



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE  
RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES DE  
QUITOSANO Y SU COMBINACIÓN CON  
ACEITES ESENCIALES SOBRE LA VIDA  
ÚTIL DEL MANGO (*Mangifera indica* L.)  
MÍNIMAMENTE PROCESADO**

**Fabián Rico Rodríguez**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos  
Ciudad, Colombia  
2013



**ESTUDIO DE LA APLICACIÓN DE  
RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES DE  
QUITOSANO Y SU COMBINACIÓN CON ACEITES  
ESENCIALES SOBRE LA VIDA ÚTIL DEL MANGO  
(*Mangifera indica L.*) MÍNIMAMENTE  
PROCESADO**

**Fabián Rico Rodríguez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencia y Tecnología de Alimentos**

Directora:

Ph.D. Amanda Consuelo Díaz Moreno

Línea de Investigación:

Aseguramiento de la calidad de alimentos

Grupo de Investigación:

Aseguramiento de la Calidad de Alimentos, Desarrollo de Nuevos Productos

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Bogotá, Colombia

2013



A mi familia y amigos por su apoyo incondicional y por creer en mí en todo momento.



## **Agradecimientos**

A mi directora Consuelo Días Moreno, por su orientación, colaboración, apoyo y confianza en mi trabajo.

A mis papas José Anatolio y Flor Maria, hermanos Alveiro y Natalia y mi sobrina Tannia Andrea que han sido mi apoyo incondicional en todo proyecto que emprendo.

A Carolina Gutiérrez quien con su conocimiento apoyo y paciencia estuvo apoyándome en todo momento para sacar este proyecto adelante.

A Claudia Salazar, por compartir un poco de su conocimiento y por su apoyo incondicional.



## Resumen

Se evaluó el comportamiento de películas con diferentes concentraciones de quitosano y aceites esenciales a partir de parámetros como contenido final de humedad, permeabilidad al vapor de agua, macro y microestructura, elasticidad, resistencia al corte y color. Se encontró que la concentración de quitosano tiene efecto significativo sobre propiedades fisicoquímicas y estructurales de las películas, mientras que los aceites esenciales no ejercen ningún efecto aparente. Se determinó el comportamiento de los recubrimientos de quitosano y aceites esenciales aplicados sobre mango mínimamente procesado (MMP) almacenado en condiciones de refrigeración a 5 °C. Se encontró que los recubrimientos de quitosano y aceites esenciales son capaces de extender la vida útil del MMP, al mantener por más tiempo sus atributos de calidad. Se realizó la evaluación sensorial del MMP con adición de recubrimientos con diferentes concentraciones de quitosano y aceites esenciales. Se encontró que el mango con recubrimiento de quitosano al 1% y aceite esencial al 1% fue el que mayor aceptación tuvo. Se valoró la actividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y aceites esenciales *in vitro* e *in vivo*. Se encontró que los recubrimientos presentaron indicios de actividad antimicrobiana *in vitro* en el control de microorganismos *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. En la evaluación *in vivo* en mango durante el periodo de almacenamiento se encontró un efecto bactericida contra coliformes totales, bacteriostático contra mesófilos aerobios, así como un efecto fungistático.

**Palabras clave:** quitosano, aceites esenciales, películas comestibles, recubrimientos comestibles, vida útil, mango mínimamente procesado.

## Abstract

The behavior of edible films with different concentrations of chitosan and essential oils was evaluated in moisture content, water vapor permeability, macro, microstructure, elasticity, straight stress and color. Chitosan concentration has a significant effect on physicochemical and structural properties of the film. Essential oils do not have any effect on the films. Stability of edible coatings of quitosano and essential oils was evaluated on minimally processed mango (MMP) stored at refrigeration temperatures at 5 °C. edible coatings of chitosan and essential oils can extend shelf life of MMP maintaining its quality attributes for longer periods of time. Sensory evaluation was performed to MMP with different concentrations of chitosan and essential oils. Minimally processed mango coated with chitosan (1%) and essential oil of lemon (1%) had the best sensory acceptance. Antimicrobial activity of chitosan and essential oils was evaluated *in vitro* and *in vivo*. Inhibitory activity *in vitro* showed traces inhibitory activity against *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. Evaluation *in vivo* on mango during storage period showed bactericide effect against total coliforms, bacteriostatic effect against mesophilic aerobic microorganisms, and fungistatic effect.

**Keywords:** Chitosan, essential oils, edible films, edible coatings, shelf life, minimally processed mango.



# Contenido

	Pág.
<b>Resumen</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>X</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XVIII</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Artículo de Revisión: Características antimicrobianas y bioactivas de quitosano y aceites esenciales para elaboración de películas y recubrimientos para bioconservación de frutas mínimamente procesadas</b> .....	
1.1 Resumen.....	3
1.2 Abstract.....	4
1.3 Introducción.....	4
1.4 Obtención de la quitina y el quitosano .....	6
1.4.1 Obtención de la quitina .....	6
1.4.2 Obtención del quitosano .....	7
1.5 Propiedades del quitosano .....	8
1.5.1 Propiedades Fisicoquímicas .....	8
1.5.2 Propiedades Antimicrobianas .....	10
1.5.3 Actividad antifúngica.....	11
1.5.4 Actividad antibacteriana.....	12
1.6 Recubrimientos y películas de quitosano .....	14
1.7 Aplicación de recubrimientos de quitosano sobre frutas .....	15
1.8 Conclusiones.....	17
1.9 Referencias bibliográficas .....	18
<b>2. Características fisicoquímicas de películas comestibles de quitosano y aceites esenciales de cítricos para biopreservar mango mínimamente procesado</b> .....	
2.1 Resumen.....	29
2.2 Abstract.....	29
2.3 Introducción.....	30
2.4 Materiales y métodos .....	32
2.4.1 Elaboración de película.....	32
2.4.2 Contenido de humedad y espesor .....	32
2.4.3 Análisis estructural.....	32

2.4.4	Resistencia al corte y elasticidad.....	33
2.4.5	Permeabilidad al vapor de agua.....	33
2.4.6	Color .....	34
2.4.7	Análisis estadístico.....	34
2.5	Resultados y discusión .....	34
2.5.1	Contenido de humedad y espesor de las películas.....	34
2.5.2	Análisis estructural .....	36
2.5.3	Resistencia al corte y elasticidad.....	39
2.5.4	Permeabilidad al vapor de agua.....	40
2.5.5	Color .....	42
2.6	Conclusiones .....	44
2.7	Referencias bibliográficas.....	45
<b>3.</b>	<b>Influencia de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales de limón y naranja sobre la vida útil de mango mínimamente procesado.....</b>	<b>51</b>
3.1	Resumen .....	51
3.2	Abstract .....	52
3.3	Introducción .....	53
3.4	Materiales y métodos.....	55
3.4.1	Materia prima .....	55
3.4.2	Elaboración del mango mínimamente procesado .....	55
3.4.3	Recubrimientos .....	55
3.4.4	Evaluación sensorial .....	56
3.4.5	Pérdida de peso .....	57
3.4.6	Sólidos solubles, acidez titulable y ácido ascórbico.....	57
3.4.7	Color .....	57
3.4.8	Firmeza y elasticidad.....	58
3.4.9	Fenoles totales y capacidad antioxidante .....	58
3.4.10	Análisis microbiológico .....	59
3.4.11	Análisis estadístico.....	59
3.5	Resultados y discusión .....	60
3.5.1	Evaluación sensorial .....	60
3.5.2	Pérdida de peso .....	61
3.5.3	Sólidos solubles, acidez titulable y ácido ascórbico.....	62
3.5.4	Color .....	64
3.5.5	Textura.....	65
3.5.6	Capacidad antioxidante .....	66
3.5.7	Análisis microbiológico .....	68
3.6	Conclusiones .....	69
3.7	Referencias bibliográficas .....	70
<b>4.</b>	<b>Capacidad inhibitoria <i>in vitro</i> de recubrimientos de quitosano y aceites esenciales de cítricos con aplicaciones en mango mínimamente procesado. ....</b>	<b>77</b>
4.1	Resumen .....	77
4.2	Abstract .....	78
4.3	Introducción .....	78
4.4	Materiales y métodos.....	79
4.4.1	Recubrimientos .....	79

---

4.4.2	Actividad antimicrobiana .....	80
4.5	Resultados y discusión.....	80
4.5.1	Actividad antimicrobiana .....	80
4.6	Conclusiones.....	83
4.7	Referencias bibliográficas .....	83
<b>5.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>87</b>
5.1	Conclusiones.....	87
5.2	Recomendaciones.....	89

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1-1 . Estructura de una fracción de las cadenas de quitina (a) y quitosano (b).....	8
Figura 2-1 Ecuación de permeabilidad al vapor de agua.....	33
Figura 2-2 Micrografías de las películas de CH y AES de limón y naranja. ....	38
Figura 2-3 Variación de la luminosidad (a), parámetro b* (b), Cromaticidad (c), Tono (d) en las películas de de CH y AES.....	44
Figura 3-1 Pérdida de humedad del mango (%) con diferentes recubrimientos.....	62
Figura 3-2 Variación de la acidez total (a) y ácido ascórbico (b) del mango mínimamente procesado con recubrimientos de CH y AES de limón y naranja.....	64
Figura 3-3 Variación de la firmeza (a) y la elasticidad (b) en el mango mínimamente procesado con recubrimientos de CH y AES de limón y naranja.....	66
Figura 3-4 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante del mango mínimamente procesado con recubrimientos de CH y AES de limón y naranja .....	67



## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 2-1 Contenido final de humedad (%) de las películas de quitosano y Aceites esenciales.....	35
Tabla 2-2 Espesor (mm) de las películas de CH y AES .....	36
Tabla 2-3 Esfuerzo al corte de las películas de quitosano y aceites esenciales (MPa)...	40
Tabla 2-4 Permeabilidad al vapor de agua ( $\text{g mm h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{kPa}^{-1}$ ) de las películas de quitosano y aceites esenciales.....	41
Tabla 3-1 Variación de los sólidos solubles en el mango mínimamente procesado .....	63
Tabla 3-2 Variación de parámetros de color en las muestras de mango. ....	65
Tabla 3-3 Efecto de quitosano y aceites esenciales sobre los cambios microbiológicos del mango mínimamente procesado (log UFC/ml) .....	68
Tabla 4-1 Valores de referencia (mm) Ensayos de susceptibilidad de la NCCLS para ampicilina 10 $\mu\text{g}$ . ....	81
Tabla 4-2 Diámetros de inhibición (mm) de CH y AES de limón y naranja .....	82





# Introducción

Por su misma naturaleza, las frutas mínimamente procesadas tienen periodos de vida muy cortos lo que dificulta su conservación y reduce notablemente el tiempo de exposición en anaqueles. Los cambios bioquímicos que sufren después de las operaciones de cosecha y poscosecha provocan alteraciones visibles y en muchos casos poco agradables para el consumidor, quien selecciona éstos productos basándose en sus atributos sensoriales principalmente apariencia y textura.

El mango (*Mangifera indica L.*) es una fruta tropical que debido a sus características sensoriales es apetecido para su consumo en fresco a nivel mundial, lo que genera un reto para su conservación pues una vez sometido a las operaciones transformación, inicia también un proceso de oxidación y pardeamiento, aumento de sólidos solubles y pérdida de agua, así como otros cambios que afectan directamente sobre la calidad final del producto. Debido a la creciente demanda de los productos mínimamente procesados se ha venido trabajando en la búsqueda de diferentes alternativas de empaque y almacenamiento que permitan conservar por más tiempo las características fisicoquímicas que lo hagan sensorialmente aceptable durante los periodos de transporte almacenamiento y distribución.

El uso de películas y recubrimientos comestibles se constituye en una alternativa que ha mostrado buenos resultados al ser usada en diferentes matrices alimentarias y especialmente en la industria de frutas y hortalizas debido no solo a características como

permeabilidad selectiva a gases (oxígeno y productos metabólicos) y humedad, sino a la posibilidad de usar diferentes subproductos y residuos de la industria alimentaria como materia prima, convirtiéndolos en una opción en el manejo de tecnologías limpias. Tal es el caso del quitosano, un polímero obtenido principalmente del exoesqueleto de crustáceos, que además de su capacidad para ser usado como recubrimiento posee propiedades antimicrobianas, lo ha sido objeto de diferentes estudios. Otra característica de los recubrimientos comestibles que presenta bastante interés es su capacidad de actuar como vehículo de diferentes sustancias con funcionalidad tecnológica; tal es el caso de los aceites esenciales de quienes se ha encontrado poseen propiedades antioxidantes, antifúngicas, antibacterianas, entre otras; que pueden ayudar a proteger y/o conservar los alimentos durante los periodos de almacenamiento.

Los aceites esenciales, metabolitos secundarios de las plantas que contienen en su estructura anillos aromáticos, son elaborados naturalmente por diferentes partes de las plantas como hojas, flores y tallos. Como ejemplos de ellos se puede mencionar los aceites esenciales de canela, vainilla, rosas, cítricos como el limón, mandarina y naranja, entre otros. Son ampliamente conocidos por poseer características como capacidad antioxidante y antimicrobiana, con importantes perspectivas para el control de crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes.

Con el desarrollo del presente trabajo se pretendió determinar el efecto del uso de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales sobre el mango mínimamente procesado, evaluando a través de diferentes técnicas de laboratorio los cambios fisicoquímicos, microbiológicos y sensoriales que sufre el mango a lo largo de su vida de almacenamiento en condiciones de refrigeración.

