monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) y secuencias mayores (Bakkali *et al.*, 2008). Un terpeno que contiene oxígeno se llama terpenoide. Estos compuestos constituyen 80-90% de los componentes totales de los aceites esenciales y les permiten tener una gran variedad de estructuras (Basak & Guha, 2018).

La toronja (*Citrus paradisi*) es un fruto muy conocido por su alto valor nutritivo (USDA, 2019). Se distribuye a lo largo de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, a una altitud variable que va de 0 a 1800 m (Liu *et al.*, 2019) y a una temperatura de 13° a 35°C. Su cáscara está constituida por un amplio número de compuestos que pueden clasificarse en 7 grupos: terpenos, hidrocarburos sesquiterpénicos, alcoholes, aldehídos, ésteres, óxidos y otros compuestos. Los terpenos representan los compuestos prevalecientes: éstos incluyen limoneno, mirceno, citral y terpino, y equivalen aproximadamente al 85% del total (Cristóbal-Luna *et al.*, 2018).

Con respecto a la composición de las semillas de toronja, hay menor número de informes, sin embargo, se ha descrito que tienen un alto contenido de aceites esenciales, contenido que alcanza el 36,5%, así como 13,5% de humedad, 8,5% de fibra y 4.1% consistente en una mezcla compleja de lípidos, alcoholes, ácidos grasos, tocoferol, flavonoides, polifenoles y limonoides aglicona. Curiosamente, los compuestos como los flavonoides y los polifenoles favorecen el desarrollo de la semilla al protegerlas de los depredadores. El jugo de toronja es también una mezcla compleja con una variedad de componentes, que poseen alto valor nutritivo y que puede participar en la mejora de la salud humana (Cristóbal-Luna *et al.*, 2018). El aceite esencial utilizado en este proyecto es extraído de la cáscara de la toronja, por lo que en la Tabla 5 se resumen sus principales componentes.

Tabla 5. Principales componentes fenólicos de la cáscara de toronja (Cristóbal-Luna *et al.*, 2018).

COMPUESTO	CANTIDAD (%)
Terpenos	
Limoneno y D-limoneno	75.07
Mirceno y β -mirceno	5.32
α y γ -terpineno	1.58
α y β -pineno	1.26
Citral	1.22
α y β -felandreno	1.21
Hidrocarburos sesquiterpénicos	
α y β -cariofileno	3.91
Valenceno	3.36
Germacreno A, C y D	0.86
Alcoholes	
Cis, trans, <i>E</i> y <i>Z</i> -carveol	3.5
Citronelol	1.78
Aldehidos	
Octanal	1.14
Decanal	0.61
Ésteres	
Acetato de carvilo	0.66
Ftalato	0.54
Oleato y palmitato de metilo	0.50
Óxidos	
Óxido de β -cariofileno	0.56
Óxido de limoneno	0.28
Otros	
Isoforona	1.29
Carvona y D-carvona	0.84

1.5.4.2.2. Aceites esenciales como sustancias activas.

Las sustancias activas pueden entenderse como aquellas que confieren ciertos beneficios funcionales a alimentos, como incrementar la vida útil y retrasar cambios indeseables en la frescura de los productos (Yousuf *et al.*, 2018). Dentro de estas podemos encontrar

antioxidantes, antimicrobianos, probióticos, prebióticos, colorantes y saborizantes (González-Reza *et al.*, 2018). Entre los productos naturales, los aceites esenciales extraídos de las especias y hierbas han demostrado poseer actividad antimicrobiana y antioxidante (Weiss *et al.*, 2009; Donsi *et al.*, 2019; Bag y Chattopadhyay, 2018), por lo que en este proyecto el mismo núcleo líquido se encuentra formado por la sustancia activa, aceite esencial de toronja.

Como ya se mencionó, la oxidación en pera se debe principalmente a la actividad de la PPO, la cual se puede dividir en dos subclases de enzimas, el primer tipo lo constituyen las catecol oxidasas (E.C. 1.10.3.1) y el segundo tipo las lacasas (E.C.1.10.3.2.), sin embargo, se ha cuestionado que las lacasas estén involucradas en los procesos de oscurecimiento enzimático ya que están ausentes en la mayoría de los vegetales (Pérez, 2003), por lo que las enzimas de mayor interés son las catecol oxidasas, que catalizan dos reacciones distintas:

- Reacción 1 o Actividad cresolasa.
- Reacción 2 o Actividad catecolasa.

Estas dos reacciones enzimáticas consumen oxígeno y son conocidas en la literatura por el apelativo de actividad monofenolasa (o cresolasa) y actividad *o*-difenolasa (o catecolasa). La actividad cresolasa de la enzima es reflejo de un comportamiento de oxigenasa, mientras que la actividad catecolasa es un claro exponente de la actividad enzimática de una oxidasa. La hidroxilación de monofenoles (reacción 1) es propia de una monofenol monooxigenasa, tirosinasa, monofenolasa o cresolasa y la oxidación a quinonas (reacción 2) propia de una difenol oxidasa, difenolasa o catecolasa (Pérez, 2003),

Existen diferentes métodos físicos y químicos que buscan inhibir la actividad de la PPO, sin embargo, en este caso nos enfocaremos en el uso de sustancias denominadas antioxidantes. Los antioxidantes son sustancias presentes en alimentos que, al encontrarse en bajas concentraciones comparado con un sustrato oxidativo, retrasan o previenen la oxidación. Algunos antioxidantes de grado alimenticio han sido utilizados para prevenir el deterioro de la calidad de productos y mantener su valor nutricional (Shahidi, 2000). De acuerdo con

González-Reza *et al.* (2018), los antioxidantes pueden clasificarse en dos grupos: sintéticos y naturales. Dentro de los antioxidantes artificiales podemos encontrar el hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) y galato de propilo (PG), principalmente. Debido al potencial cancerígeno de los antioxidantes artificiales y al actual incremento en la demanda por parte del consumidor de alimentos con aditivos naturales, el enfoque del desarrollo de nuevas tecnologías de conservación ha cambiado. Los compuestos fenólicos, (ácidos fenólicos y flavonoides), carotenoides (β -carotenos y licopeno), tocoferoles (vitamina E) y ácido ascórbico (vitamina C), presentes de forma natural en frutas y hierbas, han sido ampliamente estudiados y empleados en la industria alimentaria (González-Reza *et al.*, 2018).

La actividad antioxidante de un compuesto en particular, una mezcla de compuestos, o una fuente natural que contenga dicho reactivo está generalmente relacionada con 5 mecanismos de acción: (i) su capacidad para eliminar radicales libres, (ii) su potencial como quelante de iones metálicos para evitar que generen especies reactivas o descompongan peróxidos lipídicos, (iii) su facultad de unirse a moléculas de oxígeno para prevenir la formación de peróxidos, (iv) poder para romper la cadena autoxidativa y (v) reducir las concentraciones localizadas de oxígeno (Brewer, 2011). El alto contenido de sustancias como limoneno ($72 \pm 1.75 \%$), β -mirceno ($5.55 \pm 0.55 \%$), *n*-octanal ($4.3 \pm 0.41 \%$), linalol ($2.11 \pm 0.01 \%$) y *trans*- β -cariofileno ($1.8 \pm 0.15 \%$) confieren al aceite esencial de toronja diferentes propiedades que actúan como mecanismos de acción antioxidante reduciendo *o*-quinonas a difenoles incoloros de baja reactividad, actuando como quelantes del centro activo de cobre de la PPO y rompiendo la cadena autoxidativa (Pérez, 2003; Rojas *et al.*, 2009).

Por otro lado, los agentes antimicrobianos son aquellas sustancias que eliminan o inhiben el crecimiento de microorganismos (Zhang *et al.*, 2010). Al igual que otras sustancias bioactivas, los agentes antimicrobianos son sustancias reactivas que pueden causar problemas considerables cuando son embebidos en una matriz alimenticia compleja, como efectos negativos sobre la estabilidad fisicoquímica o la integridad nutritiva, así como la defraudación de la actividad biológica y otras sustancias bioactivas ya presentes en el alimento. Esto ha llevado a buscar concentraciones que sean lo suficientemente altas para inhibir el

crecimiento microbiano y que cumpla con las regulaciones alimentarias, y que al mismo tiempo provoquen alteraciones mínimas en las propiedades cualitativas de un producto (Weiss *et al.*, 2009). Esto se ha solucionado mediante la nanoencapsulación de sustancias antimicrobianas, ya que las protege de interacciones con ingredientes de los alimentos, permite su concentración en áreas críticas de localización de microorganismos, y debido al tamaño subcelular, incrementa su absorción y bioactividad (Donsi *et al.*, 2019).

Fundamentalmente, los antimicrobianos pueden actuar de dos maneras: como perturbadores de la membrana bacteriana o como inhibidores de la dinámica de transferencia de protones. Ejemplos de estos últimos son los ácidos orgánicos débiles, como el ácido benzoico y el ácido sórbico, que se han utilizado ampliamente como conservantes para inhibir el crecimiento de microorganismos en las bebidas (Weiss *et al.*, 2009).

La eficacia de estos ácidos orgánicos débiles es una función del pH ambiental. Esto se debe a que algunas de las moléculas de ácido débil se disocian en solución para formar los aniones ácidos cargados negativamente, mientras que otras moléculas permanecen sin disociarse. Solo las moléculas de ácido orgánico no disociadas pueden penetrar en la envoltura de la célula bacteriana, mientras que los aniones disociados son repelidos debido a las interacciones electrostáticas. Dado que la concentración del ácido no disociado aumenta a medida que disminuye el pH, las concentraciones más altas de compuestos activos pueden migrar al espacio intracelular a un pH más bajo para inhibir reacciones metabólicas esenciales. Alternativamente, los antimicrobianos pueden actuar como perturbadores de la membrana al insertarse en la membrana microbiana, interrumpiendo así la estructura y funcionalidad de la bicapa de fosfolípidos. A su vez, la membrana pierde su capacidad de actuar como una barrera, impidiendo el intercambio de material entre el interior y el exterior de la célula y su capacidad de albergar y regular la funcionalidad de los complejos de proteínas, los cuales están suspendidos en la bicapa (Weiss *et al.*, 2009).

Puesto que el aceite esencial usualmente se obtiene de una mezcla de extractos de semillas, cáscara y jugo, los principales compuestos que lo conforman son: limoneno (72 ± 1.75 %), β -mirceno (5.55 ± 0.55 %), *n*-octanal (4.3 ± 0.41 %), linalol (2.11 ± 0.01 %) y *trans*- β -

cariofileno (1.8 ± 0.15 %) (Rojas *et al.*, 2009). Gracias a estos componentes es que el aceite esencial de toronja puede actuar como antimicrobiano, perturbando la membrana bacteriana, como inhibidor de la dinámica de transferencia de protones y como acidulante del medio (Pérez, 2003; Brewer, 2011; Weiss *et al.*, 2009).

1.5.4.2.3. Pluronic-F127® como estabilizante de núcleos lipídicos.

El núcleo líquido y/o semisólido, cuando es lipídico, se suele estabilizar con agentes tensioactivos, y permiten incorporar sustancias activas hidrofílicas a las nanopartículas (González-Reza *et al.*, 2018). En este proyecto se utilizó Pluronic-F127® como estabilizante para el núcleo de aceite esencial de toronja.

Los pluronics, también conocidos como poloxámeros, son una clase de copolímeros de bloques sintéticos. De acuerdo con la IUPAC, los copolímeros de bloques son sustancias formadas por macromoléculas constituidas por bloques dispuestos en una secuencia lineal. Para este organismo, un bloque es una porción de una macromolécula, que comprende varias unidades constitutivas, que tiene al menos una característica que no está presente en las porciones adyacentes. Existen copolímeros formados por dos o por tres bloques, a los que se suelen simbolizar, respectivamente, como AB y ABA o BAB, donde A y B son los bloques poliméricos. También son posibles copolímeros en bloques constituidos por la repetición de unidades formadas por dos bloques, $(AB)_n$ y por la incorporación aun polímero de dos bloques de una tercera cadena (ABC). Otros tipos de copolímeros formados por bloques son los copolímeros injertados (en inglés, graft copolymer) y los copolímeros estrella. Los copolímeros injertados están constituidos por macromoléculas con uno o más tipos de bloques conectados a una cadena principal formando cadenas laterales; estas cadenas laterales tienen características constitutivas o configuracionales diferentes a las de la cadena principal. Las macromoléculas de los copolímeros estrella contienen un punto de ramificación del cual emanan cadenas lineales (Pasquali, Chiappetta & Bregni, 2005). En la Figura 3 se muestran los principales tipos de copolímeros.

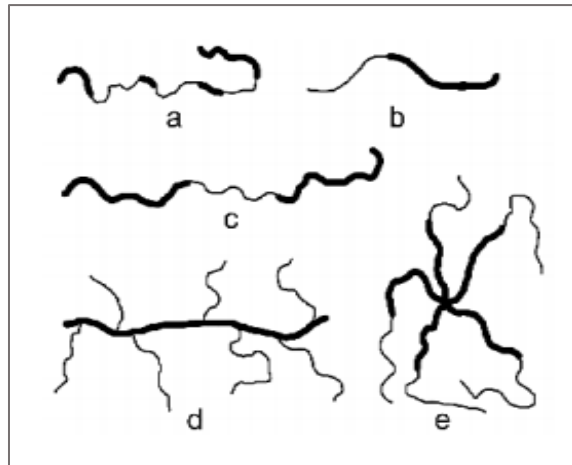


Figura 3. Tipos de copolímeros: (a) al azar, (b) dibloque, (c) tribloque, (d) de injerto y (e) estrella (Pasquali, Chiappetta y Bregni, 2005).

El pluronic-F127[®] es un copolímero de poli (óxido de etileno) (PEO) hidrófilo y poli (óxido de propileno) (PPO) hidrofóbico, dispuestos en una estructura tribloque ABA, dando así una estructura de PEO-PPO-PEO (Figura 4) (Bearat & Vernon, 2011). Este grupo de polímeros sintéticos es termorreversible en soluciones acuosas. La transición sol-gel se rige por la composición, el peso molecular y la concentración de cada polímero de bloque constituyente. El óxido de etileno hidrofílico y el óxido de propileno hidrofóbico le confieren una estructura anfifílica, lo que significa que tiene un grupo polar soluble en agua unido a una cadena de hidrocarburo no polar insoluble en agua (Shirwaiker, Purser & Wysk, 2014).

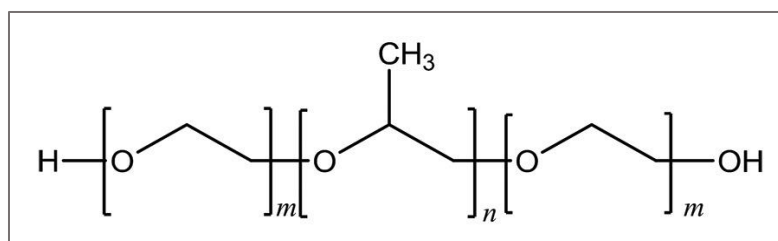


Figura 4. Estructura molecular de Pluronic-F127[®] (Uchôa *et al.*, 2015).

Debido a sus características anfifílicas, los pluronics poseen propiedades tensioactivas que les permiten interactuar con superficies hidrofóbicas y membranas biológicas. Ser anfifílico

también da como resultado la capacidad de los copolímeros individuales, conocidos como unímeros, para combinarse y formar micelas en soluciones acuosas. Cuando la concentración de los copolímeros es inferior a la concentración crítica de micelas, los unímeros permanecen como soluciones moleculares en agua. Sin embargo, a medida que la concentración de copolímero de bloque aumenta por encima de la CMC, los unímeros se autoensamblarán y formarán micelas, que pueden adoptar geometrías esféricas, en forma de varilla o lamelares. Sus formas dependen de la longitud y concentración de los copolímeros de bloque (es decir, EO y PO) y la temperatura. Las micelas generalmente tienen un núcleo hidrófobo, en este caso las cadenas PO, y una capa hidrofílica, las cadenas EO (Bearat & Vernon, 2011).

1.5.5. Fructanos de agave (Inulina).

Los fructanos de agave son polisacáridos también conocidos como inulina, siendo compuestos de almacenamiento derivados de plantas, están conformados por múltiples unidades de fructosa unidas por enlaces β -(2-1) fructosil-fructosa. Estos polisacáridos son en su mayoría lineales, aunque puede existir un pequeño número de unidades ramificadas con enlaces β -(2-6). En términos de arreglo, la columna vertebral de una molécula de fructano de agave puede contar desde 2 hasta aproximadamente 60 unidades de fructosa; por lo tanto, pueden ser clasificado según el grado de polimerización (Morreale *et al.*, 2019). Los fructanos de tipo inulina con un promedio de polimerización inferior a 10 unidades se denominan fructo-oligo sacáridos (FOS), mientras que tiene encima de 10 son generalmente denominados como inulina (Drabinska *et al.*, 2018). No obstante, existen dos tipos comunes de inulina, los fructanos de agave y los de achicoria. En este proyecto se utilizaron fructanos de agave.

Estos polisacáridos han sido designados como una sustancia GRAS, además, gracias a su configuración β , son resistentes a la actividad hidrolítica de las enzimas del tracto digestivo superior humano; al ser capaces de llegar parcialmente o no digeridos al intestino grueso, pueden ser fermentados selectivamente por las bacterias beneficiosas del intestino grueso. Estas características hacen que estos fructanos de agave se clasifiquen como fibras dietéticas solubles prebióticas (Morreale *et al.*, 2019). Gracias a estas propiedades y a que

son el segundo polisacárido de almacenamiento vegetal más abundante, estos fructanos han adquirido una gran importancia dentro de la industria alimenticia y son objeto de estudio para desarrollo de nuevos productos (Drabinska *et al.*, 2018; Morreale *et al.*, 2019).

1.5.6. Carboximetilcelulosa (CMC).

La CMC es un polisacárido semisintético iónico que tiene una estructura lineal compuesta en su totalidad por β -d-glucosa y sal β -d-glucopiranosil-2-O-(carboximetil)-monosódica conectados mediante enlaces β - (1,4-glicosídicos) (Yuliarti *et al.*, 2019). El tratamiento de la pulpa de madera purificada con una solución al 18% de hidróxido sódico produce celulosa alcalina. Cuando la celulosa alcalina se hace reaccionar con la sal sódica del ácido cloroacético, se forma la sal sódica del éter carboximético (celulosa-O-CH₂-CO₂Na), componente principal de la CMC (BeMiller & Whistler, 1996).

Las moléculas de CMC son largas y bastante rígidas, con carga negativa debido a los numerosos grupos carboxílicos ionizados que contienen, y la repulsión electrostática hace que sus moléculas en solución adopten una forma extendida. De la misma forma, las cadenas adyacentes se repelen entre sí. En consecuencia, las soluciones de CMC tienden a ser altamente viscosas y estables. La CMC se encuentra disponible en una gran variedad de tipos de viscosidad. La CMC estabiliza las dispersiones de proteínas, de manera especial aquellas que se encuentran cerca de su punto de pH isoelectrico (BeMiller & Whistler, 1996).

Este polisacárido presenta propiedades funcionales de interés en la industria de alimentos, actúa como aglutinante, como espesante y estabilizante, y forma películas resistentes. Se utiliza en productos como tortillas de maíz por su habilidad de retener agua, en la elaboración de jugos y néctares, rellenos de pie, productos de panificación, como sustituto de grasa, en productos lácteos (helados), en salsas, aderezos y productos elaborados a base de jitomate, entre otros (Badui, 2006).

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA DE INVESTIGACIÓN EXPERIMENTAL.

2.1. Problema.

En la actualidad, existe en México un creciente interés por parte de los consumidores por adquirir alimentos mínimamente procesados con alto valor nutritivo. Así mismo, es menester en la sociedad moderna que estos alimentos sean de fácil acceso y puedan consumirse casi instantáneamente. Las frutas son alimentos nutritivos, fácilmente disponibles y que no requieren de mucho procesamiento para su comercialización. En México, el consumo per cápita de pera asciende a 1 kg anual. Las formas de ingesta de estos frutos en general no se distinguen mucho de otros países. Se comen principalmente frescas durante el desayuno, entre comidas o como postre o bien en ensaladas de frutas. También se usan para preparar pasteles de frutas y compotas o se consumen con crema, chocolate, nueces o caramelizadas con un palillo que las sostenga (ProChile, 2011). En consecuencia, a su bajo procesamiento, este fruto es muy susceptible a sufrir daños físicos durante su transporte, así como deterioros debidos a incorrectas temperaturas de almacenamiento o crecimiento de agentes patógenos. Debido a esto, el mercado de la pera nacional sufre todos los años de grandes pérdidas de producto. En búsqueda de una alternativa que permita conservar y proteger la calidad organoléptica y nutricional de este fruto sin dejar de un lado el mínimo procesamiento, se estudia en este trabajo el efecto de hidroconservación de nanopartículas de aceite esencial de toronja sobre las características fisicoquímicas de la pera (variedad Anjou) pelada y rebanada.

2.2. Objetivos general y particulares.

2.2.1. Objetivo General

Establecer el efecto de la composición del líquido de conservación con fructanos de agave (inulina) y carboximetilcelulosa como polisacáridos de soporte, con y sin nanopartículas de aceite esencial de toronja sobre los cambios de calidad fisicoquímica y actividad enzimática de pera Anjou fresca con y sin pretratamiento con lactato de calcio, cortada y envasada en polipropileno cristal para la selección de la formulación que contribuya a incrementar su tiempo de almacenamiento en refrigeración.

2.2.2. Objetivos Particulares

- 1) Analizar el efecto de la formulación del pretratamiento con lactato de calcio y el líquido de hidroconservación (fructanos de agave y carboximetilcelulosa) con y sin nanopartículas de aceite esencial de toronja, aplicados a pera cortada en gajos y almacenada en refrigeración, mediante la medición de absorción de líquido, índice de oscurecimiento, cambios en el color y textura para la determinación de la formulación que tenga mayor influencia en la conservación del producto.
- 2) Relacionar el efecto de la presencia de fructanos de agave y carboximetilcelulosa con y sin nanopartículas de aceite esencial de toronja en el líquido de hidroconservación sobre la modificación en polifenoles totales y la actividad enzimática polifenoloxidasas (PPO) y pectinmetilesterasa (PME) de pera Anjou cortada en gajos durante el almacenamiento refrigerado, por medio de espectrofotometría (método de Folin-Ciocalteu), para la determinación de la composición que tenga mayor influencia en la conservación del producto.
- 3) Determinar los cambios en color, índice de oscurecimiento, y turbidez del líquido de hidroconservación, asociándolos con su influencia en el incremento del tiempo de almacenamiento refrigerado del producto.

- 4) Asociar la actividad enzimática del líquido de hidroconservación con el cambio en las propiedades del producto y su influencia en el incremento del tiempo de almacenamiento refrigerado.

2.3. Diseño Experimental.

Para la selección de agente reforzador de textura se realizó un experimento previo al establecimiento de formulaciones finales, el cual se detalla en la sección de actividades preliminares.

En total se realizaron 8 experimentos considerado como factores: lactato de calcio (3 %), CMC (0.1 %), fructanos de agave (3 %) y dispersión de nanopartículas (4 %). Los tratamientos que no tenían fructanos de agave y CMC como medio de conservación ni presencia de nanopartículas se conservaron sólo en agua purificada. En la Tabla 6 se muestran los factores y niveles de variación utilizados durante el desarrollo experimental de este trabajo.

Las muestras se envasaron en vasos de polipropileno marca REYMA® (75 g) que se sellaron térmicamente con película de polipropileno y se almacenaron a 3.3 °C. Se evaluaron los cambios cada semana durante 5 semanas. Se prepararon 21 muestras por tratamiento (18 para análisis y 3 extras para casos de contaminación) y cada semana se aplicaron pruebas analíticas a 3 muestras por tratamiento, para así obtener datos por triplicado cada día de experimentación. Cabe mencionar que la primera medición, denominada “día cero”, se realizó pasadas 2 h del envasado de las muestras, y sirvió como patrón de referencia de la calidad inicial del producto. La información sintetizada de las muestras analizadas por semana se esquematiza en la Tabla 7, siendo M# el número de muestra correspondiente a cada tratamiento.

Tabla 6. Factores y tratamientos experimentales para pera fresca cortada en líquido de hidroconservación.

FACTORES	TRATAMIENTO							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Pretratamiento en lactato de calcio al 3%	Sin	Sin	Con	Con	Sin	Sin	Con	Con
Presencia de 3% fructanos de agave/ 0.1% CMC.	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con	Sin	Con
Presencia de nanopartículas al 4%.	Sin	Sin	Sin	Sin	Con	Con	Con	Con

Tabla 7. Codificación y días de muestreo.

	SEMANA DE PRUEBAS						MUESTRAS DE RESERVA
	DÍA 0	1	2	3	4	5	
MUESTRAS EVALUADAS (determinaciones por triplicado)	M1, M2, M3	M4, M5, M6	M7, M8, M9	M10, M11, M12	M13, M14, M15	M16, M17, M18	M19, M20, M21

2.4. Actividades preliminares.

2.4.1. Selección de agente reforzador de textura.

Se estudiaron diferentes agentes reforzadores de textura para el pretratamiento del fruto, de los cuales se prepararon las siguientes soluciones:

- Lactato de calcio (1% y 3%).
- Cloruro de calcio (1% y 2%).

Para esta prueba se utilizaron cubos de pera de 1.5 cm por lado. Con el fin de asegurar que estos reactivos no tuviesen un efecto pro-oxidante, posterior a la inmersión en la disolución de pretratamiento correspondiente, se escurrió el fruto y se inmergió en una segunda disolución de nanopartículas en agua al 25%. En la tabla 8, se muestra el diseño experimental empleado para evaluar el efecto del reforzador de textura.

Tabla 8. Diseño experimental prueba de reforzador de textura.

VARIABLES	EXPERIMENTO			
	1	2	3	4
Pretratamiento con Lactato de calcio al 1%.	•			
Pretratamiento con Lactato de calcio al 3%.		•		
Pretratamiento con Cloruro de calcio al 1%.			•	
Pretratamiento con Cloruro de calcio al 3%.				•
Inmersión en disolución de nanopartículas al 25%	•	•	•	•

Para el análisis de resultados se evaluó la textura, absorción de agua e índice de oscurecimiento. La medición de textura y absorción de agua se realizó tomando únicamente datos de pera fresca recién pelada y cortada sin tratamiento y datos de pera una hora posterior al tratamiento. Por otro lado, la medición de color se llevó a cabo en pera fresca recién pelada y cortada sin tratamiento y, en seguida, cada 5 min durante la primera hora posterior al tratamiento. Los datos recabados se contrastaron con datos tomados de una muestra control sin ningún tratamiento. La absorción de agua se realizó comparando el peso inicial y final de la pera. El color se midió utilizando un espectrofotómetro KONICA MINOLTA® CM-700d®. La textura se determinó empíricamente por prueba de corte.

2.4.2. Caracterización de la cámara de refrigeración.

Dependiendo del estado de madurez que se quiera lograr a la hora de consumo y en el cual se adquiera la materia prima, las condiciones de temperatura en el almacenamiento de pera serán distintas. Para este proyecto, las peras se adquirieron en estado de madurez comercial, y es necesario mantener esta condición en el fruto durante el mayor tiempo posible, por lo que la temperatura ideal de almacenamiento debe estar entre -1 y 0°C (Mitcham, Crisosto, & Kader, 2019). No obstante, no se consiguió un equipo que alcanzara dichas temperaturas, por lo que se buscó el que brindara las condiciones más cercanas a las deseadas.

Se determinó la temperatura promedio de los refrigeradores 1 y 2 del laboratorio 16 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán. Se midió la temperatura de cada refrigerador en sus tres niveles (1, 2 y 3, de abajo hacia arriba, Figura 6) en intervalos de 15 minutos por dos horas utilizando un termómetro digital HANNA® Checktemp® 1. El refrigerador 1 en sus tres niveles conservó una temperatura promedio de 3.33°C , siendo el refrigerador que alcanzó una temperatura más cercana a la óptima reportada en la bibliografía, y también el refrigerador que mostró menor fluctuación de temperaturas, por lo que se seleccionó para la refrigeración del producto.

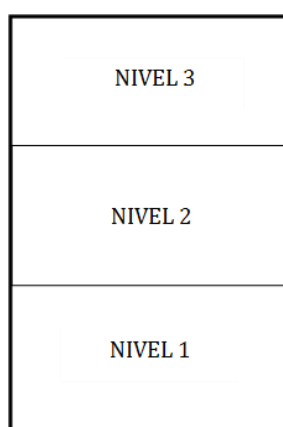


Figura 5. División en diferentes niveles del refrigerador.

2.4.3. Selección de materia prima.

La pera Beurrè D'Anjou se adquirió en el mercado local de Cuautitlán de Romero Rubio, la compra se realizó en temporada de cosecha (octubre-noviembre) por lote en caja de 45 piezas. Los frutos tenían, a primera vista, tamaño homogéneo y se inspeccionaron cuidadosamente para asegurarse que no presentaran ningún daño físico. Cabe destacar que la materia prima se adquirió siempre de los mismos proveedores. Una vez en el laboratorio y antes de pasar al lavado cada fruto se examinó cuidadosamente para descartar aquellos que pudieran presentar algún daño en su superficie, marcas de golpes, manchas ni rastros de afecciones por hongos o plagas.

2.4.4. Desinfección de material para tratamiento y envasado de producto.

Los materiales para la preparación fueron: pelador, rebanador, coladores, cuchillos, cucharas, probetas, vasos para envasado, y vasos de precipitado. Inicialmente se lavó el material tallando con esponja y jabón líquido Salvo® limón. Se escurrió y se sumergió durante 10 min en una solución de desinfectante DERMOSAN a una concentración de 10 mL/L. Finalmente se dejó escurrir por segunda vez el material. Esta misma disolución desinfectante se utilizó para los trapos de limpieza y para acondicionar las superficies de trabajo.

Durante la desinfección y posteriormente las puertas y ventanas del laboratorio se mantuvieron cerradas, además se utilizaron guantes de látex desinfectados, cofia, cubrebocas y bata de laboratorio.

2.4.5. Lavado, pelado y rebanado de materia prima.

Posterior a selección de la materia prima se removieron cuidadosamente las etiquetas presentes en la cáscara. El lavado se realizó con cáscara mediante un tallado suave con esponja y jabón líquido Salvo® limón, un enjuagado y posterior inmersión total por 10 min en una disolución de plata coloidal marca Microdyn® en agua con concentración de 10mL/L. Se dejó escurrir la fruta en un colador desinfectado. Una vez seca la materia prima, se

procedió a pelar la fruta con el pelador, removiendo por completo la cáscara. Posteriormente se cortó la pera con el rebanador apoyando en la parte superior de la pera y ejerciendo presión hacia abajo. De esta manera se obtuvieron 8 rebanadas por pera. El material utilizado se muestra en la Figura 6.

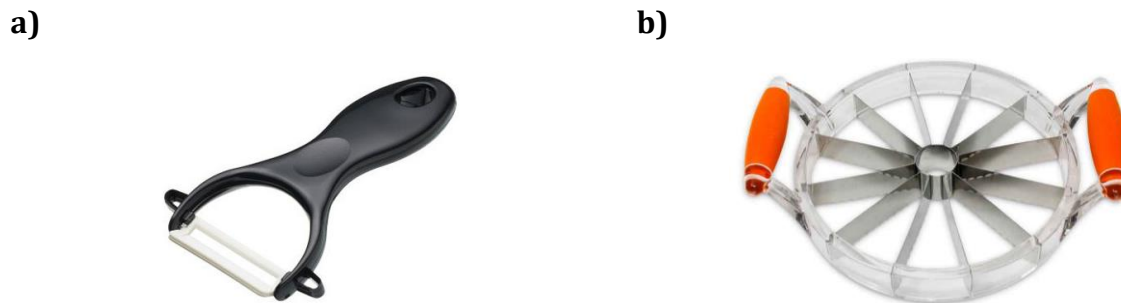


Figura 6. Material preparación de pera; a) pelador; b) rebanador y descorazonador.

2.4.6. Determinación del rendimiento del pelado y rebanado de la Pera Berrue D'Anjou.

Se midió la masa inicial de la pera con cáscara lavada y seca y se comparó con la masa de las 8 rebanadas obtenidas posteriormente del pelado y rebanado. De esta manera se determinó que el rendimiento promedio fue del 71.18%. Durante esta etapa también se estableció un parámetro dimensional promedio de las rebanadas de pera, cuyas dimensiones se presentan en la Figura 7.

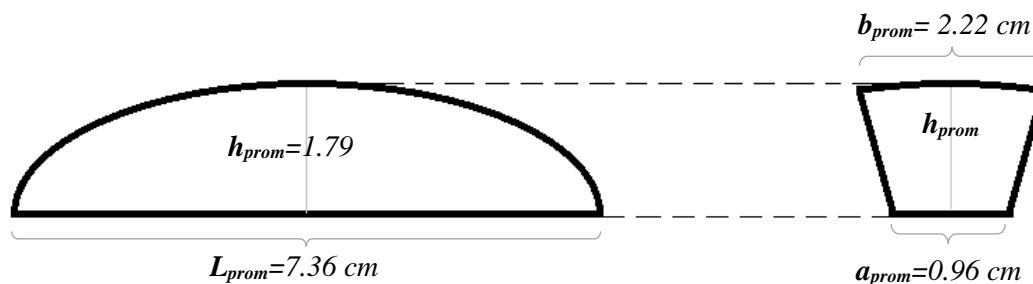


Figura 7. Dimensiones características de gajos de pera.

2.4.7. Preparación de agua para elaboración de dispersiones de conservación.

Las dispersiones se prepararon empleando agua previamente hervida durante 5 min. Para garantizar una homogénea distribución de temperaturas se empleó un termoagitador IKA® C-MAG HS 7®. Finalmente, se dejó enfriar el agua y se almacenó, en recipientes desinfectados, en refrigeración a 3.3°C.

2.4.8. Elaboración de disolución de lactato de calcio.

La disolución de lactato de calcio que se utilizó para el pretratamiento de la pera pelada y rebanada se realizó en agua purificada previamente acondicionada, a temperatura ambiente y una concentración de 3%. Se requirió de un agitador de propelas de velocidad variable tipo R2R1 (Heidolph® Instruments, Schwabach, Alemania) y la dispersión se llevó a cabo a 800 rpm. Se mantuvo la mezcla en agitación hasta que se disolvió por completo el lactato de calcio.

2.4.9. Elaboración de dispersiones de CMC e fructanos de agave.

Para los tratamientos 2, 4, 6 y 8 se preparó una disolución al 0.1% de CMC y fructanos de agave al 3%. Para esto, se calentó el agua a 80° C (de la misma forma que se calentó para ser acondicionada) para dispersar 0.1% CMC durante 10 minutos agitando con ayuda de un agitador de propelas de velocidad variable tipo R2R1 (Heidolph® Instruments, Schwabach) a 2500 rpm. Posteriormente se dejó enfriar la dispersión de CMC hasta 30°C manteniendo la agitación y se agregaron fructanos de agave. También se añadió azúcar para asimilar los grados brix de la dispersión a los de la pera (16° Brix).

2.4.10. Elaboración de nanopartículas de aceite esencial de toronja.

La elaboración de nanopartículas se llevó a cabo tomando como referencia el método de nanoprecipitación descrito por Elaissari *et al.* (2009). Este método también recibe el nombre de desplazamiento de solvente o deposición interfacial. Se utilizaron dos fases iniciales, una orgánica o solvente y una acuosa o no solvente.

Para la fase orgánica se preparó una mezcla de etanol-agua y posteriormente se agregó sustancia formadora de película (zeína) la cual se dispersó mediante una agitación a 300 rpm por 2 horas a temperatura de 35° C. Una vez que se disolvió por completo la zeína, se dejó enfriar la mezcla a 20° C y se agregó 1mL de aceite esencial (sustancia activa) por cada litro de nanopartículas a preparar, manteniendo un agitación a 300 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa se preparó como una disolución de Pluronic® F-127 en buffer de ascorbatos a pH=4, velocidad de agitación de 300 rpm y temperatura ambiente. En la fase acuosa, como su nombre lo indica, el solvente esencial es agua, medio en el cual la zeína es insoluble.

Posteriormente, la fase orgánica se agregó a la fase acuosa lentamente y por goteo utilizando una bomba New Era® Syringe Pump NE-300 mientras se agitaba la fase acuosa con ayuda de un homogeneizador IKA® ULTRA-TURRAX® T18 a velocidad de 10,000 rpm y temperatura ambiente. La agitación se realizó en intervalos de 5 minutos para dejar descansar el equipo, mientras que el goteo era constante. Una vez obtenidas las nanopertículas por nanoprecipitación, se purificaron eliminando el etanol en un rotavapor IKA® RV10 LG-17700-102® a 135 rpm y 45°C.

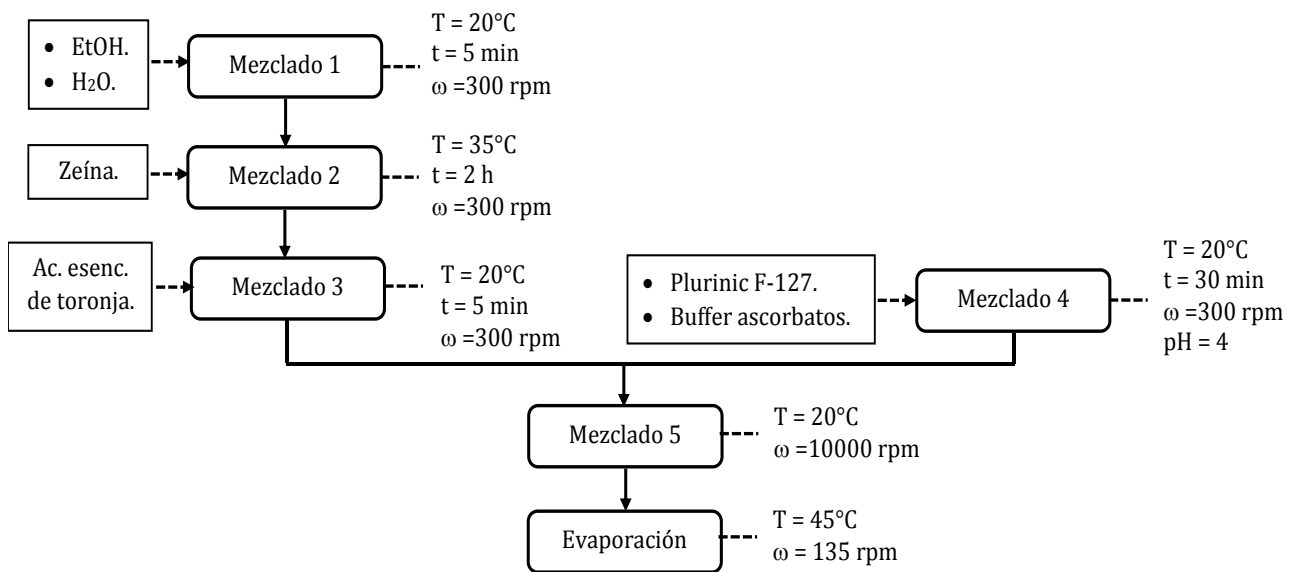


Figura 8. Diagrama de procesos de elaboración de nanopartículas.