# **1. Artículo de Revisión: Características antimicrobianas y bioactivas de quitosano y aceites esenciales para elaboración de películas y recubrimientos para bioconservación de frutas mínimamente procesadas**

Fabián RICO-RODRÍGUEZ, Carolina GUTIÉRREZ-CORTÉS, Consuelo DIAZ-MORENO.

## **1.1 Resumen**

El quitosano (CH), un polímero de origen animal, ha sido objeto de interés en los últimos años debido a sus propiedades antimicrobianas y a su capacidad para mejorar la estabilidad y vida útil de los alimentos. Se ha encontrado que la molécula de quitosano tiene un amplio espectro de acción *in vitro* contra bacterias gram-negativas, gram-positivas y hongos. Esta capacidad, junto con características como la biodegradabilidad, no toxicidad y capacidad para formar recubrimientos y películas hacen del CH un compuesto ideal para ser usado en la biopreservación de alimentos. El CH es capaz de actuar como vehículo de diferentes compuestos bioactivos que permiten mejorar características de calidad de frutas mínimamente procesadas. Se ha encontrado que los aceites esenciales combinados con recubrimientos o películas de CH reducen la pérdida de humedad, textura y oxidación de tejidos. Además, por su actividad bactericida y fungicida es capaz de prolongar la vida útil de diferentes tipos de frutas. El objetivo del presente documento es presentar de forma concreta las nuevas tendencias del uso de

recubrimientos y películas de quitosano como componente activo y las tendencias de su uso en la conservación de frutas mínimamente procesadas.

**Palabras clave:** Antimicrobiano, biopreservación, frutas mínimamente procesadas, recubrimiento comestible.

## 1.2 Abstract

Chitosan, a polymer from animal sources, has been recently studied due to its antimicrobial properties and its capacity to improve stability and shelf life of food. Chitosan molecule has shown a high action spectrum *in vitro* against gram-positive, gram-negative and fungi. This ability, along to characteristics like biodegradability, non toxicity and film and coating forming property performs chitosan as an ideal compound to be used in food biopreservation. CH may act as vehicle for different bioactive compounds which help to improve the quality of minimally processed fruits. It's been found that essential oils combined with films or coatings of CH reduce loss of weight, texture and tissues oxidation. Also, due to its bactericide and fungicide activity, CH and essential oils are able to extend shelf life of different fruits. The aim of this paper is to present in short the new tendencies in use of chitosan films and coatings as active component and its trends in minimally processed fruits preservation.

**Keywords:** Antimicrobial, biopreservation, minimally processed fruits, edible coat.

## 1.3 Introducción

La quitina es un polisacárido de cadena lineal (Battisti y Campana-Filho, 2008) de origen animal que se encuentra distribuido ampliamente en la naturaleza haciendo parte importante de la estructura del exoesqueleto de insectos y crustáceos (Goy *et al.*, 2009;

Kong *et al.*, 2010; Majeti N.V, 2000), así como de algunas especies de hongos (*Aspergillus niger*, *Mucor rouxii*, *Penicillium notatum*) (Devlieghere *et al.*, 2004); después de la celulosa, es el biopolímero más abundante en la naturaleza (Dutta *et al.*, 2009). La quitina consiste de uniones de 2-deoxi  $\beta$ -D-glucano a través de enlaces  $\beta(1\rightarrow4)$ , que a pesar de la presencia de grupos acetamido en el carbono C2 posee una estructura y distribución similar a la molécula de celulosa y como ésta su función es estructural (Abdou *et al.*, 2008; Majeti N.V, 2000). Como características físico-químicas se tienen entre otras que la quitina es un compuesto de color blanco, con una estructura cristalina altamente ordenada, poca solubilidad y reactividad (Goy, *et al.*, 2009), alta dureza y baja elasticidad. Adicionalmente es considerado la mayor fuente de polución superficial en áreas costeras (Abdou, *et al.*, 2008; Majeti N.V, 2000).

Cuando se modifica la estructura de la quitina removiendo los grupos acetilo unidos al grupo amino del Carbono C2 en el anillo del glucano por medio de una hidrólisis alcalina a elevadas temperaturas se produce el (1 $\rightarrow$ 4)-2-amino-2-deoxi- $\beta$ -D-glucano (Glucosamina) y (1 $\rightarrow$ 4)-2-acetamida-2-deoxi- $\beta$ -D-glucano (N-Acetil-glucosamina), conocido como quitosano (Battisti y Campana-Filho, 2008; Dutta, *et al.*, 2009; Goy, *et al.*, 2009; Pedro *et al.*, 2009) con predominio de la primera unidad (Battisti y Campana-Filho, 2008). La quitina ha sido objeto de diversos estudios debido a su potencial aplicación en la industria de alimentos, agrícola, y tratamiento de aguas residuales. En la industria de alimentos se han realizado diferentes estudios sobre el uso del quitosano en diferentes matrices (frutas y hortalizas, lácteos, cárnicos) debido a las propiedades plastificantes y antimicrobianas que éste presenta (Embuscado y Huber, 2009). En este mismo sentido, en los últimos años se han hecho varios estudios para conocer las características del uso del quitosano como empaque (Abugoch *et al.*, 2011; Dutta, *et al.*, 2009; Mohammed, 2010) y como agente conservante para alimentos generando resultados que alientan a su

uso en la industria (Chien *et al.*, 2007; Devlieghere, *et al.*, 2004; Fernandez-Saiz *et al.*, 2008; Hernández-Muñoz *et al.*, 2008).

El objetivo del presente documento es dilucidar la potencial aplicación del quitosano como ingrediente en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles con capacidad biopreservante en la industria de las frutas mínimamente procesadas.

## 1.4 Obtención de la quitina y el quitosano

### 1.4.1 Obtención de la quitina

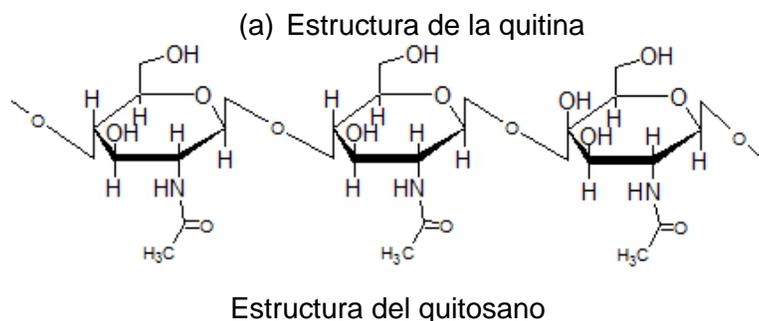
En general, la obtención de la quitina se realiza a partir de krill (Teng *et al.*, 2001), insectos y caparazones de crustáceos, siendo los camarones la fuente más importante entre ellos (Goy, *et al.*, 2009; Kong, *et al.*, 2010; Kucukgulmez *et al.*, 2011; Majeti N.V, 2000). La obtención de este compuesto se realiza a través de un proceso que consta de tres etapas, desmineralización, deproteinización y despigmentación (Battisti y Campana-Filho, 2008). De igual manera, la quitina es el componente característico de los grupos taxonómicos *Zygo-*, *Asco-*, *Basidio-* y *Deuteromycetos* (Muzzarelli *et al.*, 2012). La producción de complejos quitosano-glucano son asociados con los procesos de fermentación similares a aquellos para producir ácido cítrico a partir de *Aspergillus niger*, *Mucor rouxii* y *Streptomyces* donde están involucrados tratamientos alcalinos (Majeti N.V, 2000).

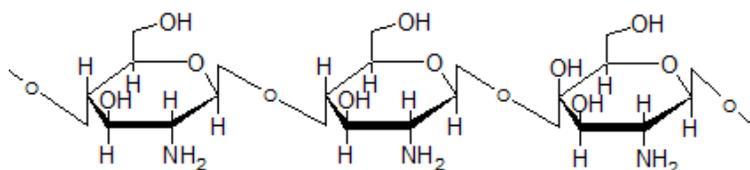
La obtención convencional de quitina consiste de una adecuación de las materias primas a través de las operaciones de lavado, secado y troceado en piezas pequeñas (Abdou, *et al.*, 2008). Una vez se cuenta con materia prima uniforme, se procede a la extracción de la quitina de los desechos de crustáceos por medio de un tratamiento ácido a elevadas temperaturas, generalmente con ácidos como el clorhídrico o nítrico, con el fin de

remover el calcio y otros minerales que se encuentran presentes. Seguido se realiza una deproteinización (remoción de proteínas) a través de un tratamiento con hidróxido de sodio (Goy, *et al.*, 2009; Rinaudo, 2006; Teng, *et al.*, 2001) a temperaturas que oscilan entre 105 y 110 °C (Abdou, *et al.*, 2008). Posterior a estos tratamientos se realiza una despigmentación a través de reacciones con permanganato de potasio, ácido oxálico y sulfúrico ó a través de reflujos con etanol por varias horas. El producto obtenido es una sustancia incolora, de estructura cristalina, altamente ordenada y resistente (Abdou, *et al.*, 2008; Rinaudo, 2006; Teng, *et al.*, 2001), es insoluble en agua y varios otros solventes. Sin embargo, la modificación de su estructura se lleva a cabo para incrementar su grado de solubilidad (Sagheer *et al.*, 2009).

### 1.4.2 Obtención del quitosano

El quitosano es el principal derivado de la quitina (Figura 1); obtenido a través de su deacetilación parcial en estado sólido bajo condiciones alcalinas con hidróxido de sodio concentrado (Kucukgulmez, *et al.*, 2011; Rinaudo, 2006) o por hidrólisis enzimática en presencia de la quitin deacetilasa (Rinaudo, 2006). El objetivo de realizar la deacetilación de la quitina es obtener un polímero mucho más versátil como mayor solubilidad en agua (Domard, 2011). Algunos autores como Camacho *et al.* (2010) reportan un proceso de fermentación previo a la deacetilación con mezclas de bacterias del género *Lactobacillus* a 30 °C durante un periodo de 2 días.





**Figura 1-1 .** Estructura de una fracción de las cadenas de quitina (a) y quitosano (b).

Algunas especies de la familia de los Zygomycetos son conocidas por tener quitosano como componente natural de su pared celular. Se ha reportado que el género *Absidia* produce quitosano con posibilidades de producción a escala comercial (Wang *et al.*, 2008). También ha sido reportada producción de quitosano a partir de los especies como *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Mucor rouxii*, *Phycomyces blakesleeanus*, *Coprinus cinereus*, *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, *Rhizopus* spp., *Absidia* spp., *Mucor* spp., *Mortierella isabelina*, *Lentinus edode* y *Aspergillus niger* a partir de su pared celular o su septo (Chatterjee *et al.*, 2005; Logesh *et al.*, 2012; Suntornsuk *et al.*, 2002; Yen *et al.*, 2007).

En estado sólido, el quitosano es un polímero semicristalino, aunque han sido reportadas varias formas polimórficas que varían en contenido de agua y densidad (Kim, 2011; Rinaudo, 2006).

## 1.5 Propiedades del quitosano

### 1.5.1 Propiedades Físicoquímicas

A diferencia de la mayoría de polisacáridos que se encuentran en la naturaleza, el quitosano presenta un carácter básico (Kim, 2011) confiriéndole propiedades únicas como formación de polioxisales, formación de películas, quelación de iones metálicos y estructuras ópticas características (Majeti N.V, 2000). La gran cantidad de grupos amino que posee en su estructura, hace que el quitosano sea capaz de interactuar con

diferentes sustancias para formar complejos. El quitosano es soluble en agua a pH neutro, soluble en ácido acético y en ácido clorhídrico, pero insoluble en ácido sulfúrico (Embuscado y Huber, 2009). Cuando el grado de deacetilación del quitosano alcanza un 50%, el quitosano aumenta su solubilidad en soluciones acuosas ácidas comportándose como una molécula polielectrolita catiónica anfipática (Devlieghere, *et al.*, 2004; Sagheer, *et al.*, 2009), por lo que sus propiedades en solución dependerán del balance entre sus interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. Miranda (2004) reporta solubilidad de quitosano con grado de deacetilación de 40% a pH de hasta 9.0 en solventes orgánicos, mientras que para un grado de deacetilación mayor a 85% es soluble solo hasta pH de 6.5. La forma más comúnmente encontrada de quitosano tiene alrededor de 85% de deacetilación, aunque se puede encontrar comercialmente entre 70% y 90% (Embuscado y Huber, 2009; Roller y Covill, 1999; Shalaby y Burg, 2005). Además de afectar notoriamente su solubilidad, el grado de deacetilación del quitosano presenta efectos sobre las propiedades físicas y químicas, así como sobre su actividad biológica (Sagheer, *et al.*, 2009).

Por otro lado, el peso molecular del quitosano es un factor que determina sus propiedades fisicoquímicas (Kim y Rajapakse, 2005), así como su comportamiento, es decir, dependiendo de su grado de polimerización será mayor o menor su actividad biológica (Wang, *et al.*, 2008). El peso molecular del quitosano depende en gran medida de la fuente del mismo, y el grado de deacetilación. Así como varios factores que afectan durante su obtención como la temperatura, concentración de álcali, tiempo de reacción, tratamientos previos de la quitina, tamaño de partícula, concentración de oxígeno disuelto y esfuerzo cortante (Kim, 2011; Kucukgulmez, *et al.*, 2011).

De acuerdo con resultados reportados por Signini *et al.* (2001), al tener quitosano purificado de diferentes formas (neutra, acetato y clorhidrato) se obtienen diferentes características de solubilidad. Todas las muestras analizadas son solubles en soluciones de ácido acético, pero las obtenidas como clorhidrato son completamente solubles en agua.