2.4.11. Determinación de temperatura de envasado.

Para el envasado se utilizaron vasos lisos del número 10 de polipropileno de la marca REYMA® y una máquina selladora automática marca Premet® con película de polipropileno. Se realizaron pruebas con recipiente vacíos y recipientes con agua (el mismo volumen teórico que para las muestras) para comprobar que no hubiese fugas de líquido. Se probaron temperaturas de sellado desde 180 a 220 °C y se encontró que la temperatura de sellado ideal para asegurar la adhesión completa de la película al vaso sin dañar la integridad del recipiente era de 205°C. El tiempo de sellado es constante y está preestablecido en la selladora desde su fabricación.

2.5. Diagrama de procesos para el tratamiento de hidroconservación.

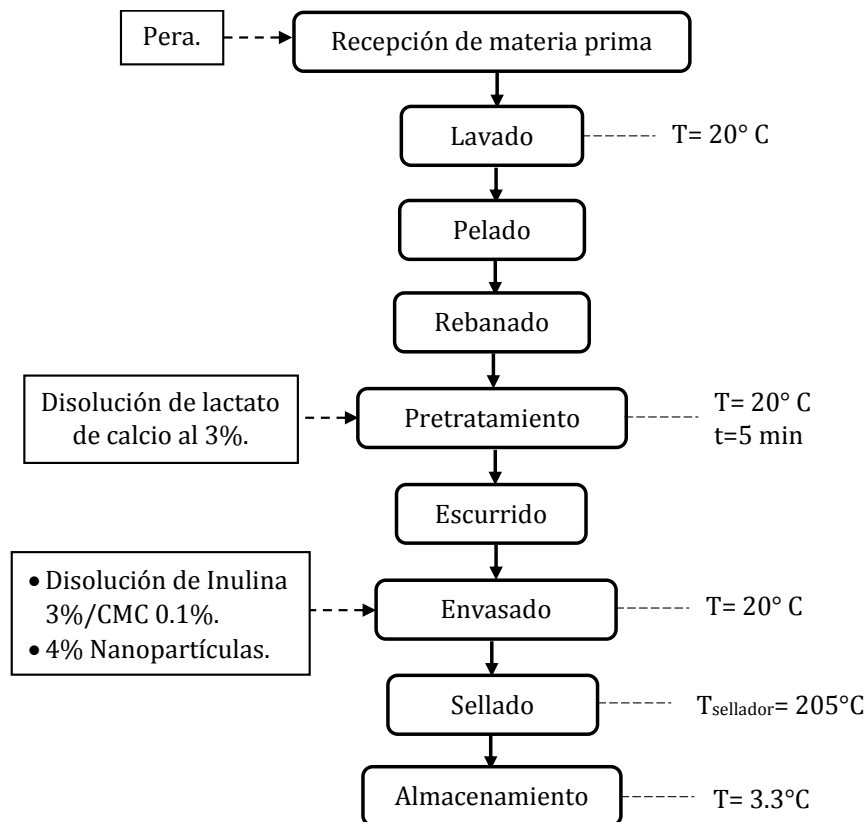


Figura 9. Diagrama de procesos de tratamiento de la pera.

En la parte anterior se presentó el diagrama de procesos general del procedimiento seguido para la elaboración de los diferentes experimentos. Es necesario recordar que el pretratamiento y las disoluciones usadas varían entre experimentos.

2.6. Técnicas de análisis.

Se aplicaron diferentes técnicas de análisis cada tercer día durante cuatro semanas tanto al líquido de hidroconservación como a la pera sometida a hidroconservación. Los resultados de las pruebas permitieron conocer el progreso y la eficiencia de conservación de los respectivos tratamientos. A continuación, se describen las metodologías de cada técnica de análisis.

2.6.1. Pruebas al líquido de hidroconservación.

2.6.1.1. Determinación de pH.

La medición se realizó mediante un medidor de pH de mesa HANNA® HI-208®. Para calibrar el equipo se utilizaron soluciones amortiguadoras de pH 4 y pH 7 marca HANNA®. En un vaso de precipitados de 10 ml se colocó un poco del líquido de hidroconservación drenado, posteriormente se sumergió el electrodo del potenciómetro en el líquido hasta que el sensor quedara completamente cubierto. La lectura de pH y temperatura se registró una vez que las cifras en la pantalla del potenciómetro se mantuvieron estables. Al finalizar la prueba es necesario limpiar el electrodo et alocar líquido de almacenamiento HANNA® en el protector del sensor.

2.6.1.2. Colorimetría.

Existen diferentes escalas numéricas diseñadas para representar el color en una escala espacial tridimensional. Dentro de estas escalas se encuentra la L^* , a^* , b^* , establecida por la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE, por sus siglas en francés); en este código, la L^* representa la luminosidad o claridad del color, la a^* es el componente rojo (cuando es

positiva) o verde (si es negativa), y la b* representa el componente amarillo (si es positiva) o azul (si es negativa).

Una vez obtenidos los datos de un color, normalmente nos interesa compararlo con otra muestra para evaluar sus diferencias. Si llamamos a esas diferencias ΔL^* , Δa^* y Δb^* para cada uno de los ejes L*, a* y b*, la distancia total entre dos colores vendrá dada por ΔE^* (léase como delta e), cuya fórmula es:

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

Para esta prueba se utilizó un colorímetro marca APOLLINAIRE® modelo Agrocolor & Weight®. La calibración se efectuó con el blanco que el equipo incluía desde su adquisición. La lectura de datos se realiza en escala RGB. Se vertieron 5 mL de muestra del líquido en un vaso de precipitados de 50 mL especial (que afectara lo menos posible el haz de luz del colorímetro). Se colocó el vaso sobre el sensor y posteriormente se cubrió la superficie del recipiente del equipo con una hoja de papel blanco para disminuir el efecto de la luz exterior. Esta prueba se realizó siempre bajo las mismas condiciones de luz exterior y en la misma ubicación dentro del laboratorio. Posterior a la obtención de los datos L*, a*, b* de cada muestra, se calculó el ΔE^* tomando como referencia los datos de las muestras correspondientes al día cero.

2.6.1.3. Determinación de turbidez.

Los turbidímetros tradicionales hacen brillar la luz a través de una sección de agua y detectan cuánta luz se dispersa de las partículas en el agua en un ángulo de 90 grados desde la luz entrante (HACH, 2018). En tales casos, la turbidez se mide en unidades de turbidez nefelométricas (NTU).

Esta determinación se llevó a cabo utilizando un radio turbidímetro WGZ-200® para medir la turbidez de una muestra de líquido de hidroconservación drenado. Para calibrar el equipo se utilizaron soluciones especiales (incluidas con el equipo) de 20 y 200 NTU. En los casos en

los cuales las soluciones que superaban las 200 NTU (límite de medición del equipo) se utilizó un factor de dilución 2 en 10 y posteriormente se realizaron los cálculos necesarios para obtener las NTU reales.

2.6.2. Pruebas a la pera Beurré D'Anjou.

2.6.2.1. Líquido absorbido.

La absorción de líquido se puede entender como una migración progresiva de humedad de una región de mayor concentración a una más baja a través de las paredes celulares y los espacios intercelulares de las muestras hasta que se alcanza el estado de saturación. (Eheim *et al.*, 2019). En este caso, la evaluación de la absorción de agua por parte de la pera en función del tiempo y el tratamiento de conservación es esencial para evaluar las condiciones de almacenamiento que mejoren su vida útil y la calidad del producto final.

Antes del envasado se registró el peso de la pera rebanada y pelada que se utilizaría para cada tratamiento (4 rebanadas). Para la determinación de líquido absorbido se comparó dicho peso con el de la pera drenada posterior al tiempo de almacenamiento del respectivo tratamiento. La diferencia de pruebas antes y después del tratamiento se interpretó como el peso del líquido absorbido. Para el análisis de resultados se consideró como más eficiente el tratamiento que impide en mayor medida la absorción de líquido, manteniendo así las condiciones iniciales del fruto.

2.6.2.2. Colorimetría.

Esta prueba realizó con un espectrofotómetro MINOLTA® CM-700d®. Se cortaron cubos de 1.5cm x 1.5 cm x 1.5 cm de muestra colada y sin líquido. Las muestras se colocaron en un vidrio de caja Petri (desinfectada y sin rayaduras), posteriormente se coloca la caja Petri con muestra sobre el sensor del espectrofotómetro asegurándose de que la pera cubra completamente el receptor sin dejar entrar luz del exterior. Los datos se registran en escala L*, a, b y posteriormente se convierten a escala RGB. Se tomaron mediciones por triplicado de diferentes rebanadas de pera del mismo recipiente y tratamiento.

2.6.2.3. Caracterización textural.

Un texturómetro es capaz de medir virtualmente cualquier característica física del producto, como dureza, fracturabilidad, adhesividad, resistencia del gel, extensibilidad de alimentos, cosméticos, productos farmacéuticos, geles, adhesivos y otros productos. Se emplea comúnmente para medir y cuantificar pruebas fundamentales, empíricas, tanto en compresión como en tensión, cubriendo aquellas relacionadas con el análisis de textura y propiedades de los materiales, así como los efectos de la reología de sólidos, semisólidos, líquidos viscosos, polvo y materiales granulados (Corporación DAMAR, 2017).

Mediante una caracterización textural se evaluó la eficiencia del pretratamiento con lactato de calcio como agente reafirmante de textura e integridad celular. Utilizando un analizador de textura Brookfield® modelo CT3-25000 G1500GR® se efectuó una prueba por compresión a cubos de 1.5cm x 1.5 cm x 1.5 cm de pera post tratamiento. La distancia de compresión fue de 7 mm. Mediante este análisis se determinó la dureza de las muestras.

2.6.2.4. Fenoles totales.

Para este proyecto se utilizó el método de determinación de fenoles totales de Folin-Ciocalteu. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a $\lambda=765$ nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles. El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total. La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra causa la aparición de una coloración

azulada que presenta un máximo de absorción a 765 nm, y que se cuantifica por espectrofotometría en base a una recta patrón de ácido gálico (García, Fernández & Fuentes, 2019).

La extracción de compuestos fenólicos se realizó mediante la técnica descrita por Tomás Barberán *et al.* (2001) y García, Fernández y Fuentes (2019) con algunas modificaciones. Posterior al tratamiento de hidroconservación se maceró pera en un mortero de porcelana hasta obtener puré. De dicho puré se pesaron 3 g y se mezclaron en agitación con 10 ml de metanol durante 1 h. A continuación, se extrajeron 500 µl de sobrenadante y se combinaron en un vaso de precipitado con 100 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu por 3 min, para después añadir 2.4 ml de H₂O destilada, 2 ml de una solución de NaCO₃ al 7.5% y dejar reaccionar en la oscuridad durante 1 h.

La cuantificación de polifenoles totales se efectuó utilizando un espectrofotómetro UV-VIS a 765 nm con agua destilada como blanco. Previamente se preparó una curva patrón de ácido gálico, iniciando con una disolución madre de 100 mg/L, tomando 10 mL para preparar diluciones de 1/10.

2.6.2.5. Polifenol oxidasa (PPO).

Para este trabajo se siguió el método de Montgomery y Sgarbieri (1975) con algunas modificaciones. La extracción se realizó mezclando 3 g me muestra macerada (puré) con 5 mL de cloruro de sodio al 8.8% y agitando durante 20 min. Posteriormente la mezcla se centrifugó y se recuperará el sobrenadante. La cinética de reacción de la PPO se determinó mediante espectrofotometría en un espectrofotómetro UV/VIS a 420 nm. Para esto, se mezclaron 200 µL de extracto con 2.8 mL de solución amortiguadora de citratos y catecol y se midió su absorbancia cada 30 s durante 5 min.

Para preparar la disolución amortiguadora de citratos y catecol se elaboraron dos disoluciones previas, A y B. La disolución A consiste en 19.21 g de ácido cítrico por cada L de H₂O. Para la disolución B se utilizaron 53.65 g de fosfato de sodio heptahidratado por cada L

de H₂O. En seguida, se mezclaron 25.7 mL de solución B y 24.3 mL de solución A y se aforó la mezcla con H₂O destilada hasta 100 mL. Es necesario que el pH final de la solución amortiguadora sea pH = 5; de no ser así, se ajusta el pH utilizando HCl = 0.1 N y NaOH = 0.1 M. Finalmente se disuelven 0.5505 g de catecol por cada 100 mL de disolución amortiguadora. Los resultados se expresaron como el cambio en la densidad óptica por minuto (Δ Abs/min).

2.6.2.6. Pectin metil esterasa (PME).

Anteriormente ya se ha mencionado la importancia de la PME en los diversos fisiológicos de los frutos, con especial atención en aquellos relacionados con el oscurecimiento y la pérdida de calidad sensorial. Para determinar la actividad enzimática de la PME se siguió el procedimiento descrito por Maca *et al.* (2013) con algunas modificaciones debido a la pera. La extracción enzimática se realizó mezclando 3g de muestra macerada (puré) con 5 mL de disolución de NaCl al 8.8% en agitación durante 20 min a temperatura ambiente. La suspensión obtenida se centrifugó a 6000 rpm por 10 min. El precipitado fue desechado y se recuperó el sobrenadante.

Para la medición de actividad enzimática se prepararon también las siguientes disoluciones: azul de bromotimol al 0.01% en buffer de fosfato de sodio al 0.006M, pectina cítrica al 1% y H₂O. Todas las disoluciones se ajustaron a pH = 7.5. En una cubeta para espectrofotometría se añadieron 100 μ L de extracto, 500 μ L de azul de bromotimol, 2 mL de pectina cítrica y 400 μ L de agua destilada. Se tomaron mediciones de absorbancia en un espectrofotómetro UV/VIS a 620 nm cada 30 s por 2 min. La pendiente de la parte lineal de la curva (velocidad inicial de la reacción) se tomó como actividad enzimática.

Se realizó una curva patrón de ácido galacturónico y en base a las condiciones de absorbancia contra concentración se obtuvo la ecuación descriptiva de dicha curva patrón. Posteriormente se utilizó dicha ecuación para convertir los datos de absorbancia en la prueba de PME a concentración de ácido galacturónico (mg ác. galacturónico/ mL de solución).

2.7. Análisis estadístico.

Los resultados de cada prueba (3 por día por tratamiento) se analizaron mediante un diseño ANOVA con ayuda del software Minitab® 19 utilizando un nivel de significación $\alpha=0.05$ para determinar las diferencias y significancia. En el mismo software se elaboraron gráficas de caja para facilitar la comparación visual y la interpretación de los resultados.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Pruebas preliminares: selección de agente reforzador de textura

La textura se conservó más firme en los casos en que se utilizó lactato de calcio al 3%. Así mismo, se consiguió una menor absorción de agua. El parámetro de color no varió significativamente entre las diferentes disoluciones. El calcio está asociado con la preservación de la estructura de la pared celular, ya que interactúa con la pectina para formar pectato de calcio. Se ha reportado que el calcio mantiene la firmeza mediante entrecruzamiento tanto con la pared celular como con la pectina de la lamela media (Rico *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha informado que el lactato de calcio es una buena alternativa al cloruro de calcio porque evita el amargor o los sabores desagradables asociados con la sal de cloruro (Rico *et al.*, 2007). Después del análisis por triplicado, se seleccionó el lactato de calcio al 3% como el pretratamiento a utilizar, ya que conservó en mayor medida las condiciones iniciales del fruto.

3.2. Pruebas aplicadas al líquido de hidroconservación.

3.2.1. Determinación de pH.

En la Figura 10, se observan los cambios en pH durante el almacenamiento, destacándose que, conforme pasa el tiempo, el pH de las muestras disminuye. Sin embargo, el uso de nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja reduce en gran medida la tasa de aumento en la acidez. Dicho evento se debe al efecto antimicrobiano y antifúngico que tiene el aceite esencial de toronja sobre el producto, lo que deriva en una disminución de cambio de acidez. Existen distintos microorganismos que son responsables de la

fermentación y putrefacción de frutos, que producen ácidos orgánicos (acético y cítrico entre los más destacados) como metabolitos secundarios de sus procesos biológicos (Reyes-Ocampo *et al.* 2013). El proceso fermentativo de las bacterias anaerobias comprende una serie de procesos, que interactúan entre sí, en una serie de reacciones metabólicas complejas en ausencia de oxígeno, haciendo parte importante de los ciclos biogeoquímicos del carbono, nitrógeno y azufre, entre otros. Estos procesos metabólicos se han dividido en 3 grupos o etapas principales: 1) hidrólisis y fermentación, 2) acetogénesis y 3) metanogénesis; Es durante la acetogénesis que se produce ácido acético. En el caso de los microorganismos aerobios, la producción de ácido acético también ocurre durante la catálisis anterior al ciclo de ácidos tricarboxílicos (Constanza *et al.*, 2015). Conforme transcurren las semanas, las bacterias liberan ácidos orgánicos al medio de conservación, por lo que el pH decrece y la acidez aumenta.

Cuando se utilizan nanopartículas de aceite esencial de toronja, la actividad microbiana disminuye y, en consecuencia, al paso del tiempo hay menos ácidos libres en el medio que en un tratamiento sin nanopartículas. Los aceites esenciales poseen acción bacteriostática y bactericida dependiendo de la concentración y el tipo de aceite (Pardo *et al.*, 2017). Como ya se había mencionado, los antimicrobianos pueden actuar como perturbadores de la membrana bacteriana o como inhibidores de la dinámica de transferencia de protones.

Ejemplo de esto son los ácidos orgánicos débiles, los cuales cumplen principalmente la función de perturbadores de la membrana bacteriana (Weiss *et al.*, 2009). La eficacia de los ácidos orgánicos débiles es una función del pH ambiental, ya que algunas de las moléculas de ácido débil se disocian en solución para formar los aniones ácidos cargados negativamente, mientras que otras moléculas permanecen sin disociarse. Solo las moléculas de ácido orgánico no disociadas pueden penetrar en la envoltura de la célula bacteriana, mientras que los aniones disociados son repelidos debido a las interacciones electrostáticas.

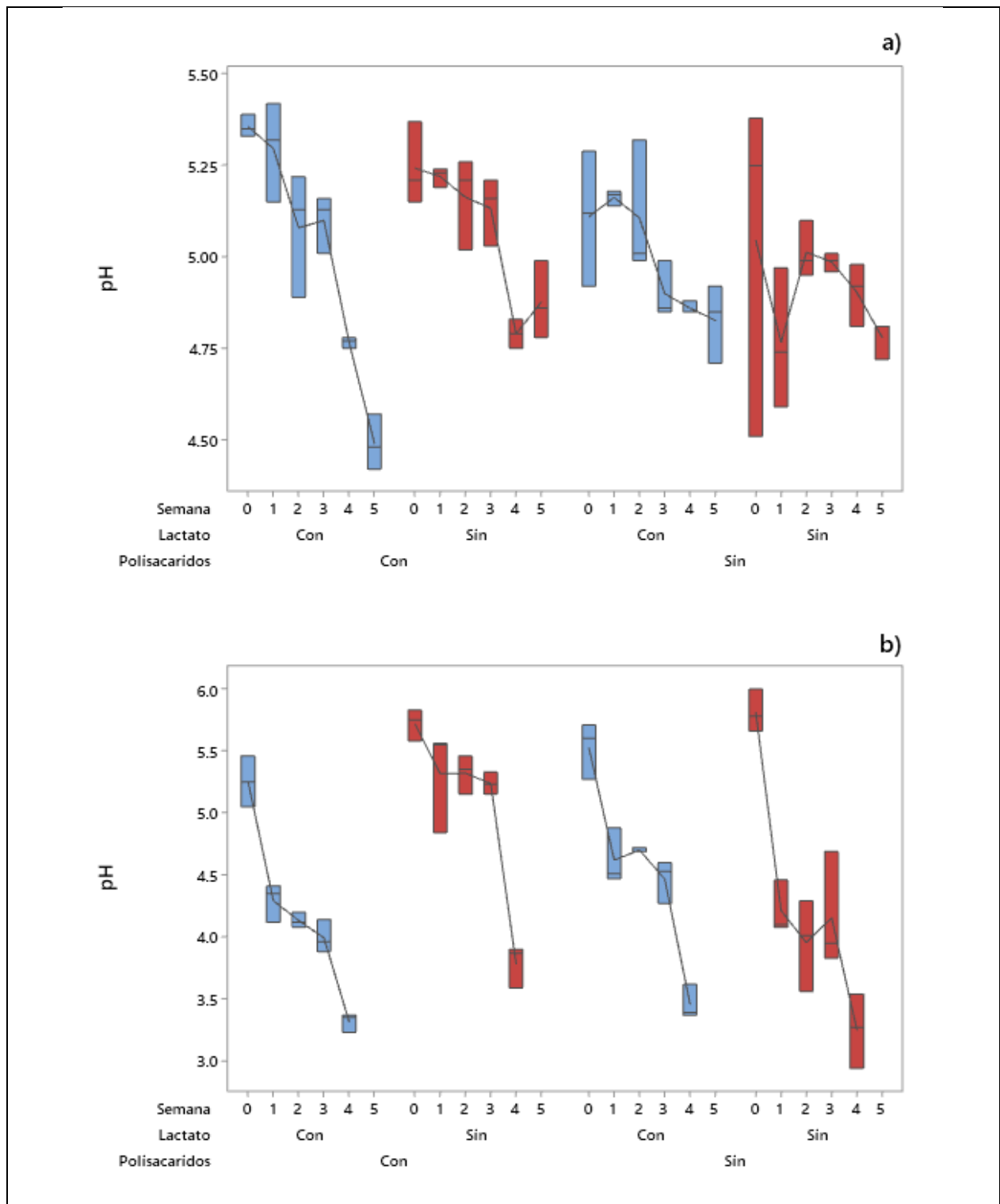


Figura 10. Cambios de pH durante el almacenamiento de pera en liquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos. a) Muestras inmersas en dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja; b) Muestras inmersas en dispersión sin nanopartículas.

Dado que la concentración del ácido no disociado aumenta a medida que disminuye el pH, las concentraciones más altas de compuestos activos pueden migrar al espacio intracelular a un pH más bajo para inhibir reacciones metabólicas esenciales (Weiss *et al.*, 2009). Esto ocurre cuando en este experimento los microorganismos liberan ácidos al medio, disminuyendo el pH externo y promoviendo aún más el efecto antimicrobiano. Es así como estas sustancias pueden actuar al insertarse en la membrana bacteriana, interrumpiendo así su estructura y la funcionalidad de la bicapa de fosfolípidos. La membrana pierde su capacidad de actuar como una barrera, impidiendo el intercambio de material entre el interior y el exterior de la célula (lo que disminuye también la dinámica de transferencia de protones) y su capacidad de albergar y regular la funcionalidad de los complejos de proteínas, los cuales están suspendidos en la bicapa (Weiss *et al.*, 2009).

Por otro lado, el uso de lactato de calcio demostró estadísticamente causar una diferencia significativa ($p > 0.05$) en el pH. Esto puede deberse al efecto reforzador del lactato de calcio. Cuando la PME actúa, remueve los grupos metilo del esqueleto de ácido galacturónico de una molécula de pectina. Si esto ocurre cuando hay calcio en el medio (en este caso en forma de lactato de calcio), el calcio se une fácilmente a los grupos de ácido carboxílico cargados negativamente de las moléculas desmetil esterificadas de pectina. Esto conduce a que distintas cadenas de pectina lineales se estabilicen formando un gel con modelo de caja de huevo (Beigi *et al.*, 2015; Kirtil *et al.*, 2014). Cuando la estructura de la fruta es reforzada por acción del lactato de calcio, se evita la liberación de PPO, y en consecuencia se evita la formación de *o*-quinonas y *o*-difenoles, compuestos que disminuyen el pH del medio en el que se encuentran. Es por esto que el lactato pudiera tener un efecto significativo en el control de la disminución del pH durante la hidroconservación de pera.

3.2.2. Colorimetría.

Para la interpretación gráfica de ΔE^* es necesario descartar el primer dato que en todos los casos es aproximadamente 0; esto debido a que dicha medición corresponde al día cero, y en el lapso de unas horas el cambio de color fue casi imperceptible. Una vez aclarado lo anterior es más fácil distinguir que el uso de nanopartículas no tuvo un efecto significativo en el color

del medio. Esto fue corroborado por los resultados estadísticos ($p \leq 0.05$). En el medio no hay presencia natural de PPO, sino sólo aquellas pequeñas concentraciones de PPO que pudieran ser liberadas de la pera al medio. Así mismo, la concentración de compuestos fenólicos en el medio es baja. Esto redundó en una muy baja actividad de PPO en el medio, por lo que la presencia de un antioxidante no provocó algún efecto significativo.

Por otro lado, el único factor que, de acuerdo con el análisis estadístico, condujo a una diferencia significativa en los tratamientos fue la presencia de polisacáridos. Si bien las nanopartículas no disminuyeron el oscurecimiento, los polisacáridos sí lo hicieron, y esto es perceptible principalmente en los tratamientos 2 y 4 (ambos con polisacáridos, sin nanopartículas, y el 4 con pretratamiento), respecto a sus homólogos sin polisacáridos, los tratamientos 1 y 3 (Figura 11), y posteriormente en menor medida en los tratamientos 6 y 8 (ambos con polisacáridos, con nanopartículas, y el 8 con pretratamiento) respecto al 5 y 7 (Figura 12). En aquellos tratamientos en que se usaron polisacáridos se observa una menor disminución en la luminosidad (L^*), al igual que un menor aumento en el ΔE^* . Theópilo *et al.* (2018) mencionan que las propiedades de barrera de los recubrimientos alimenticios no dependen únicamente del método de aplicación del recubrimiento, sino que también de las propiedades del material formador de película (tipo, concentración, densidad, viscosidad y tensión superficial). Numerosos autores han demostrado que los tratamientos con CMC tienen excelentes propiedades de barrera y formadoras de película (Salama, Abdel, & Alsehli, 2019; Tesfay *et al.*, 2017). En este caso, si bien la CMC no se aplica directamente al fruto, al estar presente en el medio se deposita en la superficie del fruto, formando así una barrera protectora que podría disminuir la migración de PPO y compuestos fenólicos del fruto hacia el medio de hidroconservación, disminuyendo aún más la formación de melaninas en el líquido. Por otro lado, la CMC y los fructanos de agave son carbohidratos que, al hidratarse, disminuyen el agua libre que pudiera ser absorbida por la pera y aumentan la viscosidad del líquido de conservación, dificultando aún más la movilidad de partículas de diferentes tipos.

Para beneficio del proyecto cabe destacar que el oscurecimiento en el líquido fue poco perceptible visualmente, y tuvo impacto considerablemente menor en la apariencia que el aumento en la turbidez.

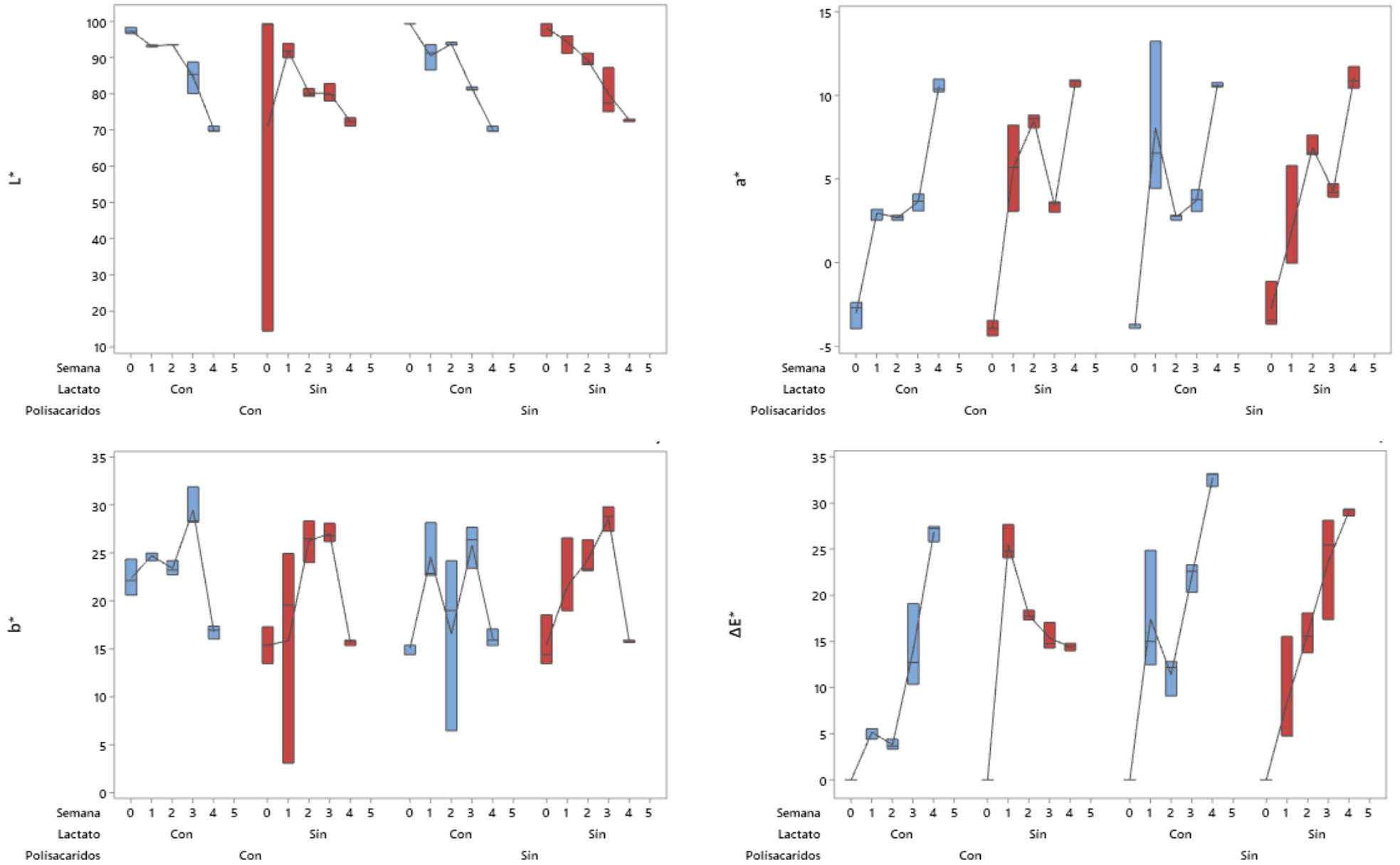


Figura 11. Cambios de color en liquido de cobertura durante el almacenamiento por inmersión de pera. Índices de color de dispersión sin nanopartículas.

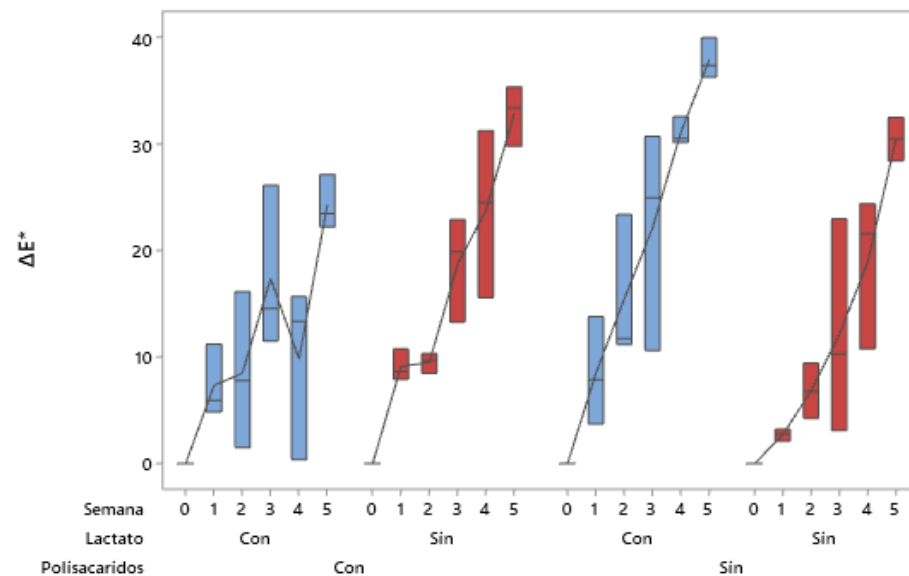
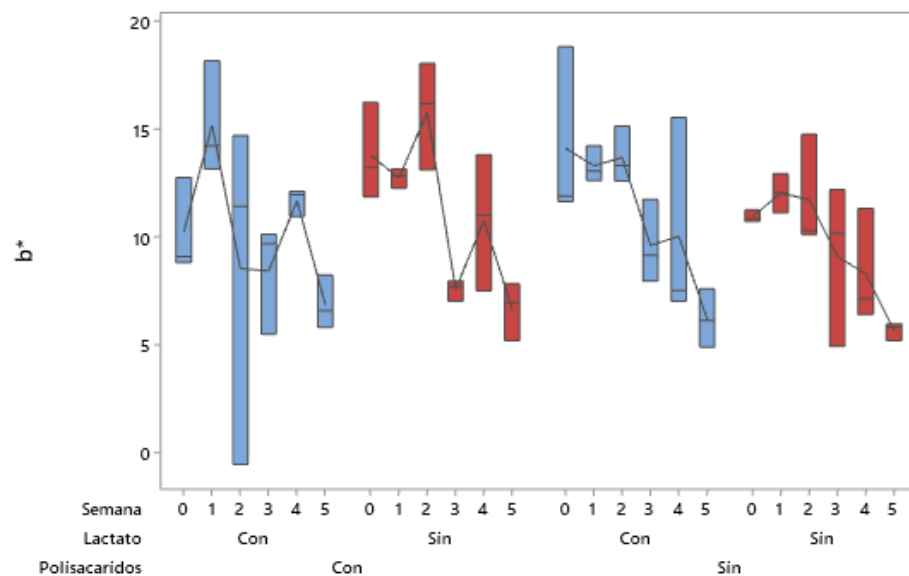
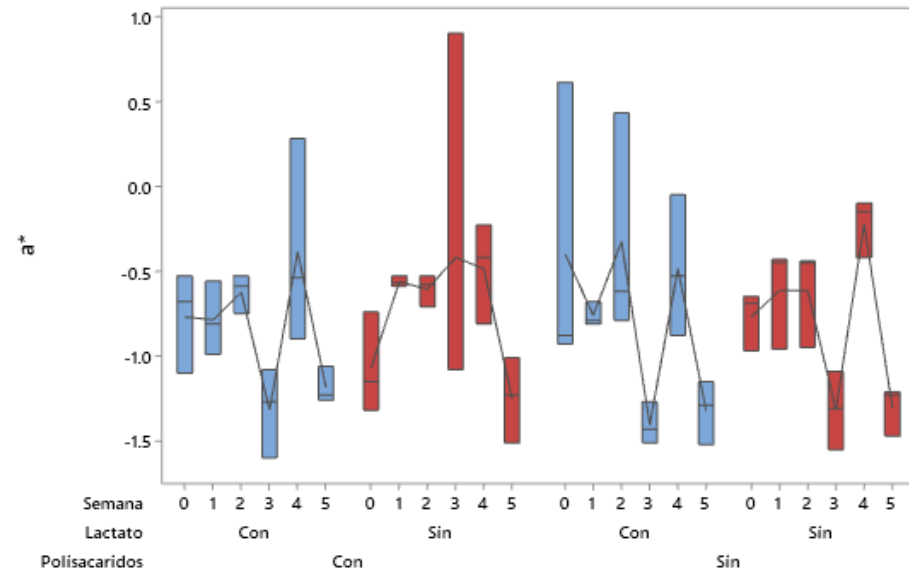
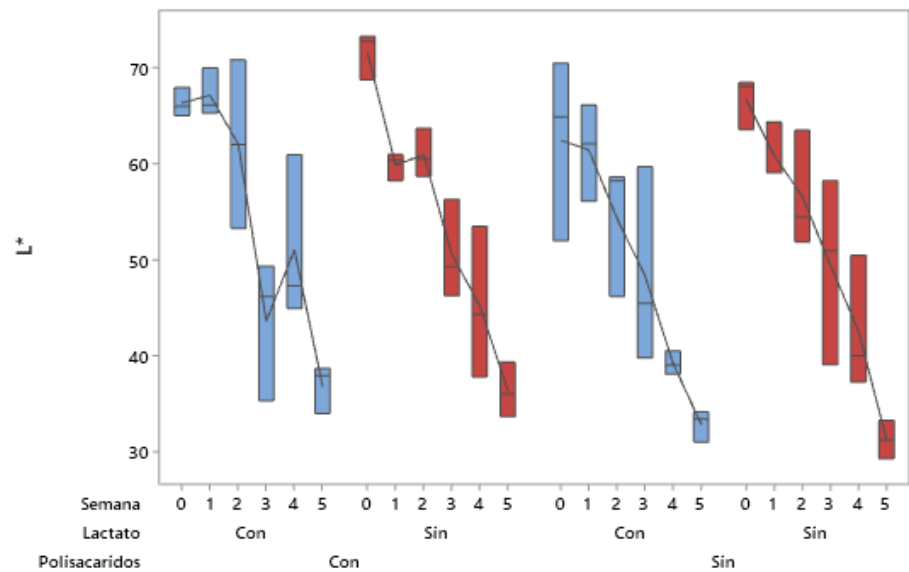


Figura 12. Cambios de color en liquido de cobertura durante el almacenamiento por inmersión de pera. Índices de color de dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja

3.2.3. Determinación de turbidez

De acuerdo con el análisis estadístico solo el lactato contribuyó a una diferencia significativa entre tratamientos ($p > 0.05$), siendo mayor la turbidez en los experimentos sin lactato. Esto se debe principalmente al efecto clarificador de la PME que actúa en conjunto con el lactato de calcio. Las sustancias pécticas son las principales responsables de la consistencia, turbidez y apariencia de los productos derivados de frutas. La clarificación de dichos productos se debe principalmente a la actividad de la PME. Esta enzima interviene en la desesterificación de la pectina, produciendo zonas de carga negativa altamente reactivas que finalmente son eliminadas mediante quelación de calcio produciendo pectatos de calcio. La formación de grandes pectatos de calcio insolubles inicia la precipitación de otros componentes del medio coloidal y aumentando así la claridad (Wicker *et al.*, 2002; Itziar *et al.*, 1998). No obstante, la formación de estos precipitados pudiera conducir a un mayor rango de error experimental, ya que, si la muestra analizada no es completamente homogénea, la variación en concentración de precipitados afectará la turbidez.

La presencia de nanopartículas no tuvo efecto significativo ($p \leq 0.05$), sin embargo, en los tratamientos 6 y 7 (sin y con pretratamiento, con y sin polisacáridos, respectivamente) en comparación con sus homólogos sin nanopartículas, los tratamientos 2 y 3, se observa que hay un menor incremento de turbidez, lo cual puede deberse a la acción antioxidante del aceite esencial de toronja, que elimina las especies reactivas para romper la cadena de formación de melaninas (Brewer, 2011), compuestos que por su color y tamaño pudieran también contribuir al aumento de turbidez.

Cabe destacar que, visual y experimentalmente, los tratamientos con nanopartículas presentaron una mayor turbidez debido al mayor número de elementos en el medio que provocan que la luz se disperse y absorba en lugar de transmitirse en línea recta a través de la muestra. Esto pudiera representar un inconveniente en cuanto a la elección del producto por parte del consumidor, ya que como se mencionó con anterioridad, el cambio más perceptible en líquido del producto fue el aumento en turbidez. En la Figura 13 se muestran los cambios de turbidez de los diferentes experimentos, respecto al tiempo.