En cuanto a propiedades como la viscosidad, Kucukgulmes *et al.* (2011) reportó que esta se relaciona directamente con la temperatura y el tiempo de deacetilación de la quitina. Se obtiene una mayor viscosidad con altas temperaturas y periodos cortos tiempos.

Por otro lado, el quitosano es un compuesto biodegradable, de baja toxicidad y buena biocompatibilidad; propiedades que lo hacen apropiado para usos biomédicos, farmacéuticos, bioremediación ambiental, protección de semillas y aplicaciones en la industria alimentaria (Bevilacqua *et al.*, 2010; Kim, 2011).

### **1.5.2 Propiedades Antimicrobianas**

Aún cuando los patógenos son eliminados completamente de los alimentos durante su procesamiento, existe el riesgo latente de recontaminación del producto después de su procesamiento (Fernandez-Saiz, *et al.*, 2008). Dentro de las propiedades biológicas que posee el quitosano se encuentra su capacidad de actuar como agente antimicrobiano, área en la cual han sido realizados diferentes trabajos en donde se ha evaluado su capacidad contra algas, levaduras, bacterias y mohos *in vitro* e *in vivo* (Goy, *et al.*, 2009). Su actividad antimicrobiana, como ya se mencionó, depende de diversos factores como el pH, grado de deacetilación y polimerización (Benhabiles *et al.*, 2012; Devlieghere, *et al.*, 2004; Goy, *et al.*, 2009; Kong, *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2006). De igual manera está dada por otros factores como el tipo de microorganismo, estados físico del quitosano,

factores ambientales, métodos complementarios de control y composición química del sustrato según lo describen Kong *et al* (2010) y Dutta *et al* (2009).

Una de las razones por las que el quitosano presenta actividad antimicrobiana es debido a la carga positiva que exhibe el grupo amino en el carbono C2, que se cree interactúa con las paredes celulares de los microorganismos cargadas negativamente (Dutta, *et al.*, 2009; Helander *et al.*, 2001). Esta interacción conduce a la filtración de electrolitos y constituyentes proteicos desde interior de la célula (Devlieghere, *et al.*, 2004; Mellegård *et al.*, 2011). Otro modo de acción sugiere que cuando el quitosano (<5000 kDa) logra penetrar la membrana celular y es adsorbido por el DNA bacteriano interrumpe el procesos de transcripción del RNA (Benhabiles, *et al.*, 2012). Goy *et al* (2009) sugieren un tercer mecanismo de acción que se basa en la quelación de metales unidos a nutrientes esenciales para el crecimiento celular, mecanismo que es más eficiente a pH elevado donde los iones positivos son ligados al quitosano.

### **1.5.3 Actividad antifúngica**

Aunque la actividad antimicrobiana del quitosano ha sido comprobada contra diferentes tipos de microorganismos, varios estudios han demostrado que ésta es mayor contra bacterias que contra hongos (Ziani *et al.*, 2009). En varios estudios se ha encontrado que la capacidad fungicida del quitosano está correlacionada en gran medida con su concentración encontrando a su vez que medios suplementados con altas concentraciones de quitosano de bajo peso molecular son capaces de inhibir el crecimiento de micelios (Bautista-Baños *et al.*, 2006; Hernández-Lauzardo *et al.*, 2008; Ziani, *et al.*, 2009). Anivel de laboratorio se ha encontrado que el quitosano es capaz de inhibir el crecimiento de diferentes tipos de hongos como *Fusarium. oxysporium* y *Phytium. aphanidermatum* inoculados en semillas de tomate inmersas en soluciones de quitosano

entre 0,5 y 2,0 mg/ml donde se encontró reducción en el número de lesiones causadas por estos hongos (Bautista-Baños, *et al.*, 2006). Hernandez-Lauzardo (2008) encontró que quitosano de bajo peso molecular en concentración de 10 mg/ml presentó inhibición en el crecimiento *in vitro* de micelios de *Rhizopus stolonifer*. Los resultados no parecían estar relacionados con la concentración del quitosano sino con su grado de polimerización. El efecto observado fue sobre la esporulación. En otro trabajo, se evaluó el efecto del quitosano de diferente peso molecular en solución al 1% m/v y películas contra *Alternaria alternata*, *A. niger* y *Rhyzopus oryzae*. En los tres casos se observó inhibición del crecimiento, siendo una variable la forma de aplicación. En el caso de *R. oryzae* y *A. alternata* fue más efectivo el uso del quitosano en solución, mientras que para *A. niger* fue más efectivo el uso en películas comestibles (Ziani, *et al.*, 2009).

Por otro lado, Xia, *et al.* (2011) reporta que para *Fusarium oxysporum*, *Phomopsis fukushi* and *A. alternata* el quitosano de bajo peso molecular tiene mayor actividad inhibitoria que el quitosano de alto peso molecular. Se ha estudiado también la actividad antifúngica *in vitro* del quitosano contra *Guignardia citricarpa* encontrando que el quitosano al 1% inhibió completamente su crecimiento (Rappussi *et al.*, 2009).

En otros trabajos se reporta que la actividad del quitosano contra hongos tiene un carácter fungistático más que fungicida (Devlieghere, *et al.*, 2004; Goy, *et al.*, 2009; Rico-Rodríguez *et al.*, 2012) al ser bastante efectivo en la inhibición de la germinación de esporas (Goy, *et al.*, 2009).

#### **1.5.4 Actividad antibacteriana**

La acción bactericida del quitosano ha sido bastante discutida debido a que algunos autores proponen que su efectividad es mayor contra bacterias gram-positivas, mientras

que otros sostienen que posee mayor eficacia contra bacterias gram-negativas (Devlieghere, *et al.*, 2004; Goy, *et al.*, 2009; Kong, *et al.*, 2010).

En trabajos realizados para evaluar la eficacia del quitosano frente a microorganismos patógenos de alimentos como la *Listeria monocytogenes* se ha encontrado que su crecimiento se ve significativamente reducido al entrar en contacto con películas preparadas con esta sustancia (Sánchez-González *et al.*, 2010). Al igual que en *L. monocytogenes*, se ha encontrado que el quitosano es eficaz contra patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* en ensayos realizados *in vitro* (Dutta, *et al.*, 2009). En otros trabajos se evaluó el efecto de películas de quitosano contra *S. aureus* y *Salmonella ssp.* encontrando una reducción significativa en el crecimiento de estas bacterias al realizar pruebas de inhibición (Fernandez-Saiz, *et al.*, 2008; Fernandez-Saiz *et al.*, 2009). Se observó inhibición del crecimiento de la población de *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Salmonella typhimurium* con quitosano a 250 ppm, en cuyo caso se concluyó que el quitosano es capaz de bloquear las propiedades de barrera de la membrana celular externa de las bacterias gram-negativas considerándolo como un antimicrobiano de acción indirecta (Helander, *et al.*, 2001). En estudios realizados para evaluar la efectividad del quitosano contra *B. subtilis*, evaluando germinación de esporas y crecimiento en presencia de quitosano con diferentes propiedades moleculares, se encontró una relación entre crecimiento, concentración y peso molecular (Mellegård, *et al.*, 2011). En resultados reportados por Mohammed (2010) se muestra también actividad inhibitoria de quitosano contra *E. coli*, *Salmonella choleraesius*, *S. typhimurium* y *S. aureus* con una concentración mínima inhibitoria menor a 0,25 mg/ml.

La actividad antibacteriana y antifúngica del quitosano hace de este un compuesto de particular interés para ser usado como coadyuvante de diferentes técnicas de

conservación de alimentos. Aunque, al encontrar complejidad y variabilidad en su composición puede también variar los resultados obtenidos entre estudios *in vitro* e *in vivo*.

## 1.6 Recubrimientos y películas de quitosano

Aunque presentan diferencias principalmente en el pH y tipo de acidificante del medio, el quitosano se emplea básicamente de dos formas cuando se pretende usar para la conservación de alimentos, la primera en forma de recubrimiento (solución acuosa en la cual se inmersa la sustancia a recubrir) y la segunda en forma de película o film (piel o capa delgada formada por un polímero) (Embuscado y Huber, 2009). Lo anterior debido a las capacidad de formación de películas y a sus características mecánicas, de barrera, comestibilidad, biocompatibilidad, apariencia, no toxicidad, no contaminante y antimicrobiano (Abugoch, *et al.*, 2011; Mohammed, 2010; Vásconez *et al.*, 2009). Aunque estas varían de acuerdo a los solventes usados y la fuente del quitosano, entre otros (Abugoch, *et al.*, 2011).

El quitosano es una sustancia que permite ser utilizada en conjunto con otros compuestos para formar recubrimientos o películas, este es el caso de su mezcla con almidones (Pitak y Rakshit, 2011; Vásconez, *et al.*, 2009), proteínas (Abugoch, *et al.*, 2011; Atarés *et al.*, 2010), lípidos (Vargas *et al.*, 2006). También pueden actuar como vehículo de diferentes sustancias (Embuscado y Huber, 2009; Falguera *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012).

En general, los recubrimientos se trabajan con concentraciones de quitosano de hasta 3% m/v disueltas en diferentes soluciones de ácido clorhídrico, acético, láctico, entre otros al 1% v/v. Diversos autores reportan un tiempo de agitación de entre 30 minutos y 3

horas agregando también glicerol al 1% v/v con el fin de lograr una adecuada homogenización del polímero, posteriormente se realiza una degasificación (Dong *et al.*, 2004; Falguera, *et al.*, 2011; Ferreira-Soares *et al.*, 2011; Rico-Rodríguez, *et al.*, 2012). Una vez hecho esto se realiza una pasteurización o esterilización.

Para la elaboración de las películas comestibles de quitosano se realiza el mismo procedimiento y posteriormente se somete a un secado a temperaturas entre 35 y 50 °C por un tiempo aproximado de 48 horas con el fin de evaporar el agua y lograr una película homogénea (Pitak y Rakshit, 2011).

## **1.7 Aplicación de recubrimientos de quitosano sobre frutas**

Se ha trabajado en torno a recubrimientos comestibles para alimentos que además de protegerlos posean propiedades antimicrobianas con el fin de mejorar la seguridad y la vida útil del alimento (Dutta *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2009). Los empaques antimicrobianos son uno de los sistemas de empaque activo con buenos efectos contra la contaminación y alteraciones fisicoquímicas de los alimentos como pérdida de humedad, migración selectiva de gases, oxidación, entre otros (Dutta, *et al.*, 2009; Embuscado y Huber, 2009).

Por su versatilidad, el CH ha sido usado junto con diferentes compuestos bioactivos para lograr mejores resultados en las matrices alimentarias. Para este fin, se ha trabajado la combinación con proteínas de origen vegetal (Abugoch *et al.*, 2011) y animal (Atarés *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2009; Gómez-Estaca *et al.*, 2011), vitaminas (de Britto *et al.*, 2011; Martins *et al.*, 2012), *aloe vera* (Khoshgozaran-Abras *et al.*, 2012), hidrocoloides (Shih *et al.*, 2009; Váscquez *et al.*, 2009; Zhai *et al.*, 2004), ácidos grasos (Vargas *et al.*, 2006) y aceites esenciales (Atarés, *et al.*, 2010; Ojagh *et al.*, 2010; Sánchez-González *et*

*al.*, 2011; Sánchez-González *et al.*, 2010). En cada uno de estos estudios se evalúa la capacidad del CH como vehículo, así como el efecto sinérgico, aditivo o antagónico que pueda tener al ser usado en alimentos. Los resultados obtenidos conducen a un uso potencial del CH para mantener la calidad de frutas y hortalizas mínimamente procesadas por periodos más largos de tiempo debido a las propiedades fisicoquímicas y capacidad antimicrobiana que presenta este compuesto.

Muchos trabajos han sido realizados en torno a recubrimientos comestibles para alimentos que además de protegerlos posean propiedades antimicrobianas con el fin de mejorar la seguridad y la vida útil del alimento (Dutta, *et al.*, 2009; Sánchez-González, *et al.*, 2011). El empaque juega un papel importante en la conservación, distribución y mercadeo de los alimentos. (Falguera *et al.*, 2011). De acuerdo con varios autores, los empaques antimicrobianos son uno de los sistemas de empaque activo más prometedores y efectivos contra la contaminación y daños de los alimentos (Dutta, *et al.*, 2009; Embuscado y Huber, 2009). Con éste propósito, varios biopolímeros han sido estudiados como matriz polimérica (Sánchez-González, *et al.*, 2011).

Los productos vegetales mínimamente procesados, debido a sus características de proceso y conservación, requieren de sistemas que sean capaces de actuar como barreras contra vapor de agua, gases y procesos oxidativos durante el almacenamiento (Vargas *et al.*, 2008). Vu *et al* (2011) realizaron estudios quitosano y aceites esenciales de orégano, tomillo, limoneno y pimienta sobre fresa para extender su vida útil en almacenamiento refrigerado. Se encontró que el recubrimiento con quitosano y limoneno tuvo un buen efecto antimicrobiano extendiendo la vida útil de la fresa refrigerada. De igual manera se realizaron estudios con diferentes concentraciones de quitosano y aceite esencial de limón para evaluar la calidad en fresa refrigerada. Se encontró que los

recubrimientos afectaron de manera positiva reduciendo la tasa respiratoria e incrementando la actividad antifúngica (Perdones *et al.*, 2012). En trabajos realizados por Bautista *et al* (2003) realizó estudios para evaluar el efecto de quitosano y extractos de plantas sobre hongos patógenos de la papaya. Encontrando que no solo se reduce la aparición de antracnosis, sino que mejora las características de calidad de la fruta. Otro estudio realizado en uvas demostró que el uso de quitosano y aceite esencial de orégano es capaz de controlar el crecimiento de patógenos de la fruta durante el almacenamiento poscosecha (dos Santos *et al.*, 2012). También se evaluó el efecto de la combinación de aceites esenciales de bergamota, quitosano y carboximetilcelulosa para aumentar la vida de almacenamiento de uva, encontrando que la combinación del aceite y el quitosano disminuyeron la tasa respiratoria de la uva y aumentando la resistencia mecánica a los daños. Así mismo se encontró un aumento en la actividad antimicrobiana comparado con los demás tratamientos (L. Sánchez-González *et al.*, 2011).

En los anteriores efectos es posible observar como el quitosano es capaz de actuar en combinación con aceites esenciales de diferentes orígenes con el fin de mejorar diferentes atributos de calidad, así como aumentar la vida útil del producto. De igual forma es posible observar un aumento en la actividad antimicrobiana de los productos estudiados.

## 1.8 Conclusiones

El CH es un polímero que presenta una gran versatilidad en su uso y una comprobada actividad antimicrobiana. Se han propuesto diferentes mecanismos de acción a través de los cuales el CH puede inhibir o retardar el crecimiento de los microorganismos, dentro de los cuales los patógenos y alterantes alimentarios presentan gran interés por ser ellos los que están directamente relacionados con la inocuidad y con la estabilidad y vida útil

de alimentos frescos. Además, las propiedades funcionales del CH pueden ayudar a mantener diferentes parámetros de calidad de productos frescos como su textura, color y atributos sensoriales que, además de la calidad microbiológica, tienen un papel importante en la industria alimentaria, especialmente la comercialización de frutas mínimamente procesadas.

## 1.9 Referencias bibliográficas

- Abdou, E. S., Nagy, K. S. A., & Elsabee, M. Z. (2008). Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*, 99(5), 1359-1367. doi: 10.1016/j.biortech.2007.01.051
- Abugoch, L. E., Tapia, C., Villamán, M. C., Yazdani-Pedram, M., & Díaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 879-886. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.08.008
- Atarés, L., Bonilla, J., & Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 678-687. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.05.018
- Battisti, M. V., & Campana-Filho, S. P. (2008). Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. *Química Nova*, 31, 2014-2019.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108-118. doi: 10.1016/j.cropro.2005.03.010

- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22(9), 1087-1092. doi: 10.1016/s0261-2194(03)00117-0
- Benhabiles, M. S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M. F. A., & Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*, 29(1), 48-56. doi: 10.1016/j.foodhyd.2012.02.013
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (Eds.). (2010). *Applications of alternative food-preservation technologies to enhance food safety and stability*: BEntham Books.
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A. K., & Chatterjee, B. P. (2005). Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry*, 40(1), 395-400. doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.025
- Chien, P.-J., Sheu, F., & Yang, F.-H. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 225-229. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.09.022
- de Britto, D., de Moura, M. R., Aouada, F. A., Mattoso, L. H. C., & Assis, O. B. G. (2011). N,N,N-trimethyl chitosan nanoparticles as a vitamin carrier system. *Food Hydrocolloids*(0). doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.09.002
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703-714. doi: 10.1016/j.fm.2004.02.008
- Domard, A. (2011). A perspective on 30 years research on chitin and chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 84(2), 696-703. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.083

- Dong, H., Cheng, L., Tan, J., Zheng, K., & Jiang, Y. (2004). Effects of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *Journal of Food Engineering*, 64(3), 355-358. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2003.11.003
- dos Santos, N. S. T., Athayde Aguiar, A. J. A., de Oliveira, C. E. V., Veríssimo de Sales, C., de Melo e Silva, S., Sousa da Silva, R., . . . de Souza, E. L. (2012). Efficacy of the application of a coating composed of chitosan and *Origanum vulgare* L. essential oil to control *Rhizopus stolonifer* and *Aspergillus niger* in grapes (*Vitis labrusca* L.). *Food Microbiology*, 32(2), 345-353. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.07.014>
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.047
- Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). *Edible films and coatings for food applications*: Springer.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, *In Press, Corrected Proof*. doi: 10.1016/j.tifs.2011.02.004
- Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M., Hernandez-Muñoz, P., & Ocio, M. J. (2008). Characterization of antimicrobial properties on the growth of *S. aureus* of novel renewable blends of gliadins and chitosan of interest in food packaging and coating applications. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 13-20. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.019
- Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M., & Ocio, M. J. (2009). Optimization of the biocide properties of chitosan for its application in the design of active films of interest in

- the food area. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 913-921. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.06.001
- Ferreira-Soares, N. d. F., Silva, D. F. P., Camilloto, G. P., Oliveira, C. P., Pinheiro, N. M., & Medeiros, E. A. A. (2011). Antimicrobial edible coating in post-harvest conservation of guava. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 33, 281-289.
- Ferreira, C. O., Nunes, C. A., Delgadillo, I., & Lopes-da-Silva, J. A. (2009). Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 42(7), 807-813. doi: 10.1016/j.foodres.2009.03.005
- Gómez-Estaca, J., Gómez-Guillén, M. C., Fernández-Martín, F., & Montero, P. (2011). Effects of gelatin origin, bovine-hide and tuna-skin, on the properties of compound gelatin–chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 25(6), 1461-1469. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.01.007
- Goy, R. C., Britto, D. d., & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19, 241-247.
- Helander, I. M., Nurmiäho-Lassila, E. L., Ahvenainen, R., Rhoades, J., & Roller, S. (2001). Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 71(2-3), 235-244. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00609-2
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., Méndez-Montealvo, M. G., Sánchez-Rivera, M. M., & Bello-Pérez, L. A. (2008). Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. *Carbohydrate Polymers*, 73(4), 541-547. doi: 10.1016/j.carbpol.2007.12.020
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Valle, V. D., Velez, D., & Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry

- (Fragaria x ananassa) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110(2), 428-435. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.020
- Khoshgozaran-Abras, S., Azizi, M. H., Hamidy, Z., & Bagheripoor-Fallah, N. (2012). Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2058-2062. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.020>
- Kim, S.-K. (Ed.). (2011). *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*. Boca Raton (Florida): Taylor & Francis Group.
- Kim, S.-K., & Rajapakse, N. (2005). Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. *Carbohydrate Polymers*, 62(4), 357-368. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.08.012
- Kong, M., Chen, X. G., Xing, K., & Park, H. J. (2010). Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 51-63. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.012
- Kucukgulmez, A., Celik, M., Yanar, Y., Sen, D., Polat, H., & Kadak, A. E. (2011). Physicochemical characterization of chitosan extracted from *Metapenaeus stebbingi* shells. *Food Chemistry*, 126(3), 1144-1148. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.148
- Logesh, A. R., Thillaimaharani, K. A., Sharmila, K., Kalaiselvam, M., & Raffi, S. M. (2012). Production of chitosan from endolichenic fungi isolated from mangrove environment and its antagonistic activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2), 140-143. doi: 10.1016/s2221-1691(11)60208-6
- Majeti N.V, R. K. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and Functional Polymers*, 46(1), 1-27. doi: 10.1016/s1381-5148(00)00038-9

- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerra-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., . . . Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305-315. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.069
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Influence of  $\alpha$ -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 220-227. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.06.011
- Mellegård, H., From, C., Christensen, B. E., & Granum, P. E. (2011). Inhibition of *Bacillus cereus* spore outgrowth and multiplication by chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 218-225. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.06.013
- Mohammed, A. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 837-842. doi: 10.1016/j.lwt.2010.01.021
- Muzzarelli, R. A. A., Boudrant, J., Meyer, D., Manno, N., DeMarchis, M., & Paoletti, M. G. (2012). Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 995-1012. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.063
- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161-166. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.02.033

- Patricia Miranda, S., Garnica, O., Lara-Sagahon, V., & Cárdenas, G. (2004). WATER VAPOR PERMEABILITY AND MECHANICAL PROPERTIES OF CHITOSAN COMPOSITE FILMS. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49, 173-178.
- Pedro, A. S., Cabral-Albuquerque, E., Ferreira, D., & Sarmiento, B. (2009). Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 501-508. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.12.016
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan–lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70(0), 32-41. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.04.002>
- Pitak, N., & Rakshit, S. K. (2011). Physical and antimicrobial properties of banana flour/chitosan biodegradable and self sealing films used for preserving Fresh-cut vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2310-2315. doi: 10.1016/j.lwt.2011.05.024
- Qin, C., Li, H., Xiao, Q., Liu, Y., Zhu, J., & Du, Y. (2006). Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymers*, 63(3), 367-374. doi: 10.1016/j.carbpol.2005.09.023
- Rappussi, M. C. C., Pascholati, S. F., Benato, E. A., & Cia, P. (2009). Chitosan reduces infection by *Guignardia citricarpa* in postharvest 'Valencia' oranges. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 52, 513-521.
- Rico-Rodríguez, F., Gutiérrez-Cortés, C., & Díaz-Moreno, C. (2012). Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales en la calidad microbiológica de mango (*Mangifera indica* L.) mínimamente procesado. *Revista Vitae*, 19.

- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001
- Roller, S., & Covill, N. (1999). The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1-2), 67-77. doi: 10.1016/s0168-1605(99)00006-9
- Sagheer, F. A. A., Al-Sughayer, M. A., Muslim, S., & Elsabee, M. Z. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 410-419. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.01.032
- Sánchez-González, Cháfer, González-Martínez, Chiralt, & Desobry, S. (2011). Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. *Journal of Food Engineering, In Press, Corrected Proof*. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.02.016
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of food engineering*, 98, 10.
- Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 57-63. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.11.004>
- Sánchez, G. L., Gil, M. Y., Gil, M. A., Giraldo, F. J., Millán, L. J., & Villada, M. E. (2009). Aprovechamiento del suero lácteo de una empresa del norte antioqueño mediante microorganismos eficientes. [Original]. *Producción + Limpia*, 4(2), 9.
- Shalaby, W., & Burg, K. J. L. (2005). Absorbable biodegradable polymers J. L. Burg (Ed.) *Advances in polymeric biomaterials*

- Shih, C.-M., Shieh, Y.-T., & Twu, Y.-K. (2009). Preparation and characterization of cellulose/chitosan blend films. *Carbohydrate Polymers*, 78(1), 169-174. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.031>
- Signini, R., & Campana Filho, S. P. (2001). Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. *Polímeros*, 11, 58-64.
- Suntornsuk, W., Pochanavanich, P., & Suntornsuk, L. (2002). Fungal chitosan production on food processing by-products. *Process Biochemistry*, 37(7), 727-729. doi: 10.1016/s0032-9592(01)00265-5
- Teng, W. L., Khor, E., Tan, T. K., Lim, L. Y., & Tan, S. C. (2001). Concurrent production of chitin from shrimp shells and fungi. *Carbohydrate Research*, 332(3), 305-316. doi: 10.1016/s0008-6215(01)00084-2
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & González-Martínez, C. (2006). Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*, 41(2), 164-171. doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.03.016
- Vargas, M., Pastor, C., Chiralt, A., McClements, D. J., & Gonzalez-Martinez, C. (2008). Recent Advances in Edible Coatings for Fresh and Minimally Processed Fruits. [Article]. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 48(6), 496-511. doi: 10.1080/10408390701537344
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769. doi: 10.1016/j.foodres.2009.02.026
- Vu, K. D., Hollingsworth, R. G., Leroux, E., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing

- the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44(1), 198-203. doi: 10.1016/j.foodres.2010.10.037
- Wang, W., Du, Y., Qiu, Y., Wang, X., Hu, Y., Yang, J., . . . Kennedy, J. F. (2008). A new green technology for direct production of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 74(1), 127-132. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.01.025
- Xia, W., Liu, P., Zhang, J., & Chen, J. (2011). Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids*, 25(2), 170-179. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.03.003
- Yen, M.-T., Tseng, Y.-H., Li, R.-C., & Mau, J.-L. (2007). Antioxidant properties of fungal chitosan from shiitake stipes. *LWT - Food Science and Technology*, 40(2), 255-261. doi: 10.1016/j.lwt.2005.08.006
- Zhai, M., Zhao, L., Yoshii, F., & Kume, T. (2004). Study on antibacterial starch/chitosan blend film formed under the action of irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 57(1), 83-88. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.003>
- Ziani, K., Fernández-Pan, I., Royo, M., & Maté, J. I. (2009). Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids*, 23(8), 2309-2314. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.06.005



## **2. Características fisicoquímicas de películas comestibles de quitosano y aceites esenciales de cítricos para biopreservar mango mínimamente procesado**

RICO-RODRÍGUEZ, Fabián; DÍAZ-MORENO, Consuelo

### **2.1 Resumen**

El objetivo del presente estudio fue investigar el efecto de la inclusión de diferentes concentraciones de aceites esenciales (AES) de limón y naranja en películas comestibles de quitosano (CH) al 1% y 2% con el fin de ser usadas en la biopreservación del mango mínimamente procesado MMP. Se encontró que el espesor de las películas depende de la concentración de CH y no de los AES. De igual manera, los AES no tienen efecto ( $p < 0.05$ ) sobre propiedades como la permeabilidad al vapor de agua, color, elasticidad o resistencia al corte. Parámetros como color ámbar, superficie lisa y baja permeabilidad al vapor de agua son propiedades favorables al ser usadas para biopreservar MMP con el fin de prolongar la vida útil por periodos de tiempo mayores.