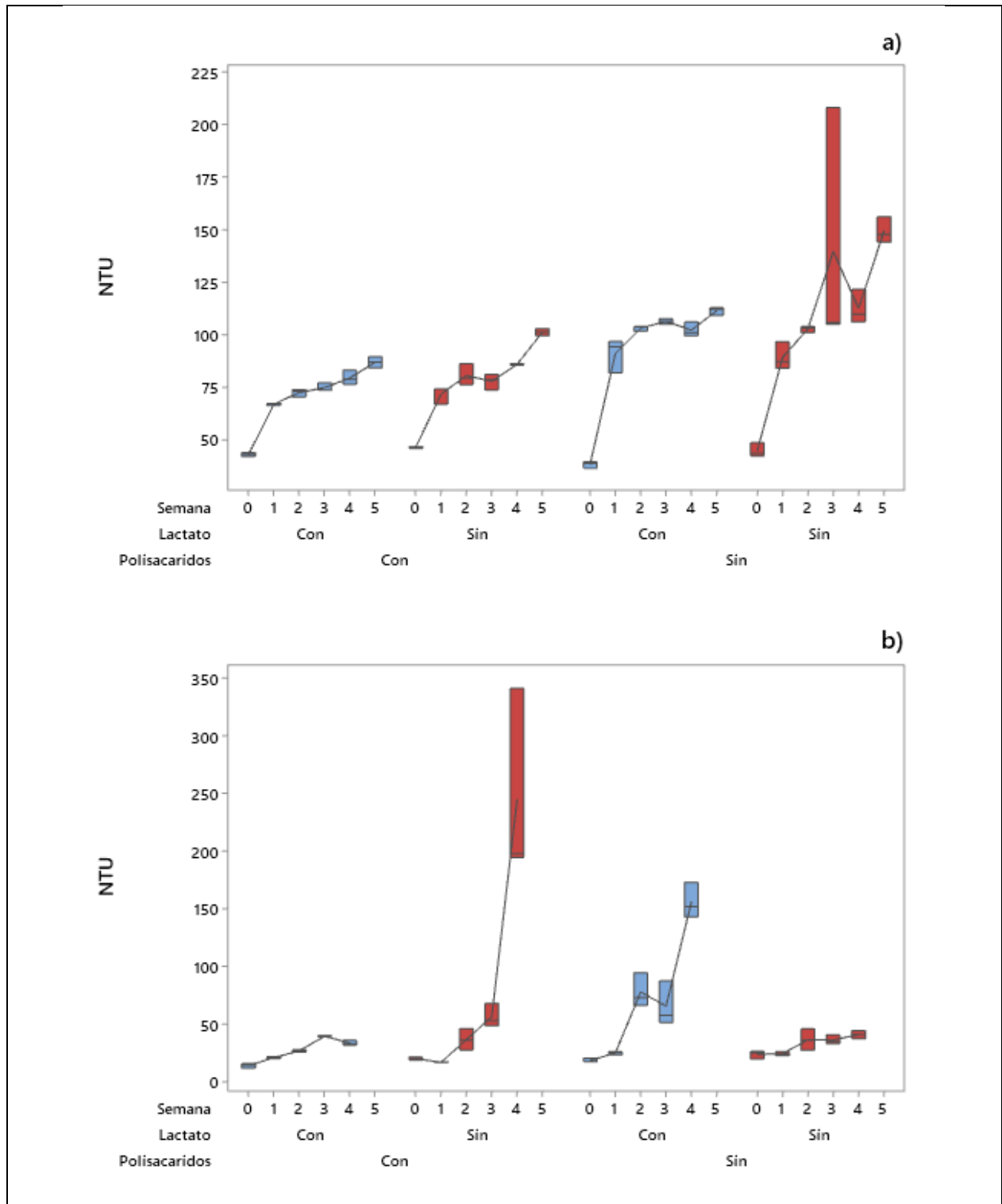


Figura 13. Cambios en la turbidez durante el almacenamiento de pera en liquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos. a) Muestras inmersas en dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja; b) Muestras inmersas en dispersión sin nanopartículas.

3.3. Pruebas aplicadas a la pera Beurré D'Anjou.

3.3.1. Líquido absorbido.

En esta prueba los polisacáridos tuvieron efecto significativo, lo que pudiera ser debido a principalmente a la CMC, ya que de acuerdo con lo que mencionan Theópilo *et al.* (2018), las propiedades de barrera de los recubrimientos alimenticios no dependen únicamente del método de aplicación del recubrimiento, sino que también de las propiedades del material formador de película, y un gran número de estudios han demostrado que los tratamientos con CMC tienen excelentes propiedades de barrera y formadoras de película (Salama, Abdel, & Alsehli, 2019; Tesfay *et al.*, 2017).

En este caso la CMC presente en el medio se deposita en la superficie del fruto, formando así una barrera protectora que disminuye el intercambio de líquido y solutos entre la pera y el medio de hidroconservación, por lo cual la absorción de líquido por parte del fruto es menor. Por otro lado, como ya se mencionó, la CMC y los fructanos de agave son carbohidratos que, al hidratarse, disminuyen el agua libre que pudiera ser absorbida por la pera y aumentan la viscosidad del líquido de hidroconservación, dificultando aún más la movilidad del líquido hacia la matriz del fruto.

En la Figura 14 también se observa una menor absorción de líquido en los tratamientos que tuvieron una previa inmersión en lactato de calcio, aunque estadísticamente no hubo diferencia significativa ($p \leq 0.05$). Lo anterior se explica si consideramos que esta previa inmersión del fruto en lactato de calcio refuerza la estructura de la pera (Beigi *et al.*, 2015) lo que también pudiera disminuir en una medida considerable la absorción de líquido por parte del fruto.

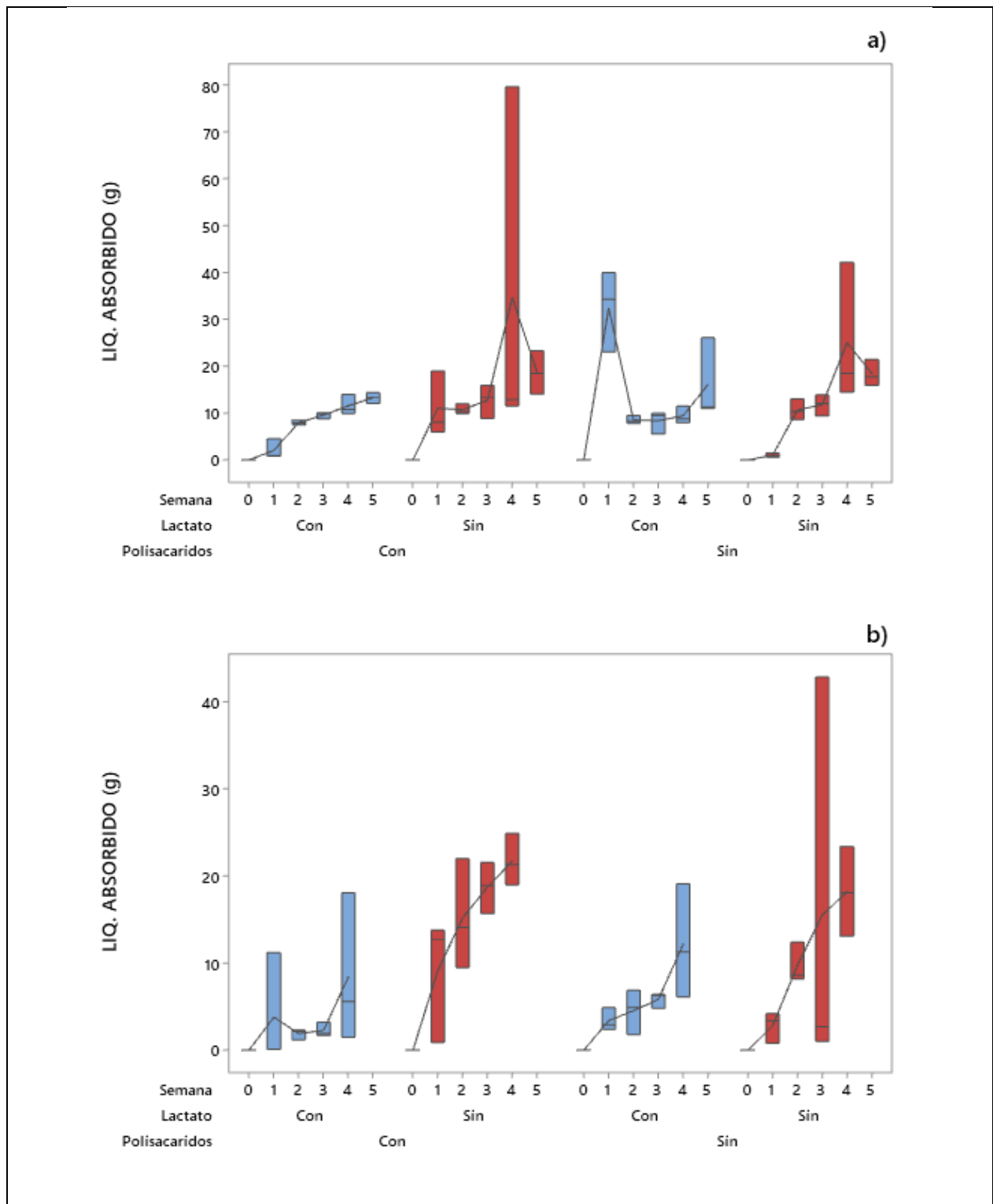


Figura 14. Absorción de líquido de cobertura durante el almacenamiento de pera, comparación de los diferentes tratamientos. a) Muestras inmersas en dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja; b) Muestras inmersas en dispersión sin nanopartículas.

3.3.2. Colorimetría.

Los tratamientos en que se utilizaron nanopartículas presentan un menor cambio de color, lo cual se corrobora estadísticamente, ya que la presencia de nanopartículas generó una diferencia significativa ($p > 0.05$). Esto se debe principalmente a la acción antioxidante del aceite esencial de toronja, la cual, de acuerdo con lo que mencionan Beigi *et al.* (2015), disminuye la actividad de la PPO al inhibir su centro activo de Cu^{+2} y elimina las especies reactivas como las *o*-quinonas y *o*-difenoles, interrumpiendo así la formación de melaninas.

En la Figura 15 y Figura 16 se muestran los cambios colorimétricos en el líquido de cobertura empleado para la conservación de pera, imagen que corrobora lo antes analizado. Al comparar dichas figuras, se aprecia que con el uso de nanopartículas es menor el decremento de la coordenada L^* respecto al tiempo, lo que se refiere a una menor pérdida de luminosidad. De igual forma en la gráfica de a^* se puede observar que, si bien el valor de la coordenada inicial de los tratamientos con nanopartículas es mayor que en aquellos sin nanopartículas, es menor el aumento en a^* respecto al tiempo de los tratamientos con nanopartículas, lo cual representa una disminución en la formación de pigmentos rojizos relacionados con las melaninas. El hecho de que la coordenada a^* inicial sea diferente en los tratamientos con nanopartículas puede deberse a una pequeña diferencia en la madurez de los frutos usados en dichos tratamientos. Finalmente, en la gráfica de b^* se aprecia un menor incremento en sentido positivo con el uso de nanopartículas, lo que se relaciona con una disminución de formación de tonos amarillos relacionados con el oscurecimiento enzimático.

El uso de polisacáridos provocó diferencia significativa ($p > 0.05$), aumentando levemente el valor de ΔE^* . Este cambio desfavorable se debe a que, como ya se mencionó, los fructanos de agave están formados por moléculas de D-fructosa unidas glucosídicamente (Guder, 2019). Esto quiere decir que, al tener un grupo carbonílico no involucrado en el enlace glucosídico, es capaz de reducir iones férricos o cúpricos (Rédei, 2008). Es así que su presencia reduce el Cu^{+2} de la polifenol oxidasa y promueve su actividad oxidante.

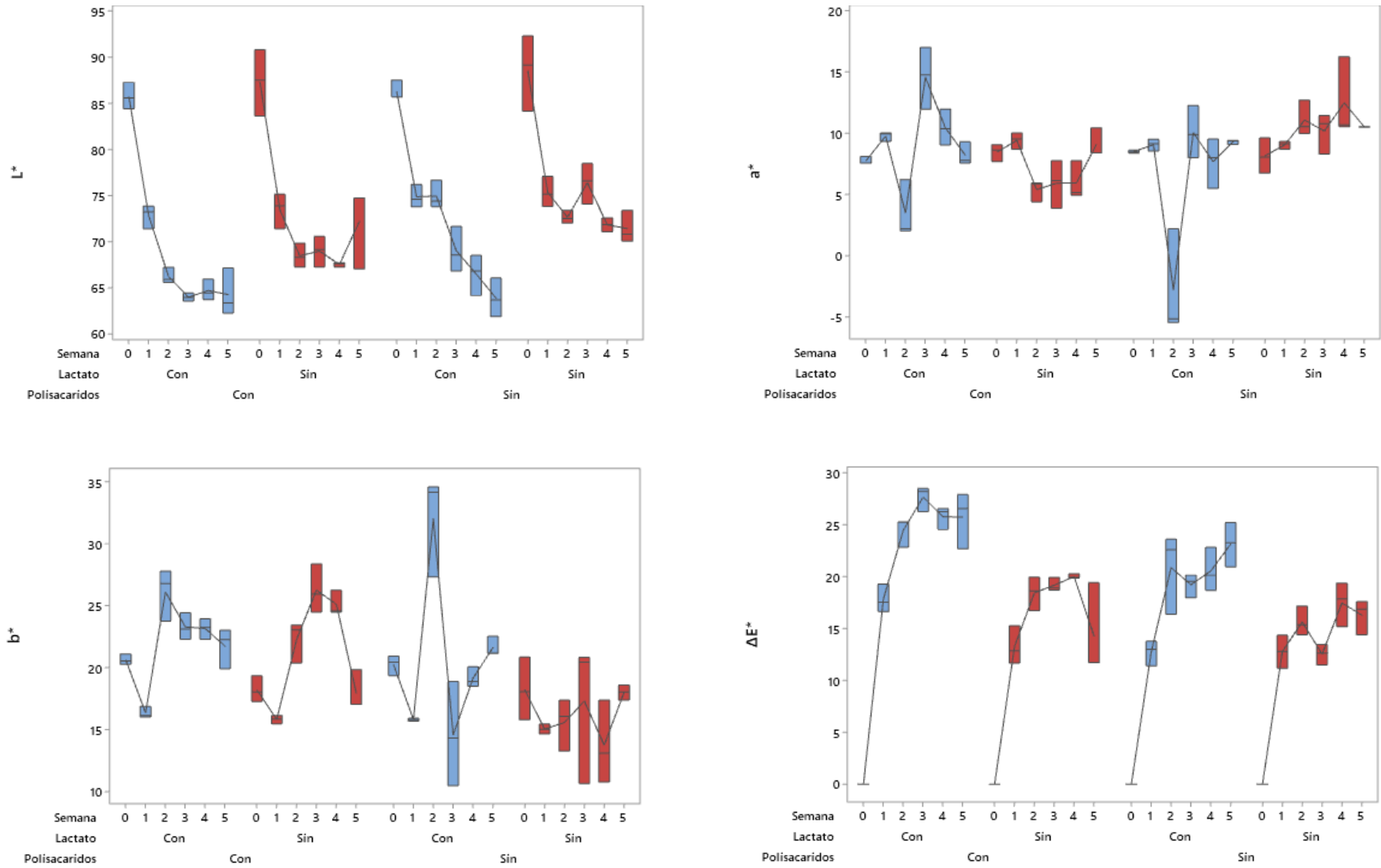


Figura 15. Cambios de color durante el almacenamiento de pera en liquido de cobertura. Índices de color de muestras inmersas en dispersión sin nanopartículas.

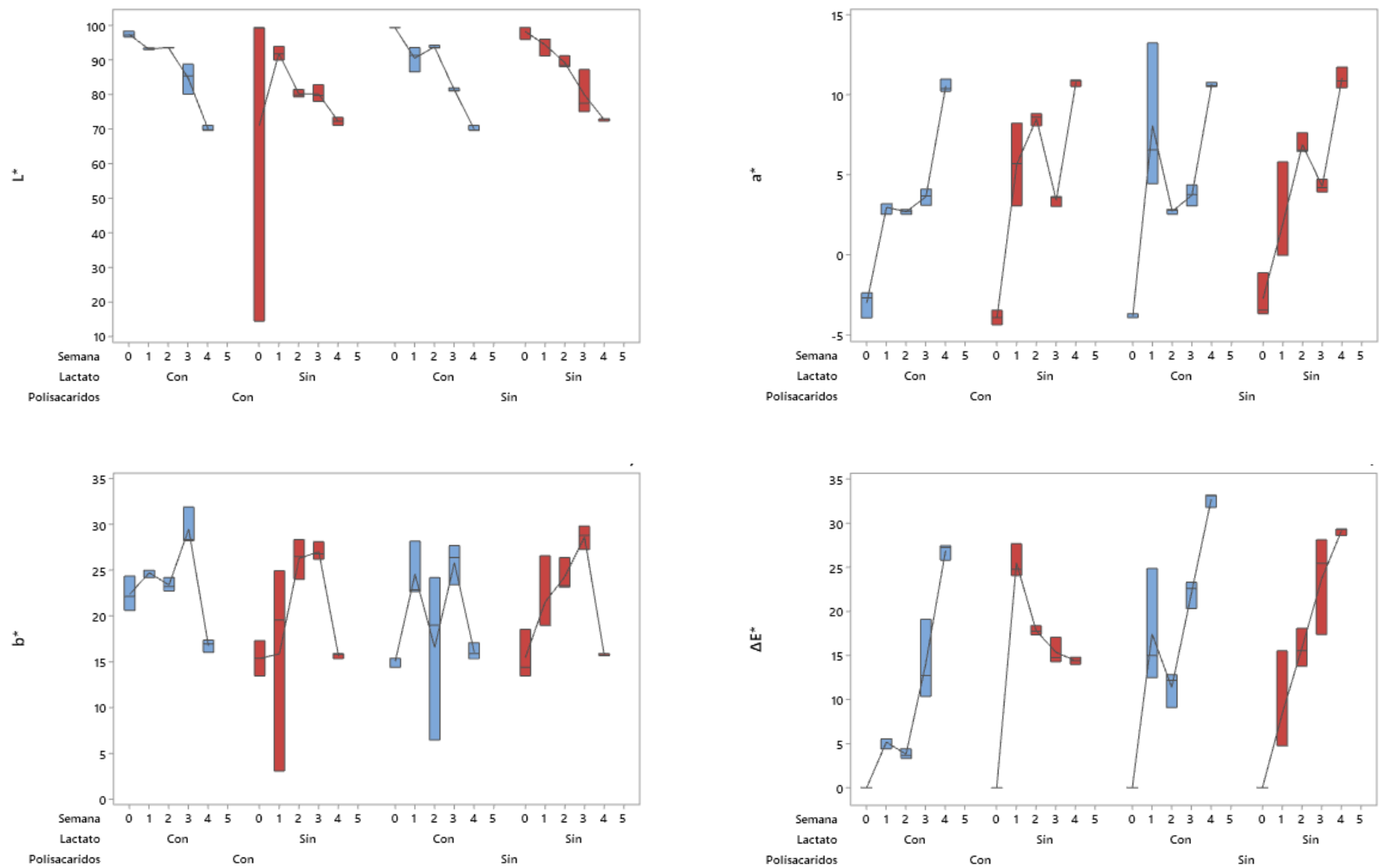


Figura 16. Cambios de color durante el almacenamiento de pera en liquido de cobertura. Índices de color de muestras inmersas en dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja.

De igual forma, los azúcares reductores han sido reportados como agentes que están involucrados en la fase no enzimática de las reacciones formadoras de melaninas a partir de *o*-quinonas y *o*-difenoles (Beigi *et al.*, 2015; García, Giraldo & Hurtado, 2006), como lo muestra la Figura 17.