**Palabras claves:** Quitosano, película comestible, biopreservación, permeabilidad al vapor de agua.

### **2.2 Abstract**

The aim of this study was to investigate the effect of the inclusion of different concentrations of essential oils (AES) of lemon and orange in edible films of chitosan

(CH) at 1% and 2% to be used for biopreservation of minimally processed mango (MMP). Film thickness depends on CH rather than AES. In the same way, AES does not have effect ( $p < 0.05$ ) on properties like vapor water permeability, color, elasticity or shear. Parameters like amber color, smooth surface and low water vapor permeability are desirable properties to biopreserve and extend shelf life of MMP.

**Keywords:** Chitosan, edible film, biopreservation, water vapor permeability.

## 2.3 Introducción

Una película comestible es un material de envoltura (empaque) muy delgado empleado en la industria de alimentos que se puede ingerir (Embuscado y Huber, 2009) debido a que proviene de polímeros biodegradables que ayudan a incrementar la calidad y vida útil de los alimentos durante su conservación (Sánchez-González *et al.*, 2011). Dentro de los biopolímeros utilizados se encuentra el quitosano (CH), un compuesto polimérico obtenido a través de una hidrólisis alcalina a elevadas temperaturas de la quitina, un polímero de origen animal de estructura similar a la celulosa distribuido ampliamente en la naturaleza (Battisti y Campana-Filho, 2008; Battisti y Campana-Filho, 2008; Dutta *et al.*, 2009; Goy *et al.*, 2009; Pedro *et al.*, 2009). En la industria de frutas y hortalizas se ha encontrado que el CH es capaz de inhibir la acción de las peroxisadas en frutas como la fresa. Además, evita la degradación de las paredes celulares debidas a la acción de las poligalacturonasas en tomate estimulándolo a producir estas enzimas, de igual manera induce una respuesta más efectiva al ataque de patógenos al ser empleado en la superficie de las frutas (Bautista-Baños *et al.*, 2006). En los últimos años se ha trabajado en la aplicación del quitosano como película, para realizar empaques primarios y como recubrimiento (por inmersión), para protección directa de los alimentos (Abugoch *et al.*,

2011; Dutta, *et al.*, 2009; Mohammed, 2010) por su actividad como agente biopreservante natural (Chien *et al.*, 2007; Devlieghere *et al.*, 2004; Fernandez-Saiz *et al.*, 2008; Hernández-Muñoz *et al.*, 2008).

Se ha encontrado que mango troceado, (Chien, *et al.*, 2007), fresa (Hernández-Muñoz, *et al.*, 2008) y zanahoria (Vargas *et al.*, 2009), la adición de películas o recubrimientos con diferentes concentraciones de CH ayuda a retardar la pérdida de humedad y la disminución de la aceptación sensorial, incrementando características como contenido de sólidos solubles, acidez titulable y contenido de ácido ascórbico, ayudando a prolongar su vida útil.

Los aceites esenciales, compuestos aromáticos naturales presentes en plantas aromáticas (Bakkali *et al.*, 2008), son ampliamente conocidos por actuar como agentes antimicrobianos para el control del crecimiento de microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos (Bajpai *et al.*, 2011), dentro de este grupo de compuestos, los aceites esenciales de cítricos poseen gran potencial en la conservación de alimentos debido a su eficacia en el control *invitro* de diferentes microorganismos como *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* entre otros (Sánchez-González, *et al.*, 2011; Sánchez-González *et al.*, 2010).

En este trabajo se realizó la evaluación de las propiedades fisicoquímicas de películas comestibles de quitosano (CH) y aceites esenciales (AES) para ser usados en la biopreservación de MMP.

## 2.4 Materiales y métodos

### 2.4.1 Elaboración de película

Las soluciones de quitosano (Kittoflo®) y aceites esenciales (Aromasynt SAS) se prepararon según una modificación del procedimiento reportado por Sanchez-González (2011). Se disolvió CH (1 y 2% m/v) en ácido láctico al 1% v/v a 40 °C durante 2 h, se filtró y se adicionó glicerol (0,5 %v/v) y Tween80® (0,5 %v/v). En la solución anterior se emulsificaron los AES de limón o naranja en concentraciones finales de 0,5; 1,0 y 1,5 %v/v con agitación a 800 rpm durante 3 h, se desgasificó a 25°C controlando la temperatura para evitar evaporación de los AES, la solución se ajustó a pH de 3.5. Las películas se realizaron sirviendo 12 ml para los tratamientos con CH al 2% y 24 ml para los tratamientos con CH al 1% en cajas de petri plásticas de 90 mm de diámetro. Las soluciones se secaron a 40°C durante 48 horas. Luego se colocaron en un desecador para evitar la ganancia de humedad hasta el momento de los análisis.

### 2.4.2 Contenido de humedad y espesor

Se evaluó el contenido de humedad por gravimetría según método 935.29 (AOAC, 2002), calculando la pérdida de peso de las soluciones al cabo de 48 horas de secado. El espesor de las películas fue medido con un micrómetro análogo marca MITUTOYO® con sensibilidad de 0.01 mm, se realizaron nueve mediciones por muestra.

### 2.4.3 Análisis estructural

Para el análisis de la estructura microscópica de las películas se realizó una metalización en un sputter Balzers®, en condiciones de prevacío (<10<sup>-1</sup> torr), Posteriormente las muestras fueron observadas en un Microscopio Electrónico de Barrido FEI QUANTA 200® provisto de un cañón de electrones con su óptica, cámara de muestras, circuito de

vacío, electrónica de detección y registro de imagen, trabajando diferentes aumentos (1000x, 2000x y 5000x).

#### 2.4.4 Resistencia al corte y elasticidad

La resistencia al corte y la elasticidad de las películas se evaluaron por el método de extensibilidad (Atarés *et al.*, 2010), las pruebas fueron realizadas en un texturómetro TA-TX Plus®, estas propiedades se determinaron a partir de las curvas de estrés-tensión, estimadas a partir de la fuerza de deformación. Se tomaron muestras de 25 x 30 mm que fueron montadas en las empuñaduras y estiradas a una velocidad de 50 mm.min<sup>-1</sup> hasta romperse.

#### 2.4.5 Permeabilidad al vapor de agua.

Para la determinación de la permeabilidad al vapor de agua, la película fue colocada en la boca de tubos de ensayo llenos con sílica gel y colocados en un desecador con agua destilada en el fondo (100% RH; 2,34 kPa presión de vapor a 20 °C) los tubos fueron pesados a intervalos de 1 hora durante 10 horas a temperatura constante de 20°C. El estado estacionario y la actividad de agua se aseguraron manteniendo el aire interno en circulación con un ventilador miniatura dentro del desecador (Carneiro-da-Cunha *et al.*, 2009).

La permeabilidad al vapor de agua se calculó según la siguiente ecuación:

$$WVP = \frac{\Delta m}{t \times A \times P_o} \times L$$

Figura 2-1 Ecuación de permeabilidad al vapor de agua

Donde WVP es la permeabilidad del vapor de agua en  $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kPa}^{-1}$ ;  $\Delta m$  es la variación del peso de la sílica gel en g;  $t$  es la variación del tiempo en h;  $A$  es el área expuesta de las películas en  $\text{m}^2$  y  $P_0$  es la presión parcial de vapor de agua a  $20^\circ\text{C}$ .

### **2.4.6 Color**

Se obtuvieron los parámetros de color de las películas de CH (1 y 2%) y AES (0,5; 1,0 y 1,5%) usando un colorímetro MINOLTA CR300®, evaluando las diferencias en los parámetros de color en escala CIELAB junto con la cromaticidad y el ángulo de tono. Las mediciones se realizaron por triplicado.

### **2.4.7 Análisis estadístico**

Para el análisis estadístico de las muestras se realizó un ANAVA con un diseño parcelas divididas en el paquete estadístico *Statistics 8.0®*, donde los datos fueron completamente aleatorizados dentro de las parcelas, los tratamientos corresponden a la concentración de CH, el bloqueo se realiza sobre el tipo de AES y las parcelas sobre la concentración de aceites esenciales. Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para evaluar las diferencias entre medias de los tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas con una probabilidad  $p < 0.05$ .

## **2.5 Resultados y discusión**

### **2.5.1 Contenido de humedad y espesor de las películas**

En la *Tabla 2-1* se muestran los promedios de los porcentajes finales de humedad de las películas elaboradas con CH y AES, allí se observa que las películas con 2% de CH presentaron un porcentaje significativamente más alto ( $p > 0,05$ ) con respecto al peso inicial comparadas con las películas de CH al 1%. Esto se debe a la mayor concentración

de sólidos totales de la solución inicial. Por otro lado, al evaluar el efecto de los AES de limón y naranja, no se encontraron diferencias ( $p > 0,05$ ) entre ellos. Los AES no tienen ningún efecto sobre los contenidos finales de humedad para los tratamientos, indicando que la concentración de aceites esenciales no tiene relación con la pérdida de peso de las películas.

Tabla 2-1 Contenido final de humedad (%) de las películas de quitosano y Aceites esenciales.

Aceites Esenciales	QUITOSANO		
	1%	2%	
CONTROL	0%	$3,54 \pm 0,295^a$	$4,53 \pm 0,026^b$
LIMÓN	0,5%	$3,30 \pm 0,004^a$	$4,50 \pm 0,039^b$
	1%	$3,27 \pm 0,054^a$	$4,59 \pm 0,127^b$
	1,5%	$3,28 \pm 0,036^a$	$4,57 \pm 0,238^b$
NARANJA	0,5%	$3,26 \pm 0,009^a$	$4,42 \pm 0,486^b$
	1%	$3,25 \pm 0,216^a$	$4,69 \pm 0,269^b$
	1,5%	$3,29 \pm 0,006^a$	$4,50 \pm 0,654^b$

\* Letras diferentes corresponden a diferencias significativas entre tratamientos.

La *Tabla 2-2* muestra las diferencias en los espesores de las películas de CH y AES de limón y naranja a diferentes concentraciones, principalmente dadas entre concentraciones de CH y no siendo relevantes entre el tipo de AES. Sin embargo, se encontraron espesores mayores para concentración de quitosano de 1%, aspecto que influenciado en gran medida por las diferencias encontradas en el contenido final de humedad en las películas, pues fue mayor la pérdida de humedad en las películas con 1% de CH que en las películas con 2%.

Los espesores de las películas se encuentran dentro de los rangos reportados por Abugoch, *et al.* (2011), Vascónez, *et al.* (2009), Martins, *et al.* (2012) y Ojagh *et al.* (2010) quienes encontraron valores entre 0,054 mm y 0,142 mm para diferentes

concentraciones de CH y proteína de quinua, quitosano y tocoferoles y quitosano y aceite esencial de canela a 48 h a 25°C, 16 h a 35 °C 32 h a 25°C respectivamente; sin embargo, Martínez-Camacho, *et al.* (2010), Sangsuwan, *et al.* (2008) y Miranda *et al.* (2004) lograron obtener en sus experimentos películas con espesores que oscilaban entre 0,028 y 0,060 mm dependiendo de la concentración de quitosano, desde 0,2% hasta 2%, usando el mismo método de secado.

Tabla 2-2 Espesor (mm) de las películas de CH y AES

AES	QUITOSANO	
	1%	2%
CONTROL	0% 0,116 ± 0,0057 <sup>a</sup>	0,083 ± 0,0095 <sup>b</sup>
	0,5% 0,143 ± 0,0095 <sup>a</sup>	0,072 ± 0,028 <sup>b</sup>
LIMÓN	1% 0,126 ± 0,0058 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,0081 <sup>b</sup>
	1,5% 0,076 ± 0,0058 <sup>a</sup>	0,06 ± 0,02 <sup>b</sup>
NARANJA	0,5% 0,115 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,058 ± 0,0096 <sup>b</sup>
	1% 0,086 ± 0,0058 <sup>a</sup>	0,085 ± 0,0129 <sup>b</sup>
	1,5% 0,123 ± 0,0075 <sup>a</sup>	0,09 ± 0,0316 <sup>b</sup>

\* Letras diferentes corresponden a diferencias significativas entre tratamientos.

Los resultados indican que a mayor concentración de CH en las películas, menor será el espesor de las mismas para el rango de concentración evaluado. El tipo de AES empleado no afecta el espesor de las películas para ninguno de los tratamientos.

### 2.5.2 Análisis estructural

Al realizar un análisis macroscópico de las películas de CH y AES obtenidas, se observó que estas permanecen estables a condiciones ambientales, su superficie es de textura lisa, suave y brillante, carente de poros o fracturas, tampoco se presentó separación visible de fases o rompimiento de la emulsión, características que concuerdan con las

descritas por Assis y Valmir (2003), quienes además de las condiciones descritas, mencionan en sus películas presencia de impurezas macroscópicas, debidas a un filtrado ineficiente de la solución inicial. Además, se observó que las películas con 1% de CH eran más brillantes, cristalinas y flexibles que aquellas con 2% de CH que presentaron color amarillo opaco y menos flexibilidad, se fracturaban fácilmente al ser dobladas; sin embargo, no era posible diferenciar visualmente dentro de los tratamientos las películas elaboradas con AES de limón y AES de naranja.