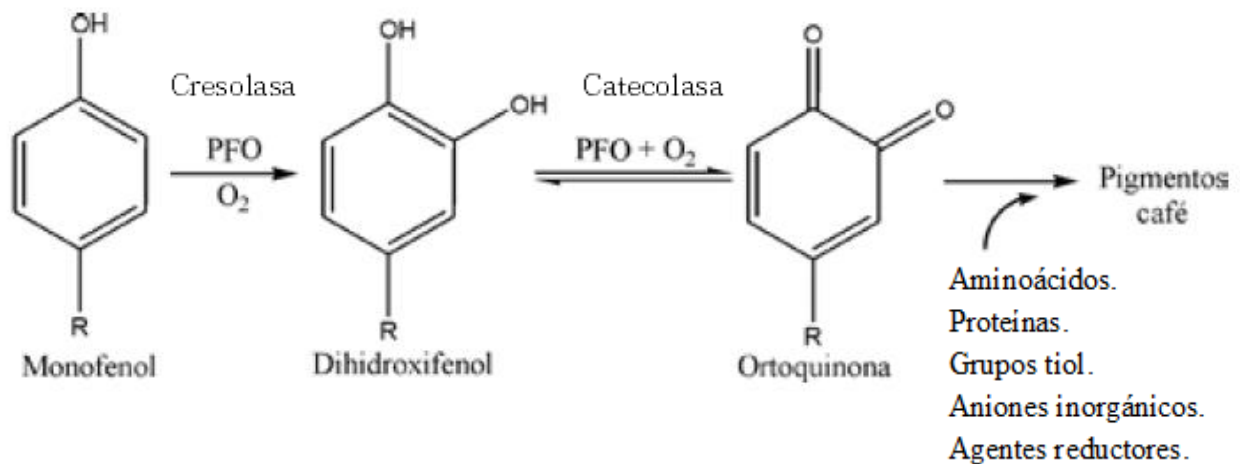


Figura 17. Mecanismo de formación de melaninas (Beigi *et al.*, 2015; García, Giraldo y Hurtado, 2006)

3.3.3. Caracterización textural.

A medida que transcurrieron las semanas en inmersión, el producto disminuyó su dureza, lo cual puede estar relacionado con la hidrólisis de la pectina y la despolimerización, la degradación de las paredes celulares, la descomposición celular debido a la senescencia, y, especialmente en este caso, la absorción de líquido, factores que causan el ablandamiento de la fruta (Khodaei & Hamidi-Esfahani, 2019). La presencia de polisacáridos demostró diferencia significativa ($p > 0.05$). Esto es debido a que la CMC actúa en la superficie de la pera como recubrimiento, formando una barrera que disminuye la absorción de líquido por parte del producto. Así mismo, los fructanos de agave y CMC se unen al agua libre y aumentan la viscosidad del medio, disminuyendo el intercambio de líquido entre el medio y el fruto. Esto concluye en un menor ablandamiento del fruto debido a la hidratación de la pared celular. En la Figura 18 se muestra el comportamiento textural de las muestras al paso del tiempo.

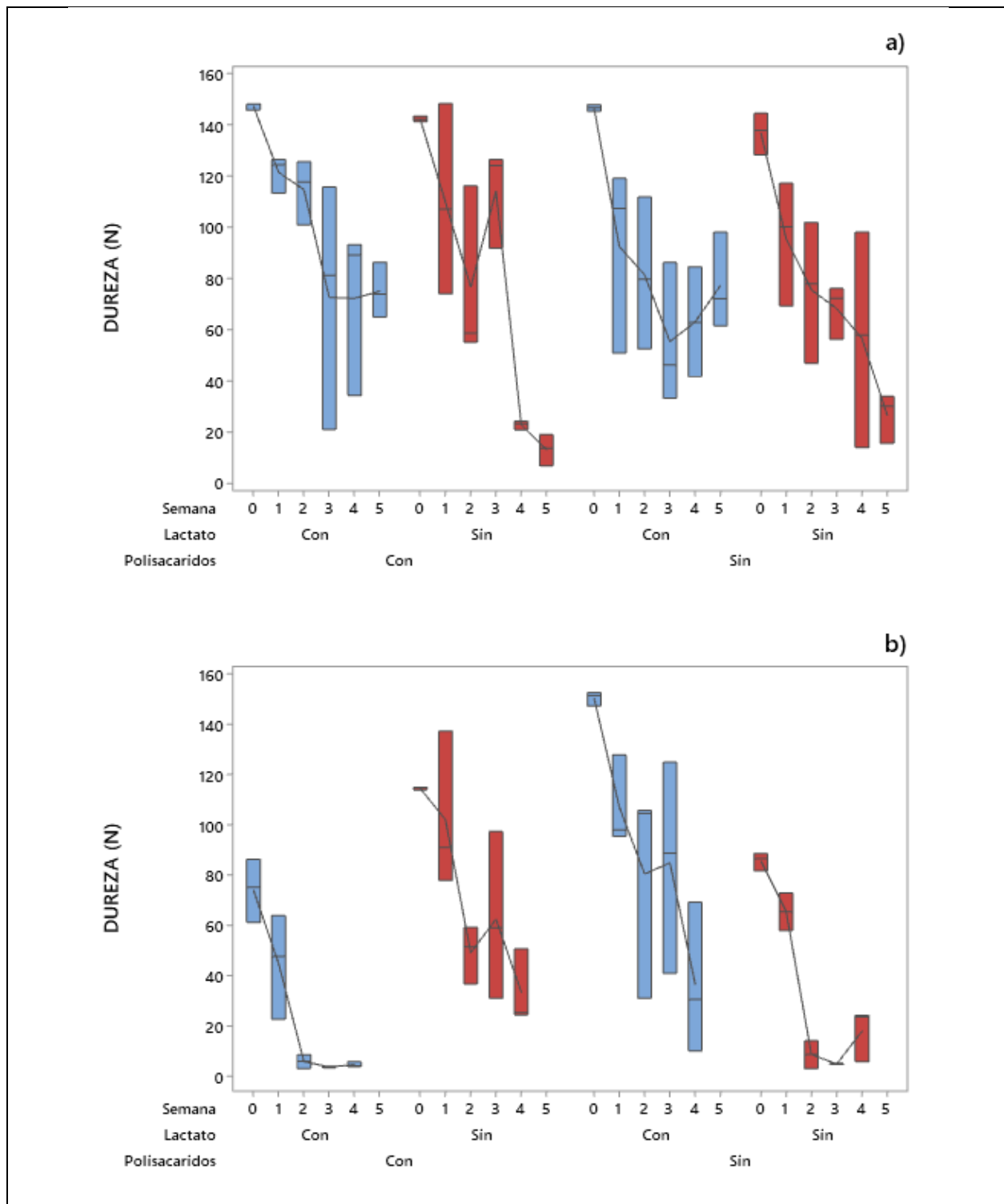


Figura 18. Cambios en la dureza de la pera durante el almacenamiento en líquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos. a) Muestras inmersas en dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja; b) Muestras inmersas en dispersión sin nanopartículas.

Aunado a esto, la degradación de la pared celular conduce a la solubilización de la pectina, lo que reduce la adhesión de la pared y da como resultado el ablandamiento de la textura (Theóphilo *et al.*, 2018). El uso de lactato de calcio como pretratamiento provocó también una diferencia significativa ($p > 0.05$), debido a que el lactato de calcio sirve como un agente reafirmador de textura. El mecanismo de acción en este método se basa en la desmetilación de la pectina natural en los tejidos vegetales por la acción de PME y la quelación del calcio agregado (en este caso como lactato de calcio) con los grupos carboxilo libres generados en las moléculas de pectina. Tal quelación provoca la formación de redes entre las moléculas de pectina mediante el modelo de caja de huevo, estabilizando la pectina y aumentando la firmeza de los tejidos vegetales (Beigi *et al.*, 2015).

3.3.4. Fenoles totales.

En aquellos experimentos que no tuvieron nanopartículas en su formulación es evidente una mayor disminución en la concentración de fenoles totales respecto al tiempo. Estos resultados demuestran que el uso de aceite esencial de toronja tuvo un efecto positivo como antioxidante. La mayoría de los compuestos fenólicos antioxidantes de las plantas se pueden dividir en 4 grandes grupos generales: ácidos fenólicos (ácido gálico, protocatéquico, cafeico y rosmarínico entre otros), diterpenos fenólicos (como ácido carnosol y carnosolico), flavonoides (quercetina y catequina, entre otros) y aceites volátiles (eugenol, carvacrol, timol y mentol, por mencionar algunos). El contenido de compuestos fenólicos totales está estrechamente relacionado con la oxidación en frutos, ya que, tienen una fuerte actividad como donadores de protones. Así mismo, los flavonoides tienen un alto potencial de eliminación de radicales libres debido a los grupos $\cdot\text{OH}$ libres en el esqueleto flavonoide. De igual manera, los polifenoles han demostrado tener un gran potencial para unirse a iones metálicos y cumplir así una función antioxidante quelante (Brewer *et al.*, 2011). La Figura 19 demuestra una clara diferencia entre tratamientos provocada por la presencia de nanopartículas.

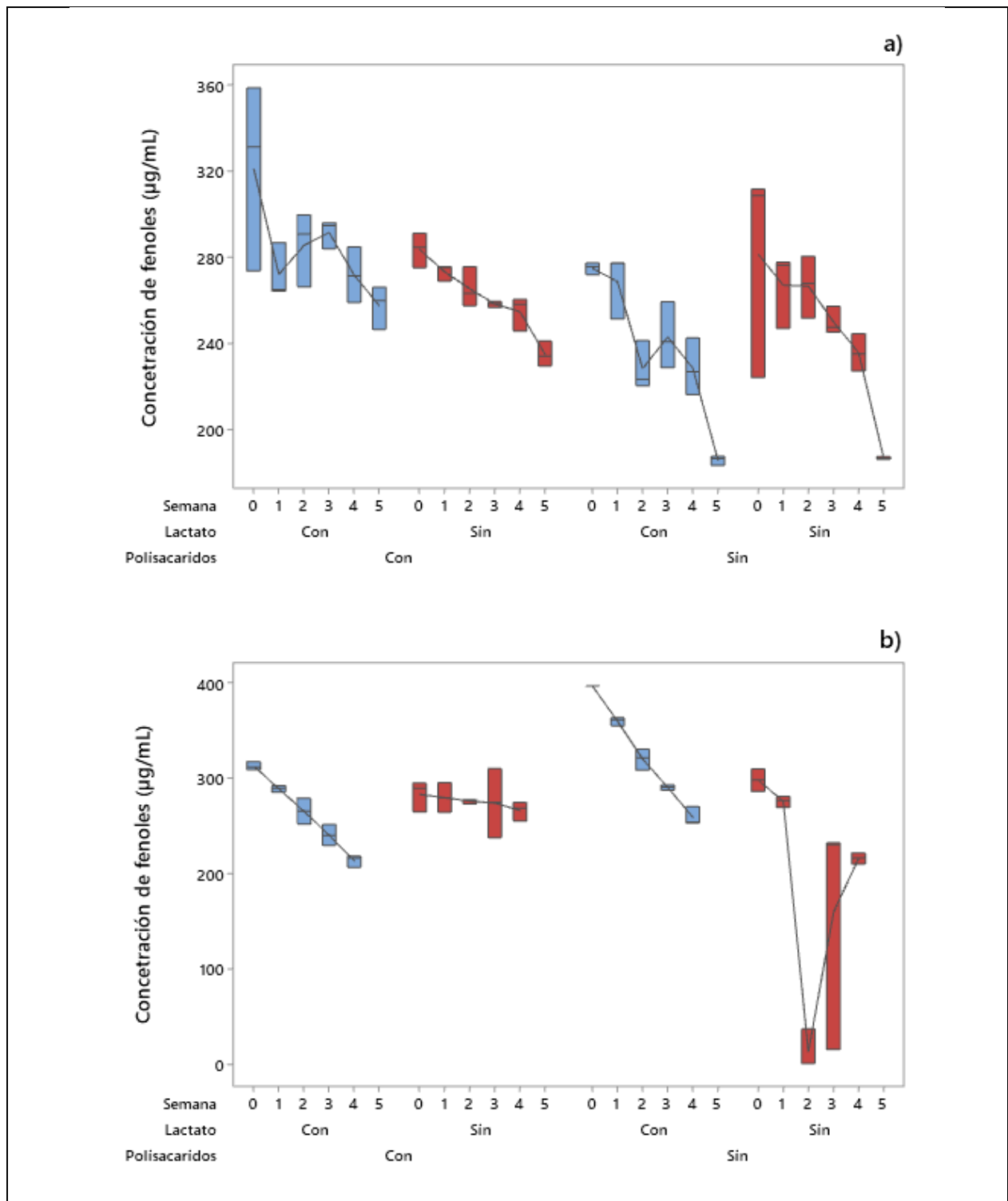


Figura 19. Cambios en el contenido de fenoles totales durante el almacenamiento de pera en líquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos.

a) Muestras inmersas en dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja; b) Muestras inmersas en dispersión sin nanopartículas.

La efectividad antioxidante está relacionada con diversos factores, como la energía de activación, los constantes de la velocidad, el potencial de oxidación-reducción, la facilidad con la que el antioxidante se pierde o destruye (volatilidad y susceptibilidad al calor) y la solubilidad antioxidante (Nawar, 1996). Dentro de las principales sustancias fenólicas que aporta el aceite esencial de toronja se encuentra el limoneno ($72 \pm 1.75 \%$), β -mirceno ($5.55 \pm 0.55 \%$), n-octanal ($4.3 \pm 0.41 \%$), linalol ($2.11 \pm 0.01 \%$) y trans- β -cariofileno ($1.8 \pm 0.15 \%$) (Rojas *et al.*, 2009). En este caso, el uso de aceite esencial de toronja supone una mayor presencia de compuestos fenólicos fácilmente disponibles en el exterior y en la superficie de la fruta. De igual manera, el tamaño subcelular de las nanopartículas permite que dichos compuestos penetren con mayor facilidad en las membrabas del fruto (Furtado *et al.*, 2001), promoviendo la capacidad antioxidante y permitiendo la conservación de los fenoles naturales presentes en la pera. En adición a lo anterior, muchas de estas sustancias funcionan como agentes quelantes de iones metálicos, por lo cual son capaces de unirse al Cu^{2+} de la PPO e inhibir su actividad oxidante.

3.3.5. Polifenol oxidasa (PPO).

En esta prueba los tratamientos que presentaron diferencia significativa fueron aquellos que se sometieron a un pretratamiento con lactato de calcio y que tuvieron polisacáridos en su formulación (fructanos de agave y CMC). Como ya se había mencionado, las polifenol oxidasas son metaloenzimas que contienen cobre situado en el centro activo del enzima, el cual es esencial para la actividad de la polifenol oxidasa y su acomplejamiento da lugar a la inhibición de la misma. Para que la enzima actúe sobre el substrato fenólico, el Cu^{+2} ha de encontrarse reducido a Cu^{+} , estado en el que la enzima puede ligar oxígeno (Pérez, 2003), lo cual se promueve por la presencia de fructanos de agave, formado por D-fructosa unidos glucosídicamente (Guder, 2019). La D-fructosa es una azúcar reductora. Esto quiere decir que, al tener un grupo carbonílico no involucrado en el enlace glucosídico, es capaz de reducir iones férricos o cúpricos (Rédei, 2008). Es así que la presencia de fructanos de agave en los tratamientos reduce el Cu^{+2} de la polifenol oxidasa y funciona como catalizador enzimático. En la Figura 20 se presenta el cambio en la actividad de la PPO respecto al tiempo.

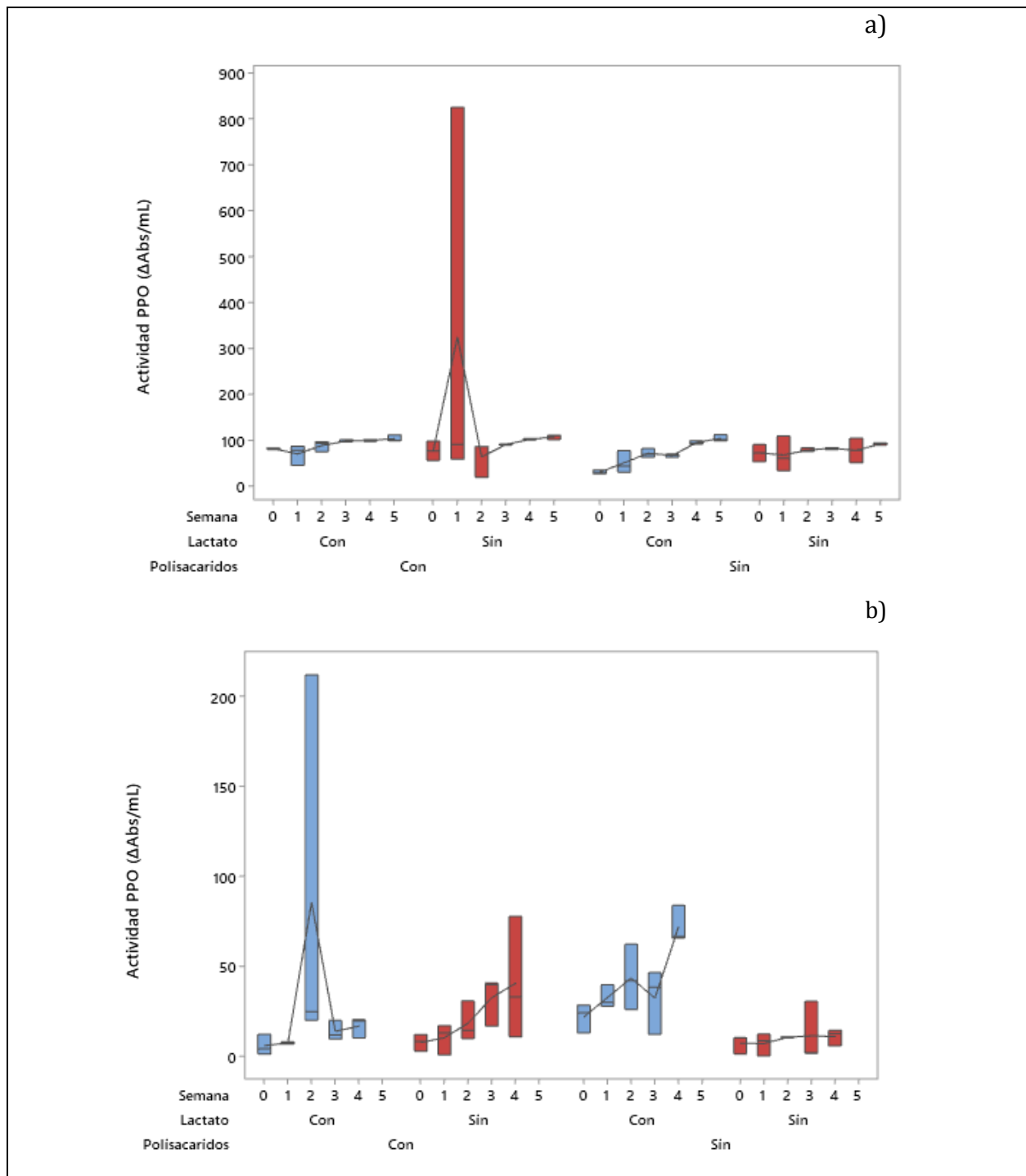


Figura 20. Cambios en actividad de la enzima PPO durante el almacenamiento de pera en líquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos.
a) Muestras inmersas en dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja; b) Muestras inmersas en dispersión sin nanopartículas.