A nivel microscópico se encontró que algunas películas tenían fracturas en su superficie (*Figuras 2-2 a, i y l*), similares a las reportadas por Cardenas, *et al.* (2010) en películas de quitosano acidificadas con ácido acético. Sin embargo, en el presente estudio las fracturas se presentaron al usar ácido láctico como agente acidificante. Estas fracturas se extendían a lo largo de toda la superficie de la película; no obstante, las demás películas (*Figuras 2-2 b, c, d, e, f, g, h, j, k, m y n*) mostraron una superficie homogénea, lisa característica de lactato según lo reportan Isis y Valmir (2003), característica también dada por la presencia de concentraciones de CH entre 0,5 y 3% (Shih *et al.*, 2009), con aparición de pequeñas porosidades de aproximadamente 1,15  $\mu\text{m}$  de diámetro debidas a la presencia de los agentes plastificantes y emulsificantes (glicerol y Tween80®), descripción que concuerda con la reportada para los rangos de concentraciones de CH trabajadas en otros trabajos (Cárdenas, *et al.*, 2010; Tuhin *et al.*, 2012; Zhai *et al.*, 2004). A nivel microscópico tampoco se evidenció rompimiento de la emulsión CH-AES. Las películas con mejor apariencia general fueron la control 2% y6 la CL110, pues presentaron una mejor homogeneidad en su estructura macro y microscópica.

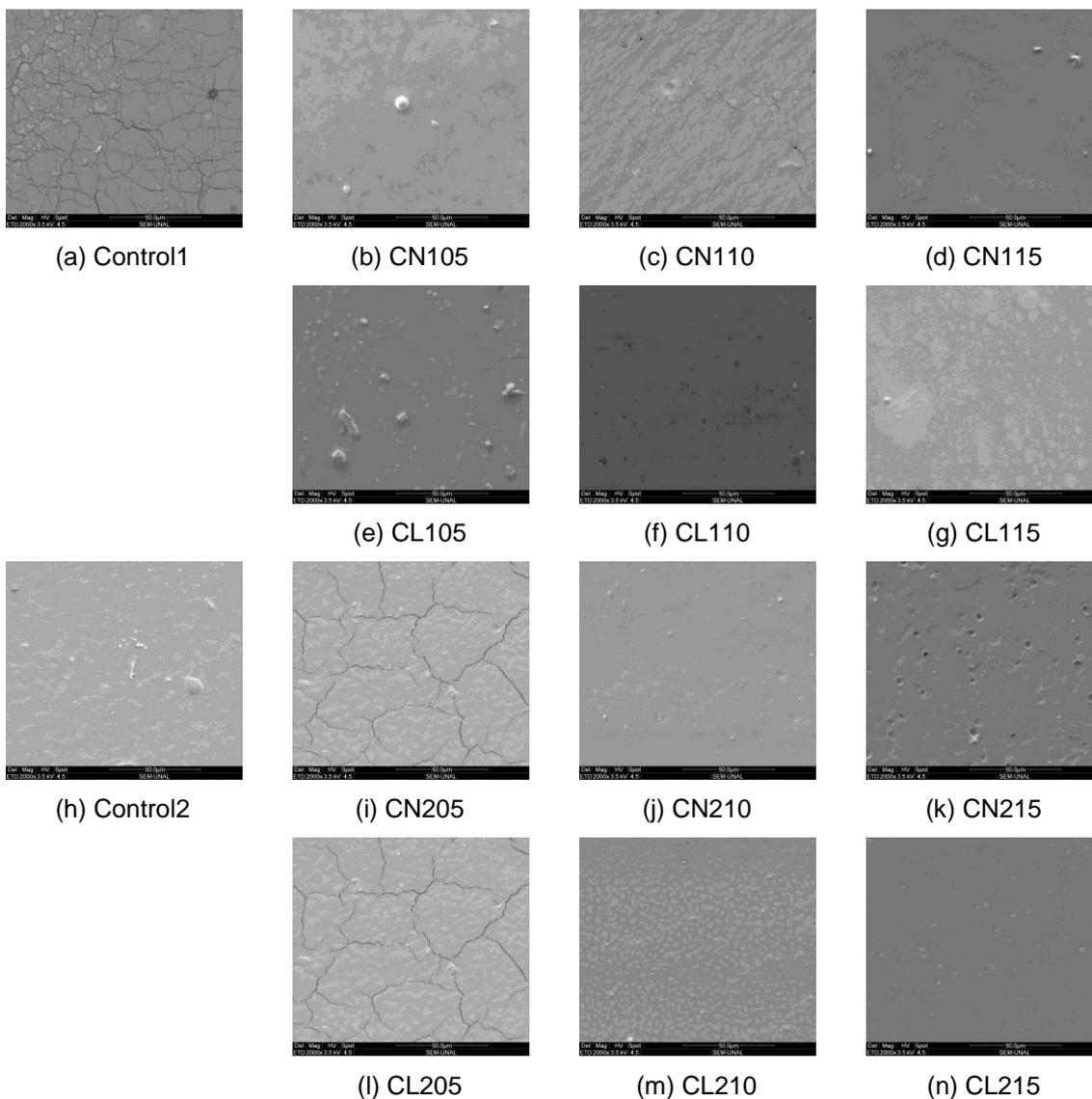


Figura 2-2 Micrografías de las películas de CH y AES de limón y naranja. CH= quitosano, CN= quitosano y naranja, CL= Quitosano y limón

\*el primer dígito de cada película corresponde a la concentración de quitosano (1% ó 2%), el segundo y tercero corresponden a concentración de AES (0,5, 1,0 ó 1,5%)

Las películas que muestran fracturas en su superficie no presentan valores altos de permeabilidad al vapor de agua, tampoco se ve afectada la resistencia al corte de las películas, sin embargo, estas películas muestran espesores más pequeños que las películas de superficie lisa dentro de los mismos tratamientos. Por lo que el resultado es debido a causas inherentes al proceso de elaboración de la película, especialmente

durante la operación de secado, y no a las concentraciones del CH y los AES o a la concentración o interacción entre estos. Según Abugoch *et al* (2011) la superficie lisa, continua y compacta es característica del CH, manteniéndose esta característica al ser usada con diferentes componentes que la acompañan y con quien puede interactuar.

La concentración de CH tiene una relación directa sobre la macro y microestructura de las películas, sin embargo, no se observó efecto alguno de los AES sobre las características estructurales; en general, no existen diferencias en la estructura de las películas, las fisuras encontradas en algunas de ellas son debidas a la operación de secado, por lo que es necesario regular las condiciones de operación del equipo como temperatura y velocidad de circulación del aire con mayor precisión.

### **2.5.3 Resistencia al corte y elasticidad**

Los resultados reportados para la resistencia al corte de las películas de CH y AES (*Tabla 2-3*) no arrojaron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) entre tratamientos, de igual manera se encontró que la concentración de AES no tiene efecto significativo sobre la fuerza realizada para romper la película, pues tuvieron un comportamiento similar al control.

Las películas de CH al 1% tuvieron valores de esfuerzo al corte más altos que aquellas películas elaboradas con CH al 2%, el contenido final de humedad tiene un efecto en el esfuerzo al corte de las películas, al aumentar en contenido de humedad de las películas disminuyó el esfuerzo necesario para cortarlas. No se presentaron diferencias significativas ( $p>0.05$ ) para la elasticidad en las películas. Las películas de CH del presente estudio tuvieron una resistencia al corte similar a realizadas reportadas por Atares *et al* (2010) quien reporta valores entre 66 y 98 MPa para películas de CH y

caseinato con 5% de humedad final. Por otro lado, Abugoch (2011), quien trabajó con recubrimientos de quitosano y proteína de quinua reporta valores de resistencia al corte del rango de 2.3 a 22 MPa, mucho menores que los reportados en este estudio.

Las películas de CH y AES, sin importar su concentración presentan una elasticidad alta comparada con otras realizadas con materiales y concentraciones similares, lo que puede conferir resistencia a daños mecánicos al ser usada en mango mínimamente procesado; los AES no tienen efecto alguno en la resistencia al corte o elasticidad de las películas por lo que pueden ser usados en las concentraciones trabajadas sin afectar las propiedades resistencia de corte o elasticidad de las películas.

Tabla 2-3 Esfuerzo al corte de las películas de  
quitosano y aceites esenciales (MPa)

	Aceites Esenciales	Quitosano	
		1%	2%
Control	0%	90.35 ± 6.01	75.54 ± 3.44
	0,5%	78.32 ± 4.54	95.53 ± 1.89
AESL	1%	81.09 ± 5.94	87.76 ± 4.82
	1,5%	99.98 ± 8.18	99.98 ± 5.84
AESN	0,5%	72.90 ± 2.45	82.20 ± 4.64
	1%	83.31 ± 4.00	79.98 ± 5.17
	1,5%	99.98 ± 6.67	77.76 ± 3.65
	1,5%	99.98 ± 5.43	77.76 ± 7.24
	1,5%	99.98 ± 5.43	77.76 ± 7.24

#### 2.5.4 Permeabilidad al vapor de agua.

En la *Tabla 2-4* se muestran los resultados obtenidos para la permeabilidad del vapor de agua en las películas de CH y AES, donde se puede observar que los valores de ésta para los dos tratamientos presentan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ); además, se encontraron valores más bajos de permeabilidad para la concentración de CH al 2%,

indicando que a mayor concentración de CH existe una menor permeabilidad de vapor de agua; así mismo, es posible afirmar que ni el tipo de AES, ni el porcentaje en que se encuentra éste en la película ejerce un efecto importante sobre la permeabilidad al vapor de agua.

Abugoch (2011) reportó valores de permeabilidad al vapor de agua que variaban entre 38 y 94  $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{kPa}^{-1}$  para películas de quitosano en concentraciones de 1% de CH y 1% de CH – 1% de proteína de quinua. Li, *et al.* (2010), Miranda *et al.* (2004) y Ojagh *et al.* (2010) reportan valores que oscilan entre 1.00 y 8.06  $\text{g}\cdot\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{kPa}^{-1}$ , similares a los obtenidos en el presente estudio, por lo que las películas poseen un patrón de comportamiento similar al reportado en la literatura para las concentraciones y tiempos trabajados.

Tabla 2-4 Permeabilidad al vapor de agua ( $\text{g mm h}^{-1} \text{m}^{-2} \text{kPa}^{-1}$ ) de las películas de quitosano y aceites esenciales

Aceites Esenciales	QUITOSANO	
	1%	2%
CONTROL	0%	$4,759 \pm 0,138^a$
	0,5%	$4,105 \pm 0,966^a$
LIMÓN	1%	$6,359 \pm 0,170^a$
	1,5%	$4,842 \pm 0,214^a$
	0,5%	$7,595 \pm 0,222^a$
NARANJA	1%	$6,950 \pm 0,272^a$
	1,5%	$4,597 \pm 0,126^a$

\* Letras diferentes corresponden a diferencias significativas entre tratamientos.

Los resultados obtenidos en el presente estudio para las características de permeabilidad de las películas no mostraron una relación aparente entre los AES de limón y naranja y la permeabilidad al vapor de agua, pues los valores obtenidos fueron similares a los del control, por lo que la permeabilidad al vapor de agua depende fundamentalmente de la

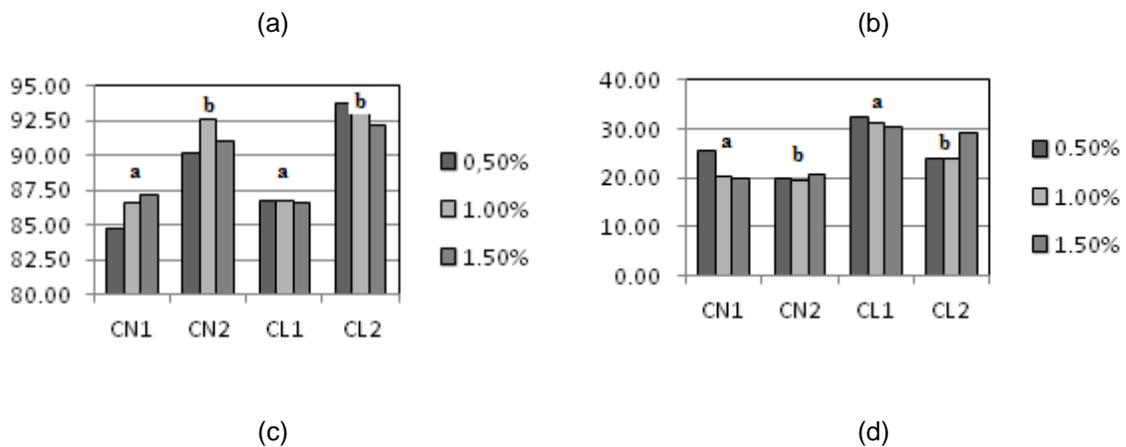
interacción entre las moléculas de quitosano que conforman la película. Estos resultados favorecen la reducción en la pérdida de humedad de productos de origen vegetal al ser usados en esta matriz.

### 2.5.5 Color

Al realizar el análisis de varianza para el parámetro de luminosidad de las películas de quitosano se encontraron diferencias ( $p < 0,05$ ) entre las dos concentraciones de quitosano, indicando que las muestras al 2% tendían a ser más claras con promedio general de 91.00 que las películas al 1% con promedio general de 86,53, los valores medios se encuentran reportados en la *Figura 2-3 a*, El parámetro  $b^*$  (Amarillo-azul) arrojó también diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) indicando que para el caso de las muestras con CH al 2% presentaron un color que tiene más hacia los tonos amarillos (31,05) que las muestras de CH al 1% (22,03). En cuanto a la intensidad de color o cromaticidad ( $C^*$ ) de las muestras se encontraron valores promedio de este índice de 31,78 para las muestras con 2% de CH, comparadas con 23,13 para las muestras con 1% de CH, indicando una mayor saturación de color en las muestras del primer tratamiento ( $p < 0,05$ ); la *Figura 2-3 c* muestra el comportamiento de éste índice. Del mismo modo, para el ángulo de tono (*Figura 2-3 d*) de los colores de las películas el análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los dos tratamientos analizados, presentando una mayor cantidad de luz en las muestras con 2% de CH.