Conforme a lo antes mencionado, bajo la denominación de polifenol oxidasa, quedan comprendidas dos tipos de enzimas. El primer tipo lo constituyen las catecol oxidasas (E.C. 1.10.3.1) y el segundo tipo las lacasas (E.C.1.10.3.2.). Las primeras catalizan dos reacciones distintas: la reacción 1 o actividad cresolasa, que consiste en hidroxilación de monofenoles en la posición orto para obtener *o*-difenoles, y por otro lado la reacción 2 o actividad catecolasa, que es la oxidación de *o*-difenoles a sus correspondientes *o*-quinonas. Estas reacciones pueden ser extraordinariamente rápidas. Si concretamos para la pera, sabemos que los dos compuestos fenólicos mayoritarios en esta fruta, el ácido clorogénico y la epicatequina, son los mejores sustratos endógenos de la polifenol oxidasa característica de esta especie. Los flavonoles también particularmente presentes en ella se degradan durante la oxidación contribuyendo al desarrollo de polímeros coloreados pardos, oscuros, marrones y negros.

3.3.6. Pectin metil esterasa (PME).

La PME es una enzima de origen vegetal (o microbiano en algunos casos) que cataliza la hidrólisis específica del éster metílico enlace en C-6 de un residuo de ácido galacturónico (GalA) en el dominio lineal HG de pectina, alterando así el grado y patrón de esterificación de metilo y liberando metanol y protones. Todas las isoformas de PME catalizan la misma reacción, sin embargo, difieren en pH isoelectrico, masa molar, grado de glicosilación, termoestabilidad y / o propiedades catalíticas. Este mecanismo de acción de la PME puede conducir tanto a la relajación como al reforzamiento de la membrana celular, y esto depende en gran medida de otros componentes en el medio, por lo que la PME es una de las enzimas clave en el contexto del procesamiento de frutas y verduras. Por un lado, cuando se encuentra presente de forma endógena la PME puede afectar positiva o negativamente la calidad estructural de los alimentos de origen vegetal (estabilidad del medio, viscosidad, textura). Por otro lado, la PME, junto con otras pectinasas, encuentra aplicaciones (reales o potenciales) como una ayuda de procesamiento exógeno. El procesamiento de alimentos puede aplicarse para inactivar o aumentar la actividad enzimática (Jolie *et al.*, 2010).

Se ha informado que varios compuestos, tanto proteicos como no proteicos, ejercen un efecto inhibitorio sobre la PME (Jolie *et al.*, 2010). Además de la inhibición del producto final y una serie de sustancias inhibidoras generales, como yodo, agentes tensioactivos, taninos, ácidos fenólicos (como ácido gálico y cumárico), azúcares (como sacarosa y glucosa) y glicerol, se han descrito varios inhibidores específicos de PME de diversas fuentes vegetales, el principal de los cuales es el inhibidor proteico de PME (PMEI) que se encuentra en el kiwi (Jolie *et al.*, 2010).

Estadísticamente el lactato de calcio, la presencia de polisacáridos y las nanopartículas provocaron una diferencia significativa en la actividad de la PME ($p > 0.05$). El efecto más claro es el provocado por los polisacáridos, que actuaron como inhibidores de la PME. También pudieran haber actuado como recubrimiento y junto con el lactato aumentar la fuerza de la pared celular. Las PME se asocian principalmente con la pared celular por interacciones iónicas y, por lo tanto, se liberan en el tratamiento con soluciones de alta fuerza iónica o desplazando el pH hacia la región alcalina. Sin embargo, también se han detectado algunas formas solubles. En este caso, el rebanado en la pera puede liberar las PME al medio, pero el recubrimiento con CMC, el aumento de viscosidad del líquido de conservación por parte de la fructanos de agave y el reforzamiento de la textura por lactato la actividad de la PME sobre la pectina de la pared celular. Lo anterior queda plasmado en la Figura 21, donde se presenta el cambio en la actividad de la PME respecto al tiempo y los tratamientos de conservación.

Respecto a las nanopartículas y conforme a lo que mencionan Jolie *et al.* (2010) el comportamiento fluctuante de la PME puede ser provocado por el aceite esencial de toronja, ya que los diversos ácidos fenólicos de los que está compuesto pueden actuar como inhibidores de ciertas isoformas de PME.

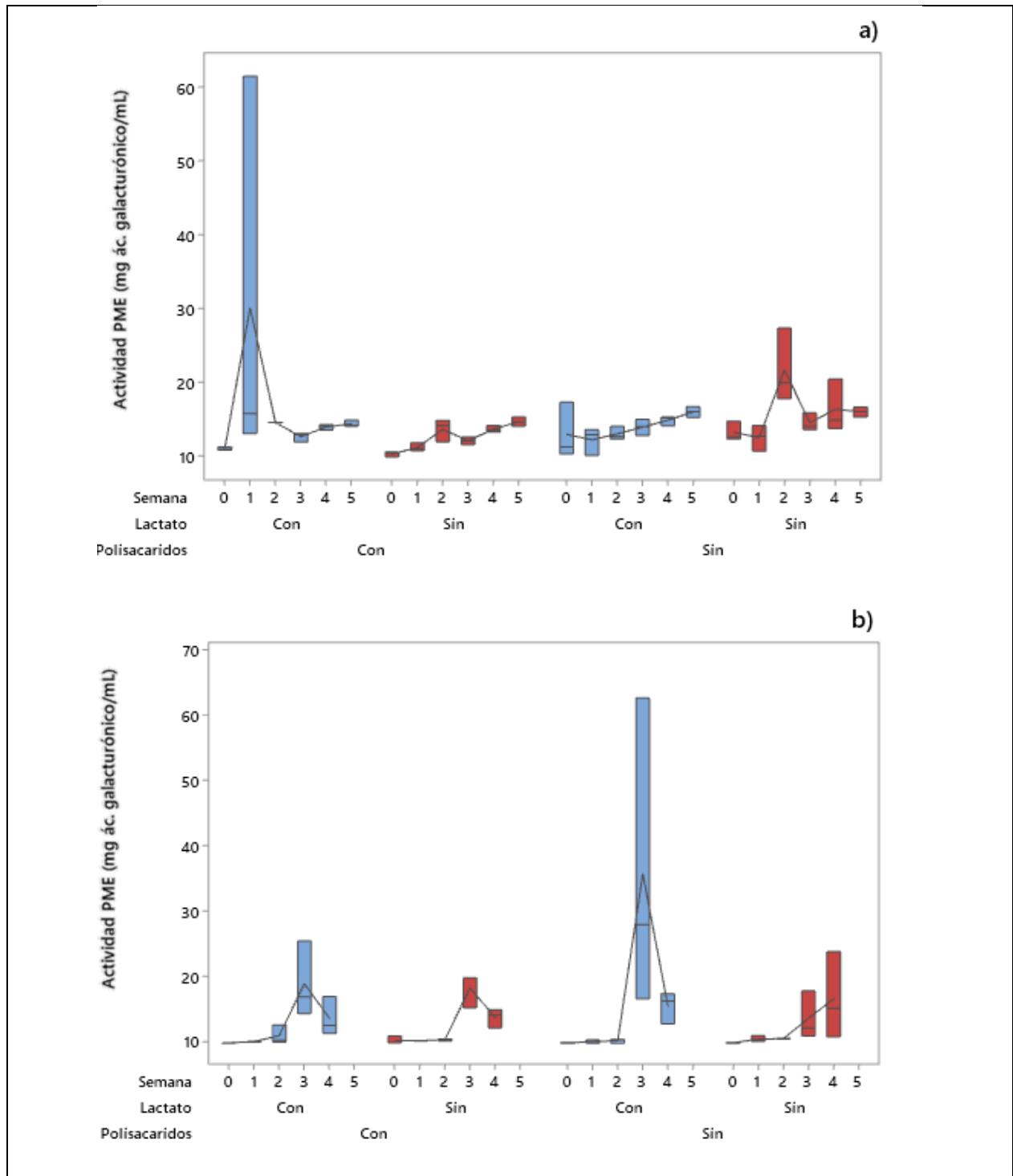


Figura 21. Cambios en actividad de la enzima PME durante el almacenamiento de pera en líquido de cobertura, comparación de los diferentes tratamientos. a) Muestras inmersas en dispersión con nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja; b) Muestras inmersas en dispersión sin nanopartículas.

CONCLUSIONES

La combinación de un pretratamiento con lactato de calcio y una hidroconservación en solución con fructanos de agave, carboximetilcelulosa y nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja, demostró ser la más efectiva para prolongar la vida útil de pera cortada en gajos y almacenada en refrigeración, ya que se logró una disminución de absorción del líquido por parte del fruto, y un decremento en el índice de oscurecimiento, pardeamiento y pérdida de dureza.

El uso de fructanos de agave y carboximetilcelulosa tuvo un efecto sinérgico con las nanopartículas funcionalizadas con aceite esencial de toronja, que permitió la disminución de actividad y movilidad de enzimas polifenol oxidasa y pectinmetilesterasa en el producto.

El líquido de hidroconservación tuvo un aumento respecto al tiempo en parámetros de turbidez y oscurecimiento, así como una disminución del pH. Esto debido a la degradación de la pared celular del fruto y la migración de compuestos al exterior, produciendo una mayor actividad enzimática en el medio. Dichos efectos negativos fueron casi imperceptibles en las primeras semanas, gracias al lactato de calcio que refuerza la pared celular del fruto, a los carbohidratos (fructanos de agave y carboximetil celulosa) que disminuyen la movilidad y actividad enzimática, y a las nanopartículas, que, por su funcionalización con aceite esencial de toronja, penetran fácilmente en el fruto y actúan como antimicrobianos y antioxidantes.

Este proyecto constituye una alternativa viable para la conservación de pera, y pudiera ser aplicado, con pequeñas modificaciones, a gran variedad de frutos; representa también una nueva opción para las industrias alimentarias en México, ya que cumple las demandas del consumidor actual sobre productos mínimamente procesados, nutritivos, con una larga vida de anaquel, y por así llamarlo, de consumo instantáneo. El producto formulado en este proyecto contribuye también a la aplicación de tecnologías emergentes y poco exploradas al campo de alimentación.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo-Fani, A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2017). Nanoemulsions as edible coatings. *Current Opinion in Food Science*, 15, 43-49.
- Aliakbarlu, J., Sadaghiani, S., & Mohammadi, S. (2013). Comparative evaluation of antioxidant and anti food-borne bacterial activities of essential oils from some spices commonly consumed in Iran. *Food science and biotechnology*, 22(6), 1487-1493.
- Álvarez, F., Santamaría D., E., Santamaría F., E., & Lara, E. (2016). Análisis del tiempo de vida útil en la elaboración de mermelada de higuera (Curcúbita Odorifera Vell) con zanahoria (Daucus Carota). *Revista Chilena de Nutrición*, 290-295.
- Alzamora, S., López-Malo, A., Tapia, M., & Welte-Chanes, J. (2016). Minimally processed foods. *Encyclopedia of Food and Health*, 767-771.
- Amaral, E., Grabe-Guimarães, A., Nogueira, H., Machado-Coelho, G., Barrat, G., & Mosqueira, V. (2007). Cardiotoxicity reduction induced by halofantrine entrapped in nanocapsule devices. *Life sciences*, 80(14), 1327-1334.
- Ashby, M., Ferreira, P., & Schodek, D. (2009). *Nanomaterials, nanotechnologies and design: an Introduction for engineers and architects*. China: ELSEVIER.
- Aste, N., Del Pero, C., & Leonforte, F. (2017). Active refrigeration technologies for food preservation in humanitarian context – A review. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*, 22, 150-160.
- Augustin, M., & Oliver, C. (2012). An overview of the development and applications of nanoscale materials in the food industry. En Q. Huang, *Nanotechnology in the food, beverage and nutraceutical industries* (págs. 3-39). Reino Unido: oodhead Publishing Limited.
- Ávalos, A., Haza, A., & Morales, P. (2016). Nanotecnología en la industria alimentaria. I: Aplicaciones. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 1-17.
- Badui, S. (2006). *Química de los alimentos*. (Cuarta ed.). México: Pearson Educación.
- Bag, A., & Chattopadhyay, R. (2018). Evaluation of antioxidant potential of essential oils of some commonly used Indian spices in in vitro models and in food supplements enriched with omega-6 and omega-3 fatty acids. *Environmental Science Pollution Research*, 25, 338-398.
- Bajpai, V., Kamle, M., Shukla, S., Mahato, D., Chandra, P., Hwang, S., . . . Han, Y.-K. (2018). Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(4), 1201-1214.

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and chemical toxicology*, 46(2), 446-475.
- Basak, S., & Guha, P. (2018). A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system. *Journal of Food Science and Technology*, 55(12), 4701-4710.
- Bearat, H., & Vernon, B. (2011). Environmentally responsive injectable materials. En B. Vernon, *Injectable Biomaterials. Science and applications* (págs. 263-297). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Bearat, H., & Vernon, B. (2011). Environmentally responsive injectable materials: Pluronic. En B. Vernon, *Injectable biomaterials. Science and applications* (págs. 263-297). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Beigi, T., Ngadi, M., Holman, D., & Chénier, M. (2015). Pectin Methylsterases: A Review. *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*.
- BeMiller, J., & Whistler. (1996). Carbohidratos. En O. Fennema, K. Parkin, & S. Damodaran, *Introducción a la química de los alimentos* (Tercera ed., págs. 187-267). Zaragoza: Acirbia.
- Berk, Z. (2018). *Food process engineering and technology* (Tercera ed.). Londres: Elsevier.
- Bhushan, B. (2016). Nanoparticle. En B. Bhushan, & B. Bhushan (Ed.), *Encyclopedia of Nanotechnology* (págs. 2568-2578). Dordrecht: Springer.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *International Food Research Journal*, 15(3), 1-12.
- Brewer, M. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10, 221-247.
- Cáceres, I., Mulkay, T., Rodríguez, J., & Paumier, A. (s.f.). *Conservación de productos hortofrutícolas*. La Habana: FAO.
- CANAFEM. (2017). *¿Cuál es el proceso de enlatado de los alimentos?* Obtenido de CANAFEM-SIEM: <https://canafem.org.mx/cual-es-el-proceso-de-enlatado-de-los-alimentos/>
- Casado, J. V. (9 de Julio de 2004). *Aproximación enzimática, molecular y proteómica al estudio de la podredumbre apical de tomate (Lycopersicon esculentum M.): implicación de polifenol oxidasa (PPO) y enzimas antioxidantes*. Obtenido de Repositorio Institucional de la Universidad de Alicante: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/9919/4/Casado-Vela-Juan_3.pdf
- Cassano, D., & Vollani, V. (2018). *Behaviors and persistence of nanomaterials in biomedical applications*. New Jersey: Scrivener.
- Ceballos-Ortiz, E., & Jiménez-Munguía, M. (2012). Cambios en las propiedades de frutas y verduras durante la deshidratación con aire caliente y su susceptibilidad al deterioro microbiano. *Temas Selectos de Ingeniería en Alimentos*, 98-110.
- CODEX. (2009). *CODEX STAN 296-2009 Para las confituras, jaleas y mermeladas*. Comisión del Codex Alimentarius.

- Constanza, L., Antolinez, D., Bohórquez, J., & Corredor, M. (2015). Bacterias anaerobias: procesos que realizan y contribuyen a la sostenibilidad de la vida en el planeta. *NOVA*, 13(23), 55-81.
- Cornejo, L. (14 de Julio de 2015). *Clasificación de los nanomateriales*. Obtenido de Nuevas tecnologías y materiales: <http://nuevatecnologiasymateriales.com/clasificacion-de-los-nanomateriales/>
- Corporación DAMAR. (2017). *Texturómetro*. Obtenido de Equipos de laboratorio de Corporación DAMAR: <http://www.corporaciondamar.com/equipo-de-laboratorio/131-texturometro>
- Cristóbal-Luna, J., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., & Chamorro-CEvallos, G. (2018). Grapefruit and its biomedical, antigenotoxic and chemopreventive properties. *Food and chemical toxicology*, 112, 224-234.
- Cruz, L., Soares, L., Dalla, C., Mezzalira, G., da Silveira, N., Gutierrez, S., & Pohlmann, A. (2006). Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. *International Journal of pharmaceutics*, 313(1-2), 198-205.
- De Mendoza, A. (2018). *Mermeladas caseras*. Obtenido de Gastronomía Solar. Blog "Cocina con el sol": <https://gastronomiasolar.com/como-hacer-mermeladas-caseras/>
- Del Nobile, M., & Conte, A. (2013). *Packaging for food preservation*. New York: Springer.
- Díaz, F. (2012). Introducción a los nanomateriales. Cuautitlán Izcalli, Estado de México , México. Recuperado el 16 de Marzo de 2019
- Díaz-Cruz, C., Regalado, C., Morales-Sánchez, E., Velazquez, G., & Amaya-Llano, S. (2016). Determinación de actividad de pectin metilestrerasa parcialmente purificada de bagazo y pulpa de mango (*Mangifera indica* L.) Var. Keitt. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 406-410.
- Dong, Y., Wang, Y., & Einhorn, T. (2018). Postharvest physiology, storage quality and physiological disorders of 'Gem' pear (*Pyrus communis* L.) treated with 1-methylcyclopropene. *Scientia Horticulture*, 631-637.
- Donsi, F., Annunziata, M., Sessa, M., & Ferrari, G. (2019). Nanoencapsulation of essential oils to enhance their antimicrobial activity in foods. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 1908-1914.
- Drabinska, N., Rosell, C., & Krupa- Kozak, U. (2018). Inulin-Type Fructans Application in Gluten-Free Products: Functionality and Health Benefits. En J.-M. Mérillon, & K. Ramawat, *Bioactive Molecules in Food* (págs. 1-40). Suiza: Springer International Publications.
- Eheim, J., Ndirika, V., Onwuka, U., Garipey, Y., & Raghavan, V. (2019). Water absorption characteristics of *Canarium Schweinfurthii* fruits. *Information processing in agriculture*, 6(3), 386-395.
- Eladio. (2015). *Catálogo de frutas y verduras Eladio*. Obtenido de Frutas y verduras Eladio. Naturalmente cerca.: <http://www.frutaseladio.com/es/pera-d%C2%B4anjou>
- Elaissari, A., Mora-Huertas, C., & Fessi, H. (2009). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 113-142.

- Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). *Edible Films and Coatings for Food Applications*. Londres: Springer.
- Equipos y laboratorio de Colombia. (2011). *Potencial de hidrógeno*. Obtenido de Productos de equipos y laboratorio de Colombia: https://www.equiposylaboratorio.com/sitio/contenidos_mo.php?it=9935
- Escobar, A., Márquez, C., Restrepo, C., Cano, J., & Patiño, J. (2014). Aplicación de tratamiento térmico, recubrimiento comestible y baño químico como tratamientos poscosecha para la conservación de hortalizas mínimamente procesadas. *Agroindustria*, 1-10.
- FAO. (1987). *Manual para el mejoramiento del manejo poscosecha de frutas y hortalizas*. Obtenido de Operaciones de cosecha y campo: <http://www.fao.org/docrep/x5055s/x5055S00.htm>
- FAO. (2005). *CODEX STAN 247-2005: NORMA GENERAL PARA ZUMOS (JUGOS) Y NÉCTARES DE FRUTAS*. FAO.
- FAO. (2018). *CODEX ALIMENTARIUS*. Obtenido de GSFA Online: <http://www.fao.org/gsfaonline/additives/details.html?id=194>
- FDA. (7 de Febrero de 2019). *U.S. Food and Drug Administration*. Obtenido de Generally Recognized as Safe (GRAS): <https://www.fda.gov/food/ingredientspackaginglabeling/gras/>
- FEN. (2011). *Pera*. Obtenido de Mercado Saludable de los alimentos de la Federación Española de la Nutrición: <http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/pera.pdf>
- Fideicomiso de Riesgo Compartido. (11 de Diciembre de 2017). *Frutas deshidratadas o desecadas, bocadillos tradicionales*. Obtenido de Blog del Fideicomiso de Riesgo Compartido: <https://www.gob.mx/firco/es/articulos/frutas-deshidratadas-o-desecadas-bocadillos-tradicionales?idiom=es>
- Furtado, V., Legrand, P., Gulik, A., Bourdon, O., Gref, R., Labarre, D., & Barrat, G. (2001). Relationship between complement activation, cellular uptake and surface physicochemical aspects of novel PEG-modified nanocapsules. *Biomaterials*, 22(22), 2967-2979.
- García, C., Giraldo, G., & Hurtado, M. C. (2006). Cinética enzimática de la polifenol oxidasa del banano Gros Michel en diferentes estados de maduración. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 13(2), 13-19.
- García, E., Fernández, I., & Fuentes, A. (2019). *Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- González, A. (1996). *Generalidades del cultivo del peral : pyrus communis L. Fam Rosaceas*. Toluca: Universidad Autónoma del Estado de México.
- González-Reza, R., García-Betanzos, C., Sánchez-Valdes, L., Quintanar-Guerrero, D., Cornejo-Villegas, M., & Zambrano-Zaragoza, M. (2018). The functionalization of nanostructures and their potential applications in edible coatings. *Coatings-MDPI*, 1-23.
- González-Reza, R., García-Betanzos, C., Sánchez-Valdes, L., Quintanar-Guerrero, D., Cornejo-Villegas, M., & Zambrano-Zaragoza, M. (2018). The functionalization of nanostructures and their potential applications in edible coatings. *Coatings*, 8(160), 1-23.

- Gooch, J. (2007). pH. En J. Gooch, *Encyclopedic Dictionary of Polymers*. New York: Springer.
- Gooch, J. W. (2011). Colorimetry. En G. Jan W., *Encyclopedic Dictionary of Polymers* (pág. 133). New York: Springer.
- Goyenola, G. (2007). *Determinación del pH*. Uruguay: Red de Monitoreo Ambiental Participativo de Sistemas Acuáticos .
- Guder, W. (2019). Inulina. En A. Gressner, & T. Arndt, *Lexicon of Medical Laboratory Diagnostics* (pág. 1275). Alemania: Springer-Nature.
- HACH. (18 de Diciembre de 2018). *How is turbidity measured?* . Obtenido de Hach support: https://support.hach.com/app/answers/answer_view/a_id/1000332
- INTA. (Julio de 2015). *Cavernas en peras almacenadas*. Obtenido de Instituto Nacional d Tecnología Agropecuaria: http://www.cafi.org.ar/wp-content/uploads/2015/07/INTA_Boletin-de-Madurez_No15_temporada-2014-2015.pdf
- INTA. (Mayo de 2016). *Producción mundial de manzanas y peras*. Obtenido de Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_produccion-mundial-de-manzanas-y-peras_0.pdf
- Itziar, A., Garbisu, C., Llama, M., & Serra, J. (1998). Industrial applications of pectic enzymes: a review. *Process Biochemistry*, XXXIII(1), 21-28.
- Jolie, R., Duvetter, T., Van Loey, A., & Hendrickx, M. (2010). Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate research*, 345, 2583-2595.
- Kassai, M. (2018). Zein and zein -based nano-materials for food and nutrition applications: A review. *Trends in food science & technology*, 79, 184-197.
- Khodaei, D., & Hamidi-Esfahani, Z. (2019). Influence of bioactive edible coatings loaded with *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, I(156), 1-9.
- Kirtil, E., Oztop, M., Sirijariyawat, A., Ngamchuachit, P., Barret, D., & McCarthy, M. (2014). Effect of pectin methyl esterase (PME) and CaCl₂ infusion on the cell integrity of fresh-cut and frozen-thawed mangoes: An NMR relaxometry study. *Food Research International*, 66, 409-415.
- Kleppe. (2018). *Kleppe, conciencia natural*. Obtenido de Productos- Peras: <http://www.kleppe.com.ar/productos/peras>
- KONICA MINOLTA. (Agosto de 2015). *Entendiendo El Espacio de Color CIE L*C*h**. Obtenido de KONICA MINOLTA: <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2015/08/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lch/>
- Kou, X., Wu, M., Li, L., Wang, S., Xue, Z., Liu, B., & Fei, Y. (2015). Effects of CaCl₂ dipping and pullulan coating on the development of brown spot on 'Huangguan' pears during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 99, 63-72.
- Lawler, D. W. (2019). Turbidity, turbidimetry, and nephelometry. En P. Worsfold, C. Poole, A. Townshend, & M. Miró, *Encyclopedia of analytical science* (págs. 152-163). Elsevier.

- Lawton, J. (2002). Zein: A History of Processing and Use. *Cereal Chemistry*, LXXIX(1), 1-18.
- Lin, Y., Lin, H., Lin, Y., Zhang, S., Chen, Y., & Jiang, X. (Enero de 2016). The roles of metabolism of membrane lipids and phenolics in hydrogen peroxide-induced pericarp browning of harvested longan fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 53-61.
- Lindo-García, V., Larrigaudière, C., Echeverría, G., Murayama, H., Soria, Y., & Giné-Bordonaba, J. (2019). New insights on the ripening pattern of 'Blanquilla' pears: A comparison between on- and off-tree ripened fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 150, 112-121.
- Liu, Z., Cao, X., Ren, S., Wang, J., & Zhang, H. (2019). Physicochemical characterization of a zein prepared using a novel aqueous extraction technology and tensile properties of the zein film. *Industrial crops and products*, 130, 57-62.
- Maca, M., Osorio, O., & Mejía-España, D. (2013). Inactivación térmica de pectinmetilesterasa en tomate de árbol (*Solanum betaceum*). *Información Tecnológica*, 24(3), 41-50.
- Mitcham, E., Crisosto, C., & Kader, A. (2019). *Pera Anjou, Bosc y Comice: Recomendaciones para mantener la calidad postcosecha*. California: University of California. Postharvest Center.
- Mohammed, W., & Mohammad, S. (2015). *Minimally processed foods: Technologies for safety, quality and convenience*. Londres: Springer.
- Montgomery, M., & Sgarbien, V. (1975). Isoenzymes of banana polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 14(5-6), 1245-1249.
- Morante, J., Agnieszka, A., Bru-Martínez, R., Carranza, M., Pico-Saltos, R., & Nieto, E. (2014). Distribución, localización e inhibidores de las polifenol oxidasas en frutos y vegetales usados como alimento. *Ciencia y Tecnología*, 7(I), 23-31.
- Morreale, F., Benavent-Gil, Y., & Rosell, C. (2019). Inulin enrichment of gluten free breads: Interaction between inulin and yeast. *Food Chemistry*, 278, 545-551.
- Nawar, W. (1996). Lípidos. En O. Fennema, *Química de alimentos* (pág. 225.320). Nueva York: Marcel Dekker, Inc.
- Nieves, A., Bárcena, A., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J., . . . Túnez, I. (2005). *Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas*. Obtenido de Archivos de interés del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Córdoba: https://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/08_ESPECTROFOTOMETRIA.pdf
- OEPM. (2006). *Boletín on line 26 de vigilancia tecnológica. Fundación OPTI VT. Sector Agroalimentario*. Obtenido de Oficina Española de Patentes y Marcas: http://www.oepm.es/export/sites/oepm/comun/documentos_relacionados/Boletines/Sector_agroalimentario/optiagro_2006_02.pdf
- Ourique, A. F., Pohlmann, A. R., Guterres, S. S., & Beck, R. C. (2008). Tretinoin-loaded nanocapsules: Preparation, physicochemical characterization, and photostability study. *International Journal of pharmaceuticals*, 352(1-2), 1-4.

- Pardo, C., Monsalve, G., Erira, A., Espinosa, Y., & Jaramillo, G. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Citrus reticulata* sobre *Fusobacterium nucleatum* asociada a enfermedad periodontal. *Revista Colombiana de Biotecnología*, *XIX*(2), 7-14.
- Parkin, A. (2015). Colorimetry. En A. Parkin, *Digital Imaging Primer* (págs. 269-281). Berlin: Springer.
- Parzanese, M. (Octubre de 2012). Vegetales mínimamente procesados. *Revista Alimentos Argentinos*(55), 30-39.
- Pasquali, R., Chiappetta, D., & Bregni, C. (2005). Los Copolímeros en bloques anfífilos y sus aplicaciones farmacéuticas. *Acta farmacéutica bonaerense*, *XXIV*(4), 610-618.
- Pathakoti, K., Manubolu, M., & Hwang, H.-M. (2017). Nanostructures: Current uses and future applications in food science. *Journal of Food and Drug Analysis*, *25*(2), 245-253.
- Paul, V., Pandey, R., & Srivastava, G. (2012). The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene—An overview. *J Food Sci Technol*, *49*, 1-21.
- PERAS USA. (2016). *PERAS USA sitio web*. Obtenido de Variedades de peras. Anjou verde.: <https://perasusa.com/anjou-verde/>
- Pérez, L. (2003). *Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad blanquilla) mínimamente procesada*. Valencia: Universidad Politécnica de Valencia.
- Prasad, R., Kumar, V., & Kumar, M. (2017). *Nanotechnology, Food and environmental paradigm*. Singapur: Springer Nature.
- ProChile. (2011). *Estudio de Mercado. Pomáceas: Peras y Manzanas en México*. Chile: ProChile.
- PROFECO. (2018). Jugos y néctares. *Revista del consumidor*, 36-45.
- QUANTOTEC. (2019). *Productos, Color y brillo, Colorimetría*. Recuperado el 16 de Septiembre de 2019, de QUANTOTEC, S.L.
- Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H., & Doelker, E. (2008). Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from performed polymers. *Drug development and industrial pharmacy*, *24*(12), 1113-1128.
- Rascón-Chu, A., Martínez-López, A.-L., Carvajal-Millán, E., Martínez-Robinson, K., & Campa-Mada, A. (2016). GELIFICACIÓN IÓNICA DE PECTINA DE BAJO GRADO DE ESTERIFICACIÓN EXTRAÍDA DE MANZANAS INMADURAS DE RALEO. *Fitotecnología Mexicana*, 17-24.
- Rédei, G. (2008). Reducing Sugar. En G. Rédei, *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics and Informatics* (pág. 1658). Dordrecht: Springer.
- Reyes-Ocampo, I., Gonzáles-Brambila, M., & López-Isunza, F. (2013). Un análisis del metabolismo de *Aspergillus niger* creciendo sobre un sustrato sólido. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, *12*(1), 41-56.

- Rico, D., Martín-Diana, A., Frías, J., Barat, J., Henahan, G., & Barry-Ryan, C. (2007). Improvement in texture using calcium lactate and heat-shock treatments for stored ready-to-eat carrots. *Journal of Food Engineering*, 79(4), 1196-1206.
- Rocha, A., & Morais, A. (2011). Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from "Jonagored" apple. *Food Control*, 12(2), 85-60.
- Rodríguez, V., & Simón, E. (2008). *Bases de la alimentación humana*. España: NETBIBLO.
- Rojas, J., Perea, A., & Stashenko, E. (2009). Obtención de aceites esenciales y pectinas a partir de subproductos de jugos cítricos. *Revista de la facultad de química farmacéutica*, 16(1), 110-115.
- Roquesa, V., & Higuera, B. (2007). Aislamiento y caracterización de una polifenoloxidasas relacionada con la tolerancia del clavel (*Dianthus caryophyllus*) a *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi* raza 2. *Acta biológica Colombiana*, 12(2), 81-94.
- SADER. (08 de Octubre de 2016). *¿Pero que rica es la pera?*. Obtenido de BLOG SADER: <https://www.gob.mx/sader/es/articulos/pero-que-rica-es-la-pera>
- SADER. (14 de Octubre de 2017). *Blanca por dentro, verde por fuera, si quieres que te lo diga espera*. Obtenido de BLOG SADER: <https://www.gob.mx/sader/es/articulos/blanca-por-dentro-verde-por-fuera-si-quieres-que-te-lo-diga-espera>
- SADER. (29 de Septiembre de 2018). *Dulces peras, aliadas de nuestra salud*. Obtenido de BLOG DE SADER: <https://www.gob.mx/sader/es/articulos/dulces-peras-un-aliado-para-nuestra-salud?idiom=es>
- SADER. (31 de Julio de 2018). *Pera: fruta jugosa, refrescante y nutritiva*. Obtenido de BLOG SADER: <https://www.gob.mx/siap/articulos/pera-fruta-jugosa-refrescante-y-nutritiva>
- SAGARPA. (2018). *Dulce sabor de la pera mexicana*. Recuperado el 04 de 11 de 2018, de Blog de SAGARPA: <https://www.gob.mx/sagarpa/articulos/dulce-sabor-de-la-pera-mexicana>
- Salama, H., Abdel, M., & Alsehli, M. (2019). Carboxymethyl cellulose/sodium alginate/chitosan biguanidine hydrochloride ternary system for edible coatings. *International Journal of Biological Macromolecules*, CXXXIX(1), 614-620.
- Salazar, A., & Gamboa, A. (2013). Importancia de las pectinas en la dinámica de la pared celular durante el desarrollo vegetal. *Revista de educación bioquímica*, 32(2), 67-75.
- Shahidi, F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Molecular nutrition - Food research*, 44(3), 158-163.
- Shirwaiker, R., Purser, M., & Wusk, R. (2014). Scaffolding hydrogels for rapid prototyping based tissue engineering. En R. Narayan, *Rapid prototyping of biomaterials. Principles and applications* (págs. 176-200). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Shirwalker, R., Purser, M., & Wusk, R. (2014). Scaffolding hydrogels for rapid prototyping based tissue engineering. Principles and applications. En R. Narayan, *Rapid Prototyping of Biomaterials* (págs. 176-200). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Shukla, R., & Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial crops and products*, 171-192.

- Spasojevic, L., Katona, J., Bucko, S., Savic, S., Petrovic, L., Budincic, J., . . . Sharipova, A. (2019). Edible water barrier films prepared from aqueous dispersions of zein nanoparticles. *LWT - Food Science and Technology*, *109*, 350-358.
- Tesfay, S., Magwaza, I., Mbili, N., & Mditshwa, A. (2017). Carboxyl methylcellulose (CMC) containing moringa plant extracts as new postharvest organic edible coating for Avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Scientia Horticulturae*, *CCXXVI*(1), 201-207.
- Theóphilo, A., Araújo, A., Veloso, S., Audino, R., & Rocha, M. (2018). Coating development with modified starch and tomato powder for application in frozen dough. *Food Packing and Shelf Life*, *XVI*(1), 194-203.
- Tinello, F., & Lante, A. (2018). Recent advances in controlling polyphenol oxidase activity of fruit and vegetable products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *50*, 73-83.
- Toivonen, P., & Brummell, D. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest biology and technology*, *48*(1), 1-14.
- Tomás Barberán, F., Gil, M., Cremin, P., Waterhouse, A., Hess- Pierce, B., & Kader, A. (2001). HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches and plums. *Agriculture and Food Chemistry*, *49*, 4748-4760.
- Trigos, Á., Ramírez, K., & Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de micología*, *XXVIII*(1), 125-129.
- Uchôa, L., Pinho, M., Marques, I., Almeida, D. M., Almeida, P., Yeates, S., & Silva, N. (2015). Binary mixture micellar systems of F127 and P123 for griseofulvin solubilisation. *Polímeros*, *XXV*(5), 433-439.
- USDA. (Marzo de 2010). *Información sobre inocuidad de alimentos. Hongos en alimentos: ¿son peligrosos?* Obtenido de Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos : https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/03e22c03-8062-4ca1-a8c2-fe94bafc0222/Molds_Are_They_Dangerous_SP.pdf?MOD=AJPERES
- USDA. (03 de Junio de 2019). *USDA Food Composition Databases*. Obtenido de United States Department of Agriculture Agricultural Research Service: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/>
- Vahedikia, N., Garavand, F., Tajeddin, B., Cacciotti, I., Jafari, S., Omid, T., & Zahedi, Z. (2019). Biodegradable zein film composites reinforced with chitosan nanoparticles and cinnamon essential oil: Physical, mechanical, structural and antimicrobial attributes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *177*, 25-32.
- Valencia, C., Rodríguez, H., & Giraldo, P. (2011). Cinética de la deshidratación y control de la oxidación en manzana Granny smith, mediante la aplicación de diferentes métodos de secado. *Tumbaga*, 7-16.
- Van de Poel, B., Vandendriessche, T., Hertog, M., Nicolai, B., & Geeraerd, A. (2014). Detached ripening of non-climacteric strawberry impairs aroma profile and fruit quality. *Postharvest Biology and Technology*, *95*, 70-80.
- Vauthier, C., & Bouchemal, K. (2008). Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles. *Pharmaceutical research*, *26*(5), 1025-1058.

- Vázquez, E., & Rojas, T. (2016). *pH: Teoría y 232 problemas*. México: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Wallner, G., & Lang, R. S. (2013). Polymeric Materials. En M. Köhl, M. Meir, P. Papillon, G. Wallner, & S. Saile, *Polymeric materials for solar thermal applications* (págs. 135-149). Alemania: Wiley-VCH.
- Wang, J., Jiang, Y., Li, G., Lv, M., Zhou, X., Zhou, Q., . . . Ji, Y. (2018). Effect of low temperature storage on energy and lipid metabolisms accompanying peel browning of 'Nanguo' pears during shelf life. *Postharvest Biology and Technology*, 75-81.
- Wang, L., & Zhang, Y. (2019). Heat-induced self-assembly of zein nanoparticles: Fabrication, stabilization and potential application as oral drug delivery. *Food Hydrocolloids*, 90, 403-412.
- Weiss, J., Sylvia, G., Davidson, M., & McClements, J. (2009). Nanostructured encapsulation systems: food antimicrobials. En G. Barbosa-Cánovas, A. Mortimer, D. Lineback, W. Spiess, K. Buckle, & P. Colonna, *Global issues in food science and technology* (págs. 425-479). Londres: Elsevier.
- Wicker, L., Ackerley, J., & Corredig, M. (2002). Clarification of juice by thermolabile valencia pectinmethylesterase is accelerated by cations. *Journal of agricultural and food chemistry*, C(14), 409-4095.
- Yong, Z., Lili, C., Xiaoxia, C., Heng, Z., Nianqiu, S., Chunlei, L., . . . Wei, K. (2015). Zein-based films and their usage for controlled delivery: Origin, classes and current landscape. *Journal of Controlled Release*, 206, 206-219.
- Yoo, S.-H., Fishman, M., Hotchkiss, A., & Gyu, H. (2006). Viscometric behavior of high-methoxy and low-methoxy pectin solutions. *Food Hydrocolloids*, 62-67.
- Yousuf, B., Qadri, O. S., & Srivastava, A. K. (2018). Recent developments in shelf-life extension of fresh-cut fruits and vegetables by application of different edible coatings: A review. *LWT- Food science and technology*, 89, 198-209.
- Yuliarti, O., Mei, K., Ting, Z., & Yi, K. (2019). Influence of combination carboxymethylcellulose and pectin on the stability of acidified milk drinks. *Food Hydrocolloids*, 89, 216-223.
- Zambrano-Zaragoza, M., González-Reza, R., Mendoza-Muñoz, N., Miranda-Linares, V., Bernal-Couoh, T., Mendoza-Elvira, S., & Quintanar-Guerrero, D. (2018). Nanosystems in edible coatings: A novel strategy for food preservation. *Internacional Journal of Molecular Science*, 1-24.
- Zhang, L., Pornpattananangkul, D., M. J., C., & Huang, C. (2010). Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. *Current medicinal chemistry*, 17, 585-594.
- Zhang, L., Wang, J.-w., Zhou, B., Li, G.-d., Liu, Y.-f., Xia, X.-L., . . . Ji, S.-j. (2019). Calcium inhibited peel browning by regulating enzymes in membrane metabolism of 'Nanguo' pears during post-ripeness after refrigerated storage. *Scientia Horticulturae*, 244, 15-21.
- Zhang, L., Wang, J.-w., Zhou, X., Shi, F., Fu, W.-w., & Ji, S.-j. (2018). Effect of ATP treatment on enzymes involved in energy and lipid metabolisms accompany peel browning of 'Nanguo' pears during shelf life after low temperature storage. *Scientia Horticulture*(240), 446-452.