Para el parámetro  $a^*$  (rojo-verde) no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) indicando que éste parámetro se mantuvo sin variación para los dos tratamientos evaluados.

Los valores reportados en el presente estudio son mucho más altos que los reportados por Khoshgozaran *et al* (2012) y Rotta *et al* (2009) quienes reportan valores de L\* que varían entre 3,72 y 50,0, b\* 0,52 y 20,01, C\* 3,85 y 20,15, aunque el parámetro a\* estuvo en el mismo rango para películas de CH y aloe vera y CH e Hidroximetilcelulosa, resultando en películas opacas y color blanco. Las propiedades de color son muy importantes cuando se relacionan con el grado de aceptación de los consumidores, por lo que al variar alguno de estos parámetros de color puede variar también la percepción que se tenga de un producto. Debido a que el color de las películas se mantuvo en los amarillos, esta favorece su uso en el mango mínimamente procesado, pues se busca que la película y/o recubrimiento de CH usado no interfiera de manera negativa sobre la percepción del producto, manteniendo así el atributo de color en el mango lo más atractivo posible para el consumidor. En general, la inclusión de los AES de limón y naranja en las películas de CH no afecta en su apariencia, sin embargo, se hace necesario evaluar como es su comportamiento con respecto al tiempo y a la interacción con el mango troceado.



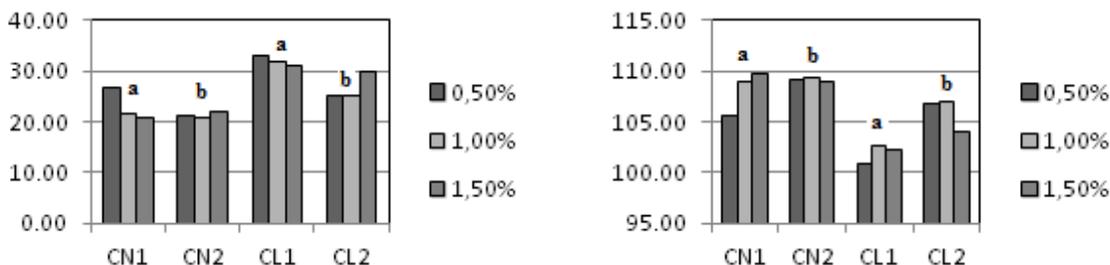


Figura 2-3 Variación de la luminosidad (a), parámetro b\* (b), Cromaticidad (c), Tono (d) en las películas de de CH y AES

\* Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos

CN1 = Quitosano al 1% y AES de naranja; CN2 = Quitosano al 2% y AES de naranja; CL1% = Quitosano al 1% y AES de limón, CL2 = Quitosano al 2% y AES de limón.

## 2.6 Conclusiones

El uso de AES de limón y naranja en concentraciones entre 0,5 y 1,5% en la elaboración de películas comestibles de CH al 1 y 2% no afectan las propiedades fisicoquímicas de las películas de CH, sin embargo, propiedades como la permeabilidad, la humedad final y el espesor de las películas se ven afectados por el contenido de CH presente en la mezcla. Existen diferencias importantes en los parámetros de color de las películas, dados principalmente entre concentraciones de quitosano en las películas. La concentración de CH usada en la película no afecta de manera significativa el comportamiento fisicoquímico de las mismas. A partir de los resultados obtenidos se puede afirmar que la concentración de quitosano que posee las mejores características para ser usada en MMP es la de 2%. Los resultados mencionados anteriormente sugieren la posibilidad de evaluar la forma en que el CH y los AES pueden llegar a influir en la aceptación sensorial, la capacidad microbicida y aspectos estructurales y nutricionales al ser utilizados en la conservación de MMP.

## 2.7 Referencias bibliográficas

- Abugoch, L. E., Tapia, C., Villamán, M. C., Yazdani-Pedram, M., & Díaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 879-886. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.08.008
- AOAC. (2002). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In A. INTERNATIONAL (Ed.), (17th ed.).
- Assis, O. B. G., & Valmir L. da, S. (2003). Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros*, 13, 223-228.
- Atarés, L., Bonilla, J., & Chiralt, A. (2010). Characterization of sodium caseinate-based edible films incorporated with cinnamon or ginger essential oils. *Journal of Food Engineering*, 100(4), 678-687. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.05.018
- Bajpai, V. K., Baek, K.-H., & Kang, S. C. (2011). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, In Press, Corrected Proof. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.052
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446-475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106
- Battisti, M. V., & Campana-Filho, S. P. (2008). Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. *Química Nova*, 31, 2014-2019.
- Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A. N., Velázquez-del Valle, M. G., Hernández-López, M., Ait Barka, E., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2006). Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection*, 25(2), 108-118. doi: 10.1016/j.cropro.2005.03.010

- Cárdenas, G., Anaya, P., Del río, R., Schrebler, R., Von Plessing, C., & Schneider, C. (2010). SCANNING ELECTRON MICROSCOPY AND ATOMIC FORCE MICROSCOPY OF CHITOSAN COMPOSITE FILMS. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 55, 352-354.
- Carneiro-da-Cunha, M. G., Cerqueira, M. A., Souza, B. W. S., Souza, M. P., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2009). Physical properties of edible coatings and films made with a polysaccharide from *Anacardium occidentale* L. *Journal of Food Engineering*, 95(3), 379-385. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2009.05.020
- Chien, P.-J., Sheu, F., & Yang, F.-H. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 225-229. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.09.022
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703-714. doi: 10.1016/j.fm.2004.02.008
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.047
- Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). *Edible films and coatings for food applications*: Springer.
- Fernandez-Saiz, P., Lagaron, J. M., Hernandez-Muñoz, P., & Ocio, M. J. (2008). Characterization of antimicrobial properties on the growth of *S. aureus* of novel renewable blends of gliadins and chitosan of interest in food packaging and coating applications. *International Journal of Food Microbiology*, 124(1), 13-20. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.019

- Goy, R. C., Britto, D. d., & Assis, O. B. G. (2009). A review of the antimicrobial activity of chitosan. *Polímeros*, 19, 241-247.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Valle, V. D., Velez, D., & Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110(2), 428-435. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.020
- Khoshgozaran-Abras, S., Azizi, M. H., Hamidy, Z., & Bagheripoor-Fallah, N. (2012). Mechanical, physicochemical and color properties of chitosan based-films as a function of Aloe vera gel incorporation. *Carbohydrate Polymers*, 87(3), 2058-2062. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.020>
- Li, J., Zivanovic, S., Davidson, P. M., & Kit, K. (2010). Characterization and comparison of chitosan/PVP and chitosan/PEO blend films. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 786-791. doi: 10.1016/j.carbpol.2009.09.028
- Martínez-Camacho, A. P., Cortez-Rocha, M. O., Ezquerra-Brauer, J. M., Graciano-Verdugo, A. Z., Rodríguez-Félix, F., Castillo-Ortega, M. M., . . . Plascencia-Jatomea, M. (2010). Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 305-315. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.069
- Martins, J. T., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2012). Influence of  $\alpha$ -tocopherol on physicochemical properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 27(1), 220-227. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.06.011
- Mohammed, A. (2010). Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 837-842. doi: 10.1016/j.lwt.2010.01.021

- Ojagh, S. M., Rezaei, M., Razavi, S. H., & Hosseini, S. M. H. (2010). Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry*, 122(1), 161-166. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.02.033
- Patricia Miranda, S., Garnica, O., Lara-Sagahon, V., & Cárdenas, G. (2004). WATER VAPOR PERMEABILITY AND MECHANICAL PROPERTIES OF CHITOSAN COMPOSITE FILMS. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 49, 173-178.
- Pedro, A. S., Cabral-Albuquerque, E., Ferreira, D., & Sarmiento, B. (2009). Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydrate Polymers*, 76(4), 501-508. doi: 10.1016/j.carbpol.2008.12.016
- Rotta, J., Ozório, R. Á., Kehrwald, A. M., de Oliveira Barra, G. M., de Melo Castanho Amboni, R. D., & Barreto, P. L. M. (2009). Parameters of color, transparency, water solubility, wettability and surface free energy of chitosan/hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) films plasticized with sorbitol. *Materials Science and Engineering: C*, 29(2), 619-623. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2008.10.032>
- Sánchez-González, Cháfer, González-Martínez, Chiralt, & Desobry, S. (2011). Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. *Journal of Food Engineering*, *In Press, Corrected Proof*. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.02.016
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of food engineering*, 98, 10.
- Sangsuwan, J., Rattanapanone, N., & Rachtanapun, P. (2008). Effect of chitosan/methyl cellulose films on microbial and quality characteristics of fresh-cut cantaloupe and

- pineapple. *Postharvest Biology and Technology*, 49(3), 403-410. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.02.014
- Shih, C.-M., Shieh, Y.-T., & Twu, Y.-K. (2009). Preparation and characterization of cellulose/chitosan blend films. *Carbohydrate Polymers*, 78(1), 169-174. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.04.031>
- Tuhin, M. O., Rahman, N., Haque, M. E., Khan, R. A., Dafader, N. C., Islam, R., . . . Tonny, W. (2012). Modification of mechanical and thermal property of chitosan–starch blend films. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(10), 1659-1668. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2012.04.015>
- Vargas, M., Chiralt, A., Albors, A., & González-Martínez, C. (2009). Effect of chitosan-based edible coatings applied by vacuum impregnation on quality preservation of fresh-cut carrot. *Postharvest Biology and Technology*, 51(2), 263-271. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.07.019
- Vásconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769. doi: 10.1016/j.foodres.2009.02.026
- Zhai, M., Zhao, L., Yoshii, F., & Kume, T. (2004). Study on antibacterial starch/chitosan blend film formed under the action of irradiation. *Carbohydrate Polymers*, 57(1), 83-88. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2004.04.003>



# 3. Influencia de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales de limón y naranja sobre la vida útil de mango mínimamente procesado

RICO-RODRÍGUEZ, Fabián; GUTIÉRREZ-CORTÉS, Carolina; DÍAZ-MORENO, Consuelo

## 3.1 Resumen

**Antecedentes:** las frutas mínimamente procesadas han tomado gran importancia en la dieta de los consumidores debido al cambio en sus hábitos de consumo y al contenido nutricional de los alimentos. **Objetivo:** el objetivo fue determinar los cambios fisicoquímicos, microbiológicos, estructurales y sensoriales en mango mínimamente procesado (MMP) con recubrimientos de quitosano (CH) y aceites esenciales (AES) de limón y naranja. **Métodos:** se realizó la inmersión de MMP, previamente tratado ácido cítrico y texturizante en soluciones de CH y AES de limón y naranja. Se evaluó la pérdida de peso, aceptación sensorial, variación de sólidos solubles, acidez titulable, ácido ascórbico, cambios en el color en coordenadas CIELAB, firmeza y elasticidad y cambios microbiológicos durante 11 días de almacenamiento refrigerado a 5 °C, de igual manera, se realizó la evaluación *in vivo* de los diferentes recubrimientos. **Resultados: se encontró que el** recubrimiento con CH y AES de limón tuvo una mejor aceptación sensorial comparado con los demás tratamientos evaluados, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la pérdida de peso, acidez titulable, contenido de

ácido ascórbico, pérdida de firmeza o elasticidad. Hay un alto contenido de fenoles totales debido a la composición de los AES, así como una alta capacidad antioxidante durante los primeros días de almacenamiento, característica que tiende a disminuir a los largo del estudio. Se encontró variación sobre el parámetro  $a^*$  de color, así como una notable disminución de la carga microbiana para el tratamiento con AES de limón comparad con los demás tratamientos. **Conclusiones:** El uso de recubrimientos de CH y AES de limón ayuda a mantener la vida útil del MMP durante 11 días de almacenamiento, no afectado características como la aceptación sensorial, a diferencia del recubrimiento de CH y AES de naranja que no tiene mayor incidencia en mango, pero si en su aceptación sensorial.

**Palabras claves:** recubrimiento comestible, *Mangifera infica L.*, crecimiento microbiano, color, textura.

### 3.2 Abstract

**Backgrounds:** minimally processed fruits have had great importance in Customers' diet due to a change in consumptions habits and nutritional value of food. **Objectives:** the objective was to determinate physicochemical, microbiological, structural and sensory changes in minimally processed mangoes (MMP) with edible coatings of chitosan (CH) and essential oils (AES) of lemon and orange. **Methods:** MMP in cubes previously dipped into citric acid and texturizing solution was dipped into CH and AES of lemon and orange coatings. Weight loss, sensory acceptance, total soluble solids, titrable acidity, ascorbic acid, color changes in CIELAB coordinates, firmness and elasticity and microbiological changes were evaluated along 11 days of refrigerated storage at 5 °C. **Results:** Coating of CH and AES of lemon had more acceptance than other treatments, no differences

were found ( $p > 0.005$ ) in weight loss, titrable acidity, ascorbic acid firmness or elasticity. There is a high amount of total phenols due to AES composition, as well as a high antioxidant capacity on the first days of storage, this characteristic decreases during the days of study. The parameter  $a^*$  of color showed a variation during the storage. There was a decrease of microbial charge for AES of lemon treatment compared with the other samples. **Conclusions:** coating of CH and AES of lemon helps to keep shelf life of MMP along 11 days of storage, without affecting characteristics like sensory acceptance, opposite to coatings of CH and AES of orange which does not have incidence on general acceptance of mango but sensory acceptance.

**Keywords:** edible coating, *Mangifera indica L.*, microbial growth, color, texture.

### 3.3 Introducción

El consumo de alimentos frescos troceados o mínimamente procesados es una tendencia que ha tenido gran aceptación dentro del comercio mundial de alimentos (Oms *et al.*, 2010). El mango (*Mangifera indica L.*) es un producto de gran importancia a nivel internacional debido a sus características sensoriales, succulencia, textura, dulzor y sabor exótico, que lo hacen altamente atractivo al consumidor. Se consume en diferentes estados de madurez y presentaciones comerciales como jugos, néctares y aderezos para carnes, entre otros (Machado y Schieber, 2010; Materano *et al.*, 2004).

Recientemente se ha prestado gran atención a técnicas de empaque para alimentos que además de protegerlos posean propiedades antimicrobianas (empaques activos) con el fin de mejorar la seguridad y la vida útil del alimento (Dutta *et al.*, 2009; Sánchez-González *et al.*, 2011). Con éste propósito, varios compuestos naturales han sido estudiados como matriz polimérica (Sánchez-González, *et al.*, 2011), dentro de ellos se

encuentra el quitosán o quitosano (CH). El CH es un polisacárido de origen animal de gran importancia en la elaboración de películas y recubrimientos comestibles debido a sus características estructurales (Muzzarelli *et al.*, 2012). Este compuesto muestra una importante aplicación enfocada a sistemas de empaque activo, posee características como la de ser biodegradable, biocompatible con tejidos humanos, no tóxico y especialmente presentar actividad antimicrobiana contra bacterias, mohos y levaduras (Embuscado y Huber, 2009; Falguera *et al.*, 2011; Nussinovitch, 2009).

Los aceites esenciales (AES) son compuestos aromáticos naturales formados como metabolitos secundarios de plantas aromáticas (Bakkali *et al.*, 2008). Se ha encontrado que los AES poseen capacidad antimicrobiana (Bajpai *et al.*, 2011). Particularmente los AES de cítricos poseen gran potencial en la conservación de alimentos debido a su actividad *in vitro* frente a microorganismos como *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella* sp (Sánchez-González, *et al.*, 2011; Sánchez-González *et al.*, 2010).

Se ha encontrado que en frutas como el mango troceado, (Chien *et al.*, 2007), fresa (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008) y zanahoria (Vargas *et al.*, 2009), la adición de recubrimientos con diferentes concentraciones de CH ayuda a retardar la pérdida de humedad y la disminución en la calidad sensorial, incrementando características como contenido de sólidos solubles, acidez titulable y contenido de ácido ascórbico, ayudando a prolongar su vida útil.

La demanda de alimentos que requieran un menor tiempo de preparación o que se encuentren ya listos para consumir ha crecido notablemente debido al estilo de vida de las personas en las últimas décadas. Junto con ésta demanda, ha crecido también el interés por consumir alimentos que conserven el contenido nutricional y las características sensoriales propias del alimento natural (Oms-Oliu *et al.*, 2010).

El objetivo del presente trabajo fue determinar los cambios fisicoquímicos, microbiológicos, estructurales y sensoriales en MMP con recubrimientos de quitosano y aceites esenciales de limón y naranja.

## **3.4 Materiales y métodos**

### **3.4.1 Materia prima**

La variedad de mango utilizada fue *Mangifera indica L. cv Tommy Atkins* debido a sus características de tamaño y peso (mayor a 300 g), poca fibrosidad, facilidad de manejo y comercialización. El mango se recolectó y seleccionó de acuerdo a sus características de uniformidad de tamaño, forma, color y ausencia de daños mecánicos y/o aquellos causados por infecciones fúngicas, seleccionado y clasificado según atributos de sanidad y calidad estipulados en la norma técnica colombiana NTC-1266 (1994).

### **3.4.2 Elaboración del mango mínimamente procesado**

El mango se lavó y desinfectó el mango entero. Luego se peló y cortó en cubos de 1 cm y se realizó una inmersión por 10 minutos en solución de ácido cítrico (1 % m/v) como agente antioxidante (previo al tratamiento) y cloruro de calcio al 0,5% m/v como sustancia texturizante por el mismo tiempo.

### **3.4.3 Recubrimientos**

Las soluciones de CH comercial (Kittoflo®) y aceites esenciales (Aromasynt SAS) se prepararon según una modificación del procedimiento reportado por Sánchez-Gonzales *et al* (2011). Se disolvió CH (1 y 2% m/v) en una solución de ácido láctico al 1% v/v a 40 °C durante 2 h, se filtró y posteriormente se adicionó glicerol (0,5 %v/v) y Tween80® (0,5 %v/v), se emulsificó el AES de limón o naranja en concentraciones de 0,5; 1,0 y 1,5% v/v

con agitación a 800 rpm durante 3 h y se desgasificó a 25°C controlando la temperatura para evitar evaporación de los AES, la solución se ajustó a un pH de 3.5.

#### **3.4.4 Evaluación sensorial**

Para seleccionar los recubrimientos que se utilizaron con los aceites esenciales se realizó una prueba de aceptación sensorial con escala hedónica de 5 puntos para las diferentes concentraciones de CH (1% y 2%) y AES de naranja (0.5%, 1.0% y 1.5%) y otra para las de AES de limón (0.5%, 1.0% y 1.5%), donde 5 es “me gusta mucho”, 3 es “ni me gusta ni me disgusta” y 1 corresponde a “me disgusta mucho”. La prueba se realizó a un grupo de 60 panelistas consumidores. La evaluación sensorial se realizó el día 0 de almacenamiento y los parámetros evaluados fueron olor y sabor, debido a que los demás parámetros de color y textura dependían de la interacción entre el recubrimiento y el mango durante el tiempo de almacenamiento., A partir de los resultados obtenidos se procedió a seleccionar los recubrimientos con mejor aceptación.

Para la selección del MMP con recubrimiento que tuviera la mejor aceptación sensorial se prepararon muestras con los AES de limón y naranja seleccionados inicialmente. Un control de quitosano y un control negativo (sin recubrimiento), se realizó una prueba de aceptación con escala hedónica de 5 puntos para las diferentes muestras, donde 5 es “me gusta mucho”, 3 es “ni me gusta ni me disgusta” y 1 “me disgusta mucho”. Se evaluaron los parámetros de color, olor y sabor. La prueba se realizó a un grupo de 60 panelistas consumidores. A partir de los resultados se procedió a determinar el MMP con recubrimiento que tuviera la mejor aceptación sensorial.

### 3.4.5 Pérdida de peso

Para la medición de pérdida de peso se almacenó MMP con los diferentes tratamientos y se pesaron durante 11 días, el valor de cada medición se comparó con el peso de la fruta inmediatamente cortada de acuerdo con el procedimiento de Chien *et al* (2007).

### 3.4.6 Sólidos solubles, acidez titulable y ácido ascórbico

Los sólidos solubles del MMP se midieron durante los 11 días de almacenamiento de acuerdo con el procedimiento 932.12 (AOAC, 2002) con un refractómetro ATC 113. La acidez titulable se midió según el método 942.15 (AOAC, 2002) tomando 10 g de muestra y diluyéndola con agua destilada, agregando 0,3 ml de solución de fenolftaleína y titulando con hidróxido de sodio 0,1 M. El contenido de ácido ascórbico fue medido según Ryley y Kajda (1994). Se tomó una muestra de aproximadamente 1 g de pulpa licuada de cada uno de los tratamientos de MMP y se disolvió con solución de ácido oxálico 0,15% m/m, se dejó en reposo y se filtró, posteriormente se tomó 1 ml de filtrado y se adicionaron 100 µl de solución de 2-nitroanilina 0,16 % m/m (en HCL y ácido acético 1:1), a la mezcla anterior se le adicionan 100 µl de nitrito de sodio 0,08% m/m y se agita hasta decolorar, se deja en reposo durante 5 minutos y se agregan 3.6 ml de etanol absoluto y 1 ml de NaOH 10 % m/m se deja en reposo 5 minutos y se lee la absorbancia 534 mn..

### 3.4.7 Color

Los parámetros de color de las muestras de MMP con recubrimientos se midieron con un colorímetro MINOLTA CR300®, evaluando las diferencias en los parámetros de color en escala CIELAB, adicional los parámetros de cromaticidad y ángulo de tono.

### 3.4.8 Firmeza y elasticidad

Se evaluó la fuerza requerida para penetrar (firmeza) y la elasticidad en los tejidos del MMP, las pruebas fueron realizadas en un texturómetro TA-TX Plus® con el aditamento P/2n, las condiciones de operación fueron: velocidad de entrada  $1.0 \text{ mm.s}^{-1}$ , velocidad de penetración  $2.0 \text{ mm.s}^{-1}$ , profundidad 6 mm velocidad de salida  $10 \text{ mms}^{-1}$ .

### 3.4.9 Fenoles totales y capacidad antioxidante

Para la preparación de los extractos realizó una modificación del procedimiento reportado por Ma *et al* (2011), se homogenizaron 10 g de MMP con recubrimiento y se extrajeron en 20 ml de etanol:acetona (7:3 v/v) por una hora a temperatura ambiente. El extracto fue filtrado y lavado con etanol:acetona. Éste procedimiento se repitió bajo las mismas condiciones y se aforó a 50 ml. Se almacenaron los extractos en congelación ( $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) hasta la medición de fenoles totales y capacidad antioxidante.

El contenido de fenoles totales se determinó por el método de Folin-Ciocalteau (Ma, *et al.*, 2011). La absorbancia fue medida a 765 nm. Los fenoles totales se expresaron como  $\text{mg.L}^{-1}$  de ácido gálico. La solución estándar de ácido gálico se preparó a concentraciones entre 0.1 y  $1000 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

Para medir la capacidad antioxidante por el método de FRAP se utilizó una modificación del método reportado por Ma *et al* (2011). La solución stock, preparada con 300 mM de buffer acetato a pH 3.6, 10 mM de TPTZ en 40 mM de HCL y 20 mM de  $\text{FeCl}_3$  en proporción 10:1:1. Se adicionaron 25  $\mu\text{l}$  de muestra o trolox a 1 ml de agua destilada y se permitió reaccionar con 1.8 ml de solución FRAP durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las lecturas se realizaron a 593 nm.

### 3.4.10 Análisis microbiológico

Para evaluar el comportamiento microbiológico de las muestras de MMP con recubrimientos durante los 11 días de almacenamiento se utilizaron los procedimientos del manual del INVIMA (1998). Se homogenizaron 11 g de muestra en 99 ml de agua peptonada ( $10^{-1}$ ) y se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Se cuantificó presencia de coliformes totales (CT) y fecales (CF) a 37 y 44 °C respectivamente por técnica de número más probable (NMP) en caldo BRILA (Merck), caldo triptófano (Oxoid) y agar EMB (Merck). El recuento de mesófilos y psicrófilos aerobios viables fue realizado en Agar Plate Count (Merck) a 37 °C y 4°C durante 48 horas y el de mohos y levaduras en Agar OGY (Oxoid) con Oxitetraciclina a 25 °C durante 7 días. Los valores se reportaron como Log UFC/g.

### 3.4.11 Análisis estadístico

Para el tratamiento estadístico de los resultados se utilizó el programa estadístico *Statistix 8.0®* las muestras se trabajaron en un diseño experimental completamente al azar con una debida aleatorización de las muestras. Se realizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey para evaluar las diferencias entre medias de los tratamientos. Las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad era menor del 5% ( $p < 0.05$ ). Para la evaluación sensorial de las muestras, los resultados se evaluaron por medio de un análisis de varianza de Kruskal-Wallis, evaluando las diferencias entre cada una de las muestras, las diferencias se consideraron significativas cuando la probabilidad era menor del 5% ( $p < 0.05$ ).

## 3.5 Resultados y discusión

### 3.5.1 Evaluación sensorial

Para la selección de los recubrimientos con mejor aceptación sensorial dentro de cada AES se encontró que el parámetro de olor era significativamente diferente entre los diferentes tratamientos evaluados para las muestras de naranja ( $p < 0,05$ ). La muestra que presentó mayor aceptación fue la QN110 (1% de quitosano - 1% de AES de naranja). Las demás muestras fueron rechazadas por percepciones relacionadas con pescado o fruta podrida. En cuanto a las muestras de AES de limón se encontró que existían diferencias entre tratamientos ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, los tratamientos con 1% de CH (QL105, QL110 y QL115) mostraron mejores puntajes que los tratamientos con 2% de CH (QL205, QL210 y QL215), formando dos grandes grupos. De acuerdo a las observaciones de los panelistas las concentraciones más altas de ambos tipos de AES (limón y naranja) dejaban notas amargas residuales en la boca.

En cuanto al atributo de sabor se encontró que existían diferencias significativas entre los diferentes tratamientos con AES de naranja ( $p < 0,05$ ). Las muestras de mango tratados con CH al 1% y AES 1% (QN110) y 0.5% (QN105) mostraron los mejores resultados. Para el caso de las muestras con quitosano al 2% (QN205, QN210 y QN215) las muestras fueron rechazadas debido a su predominante sabor a pescado detectado por los panelistas, en el caso de la muestra con 1.5% de AES (QN115) la principal razón de rechazo fue un predominante sabor a fruta podrida. Para las muestras con AES de limón presentaban diferencias estadísticamente significativas, se encontró que las muestras con CH al 1% y AES al 1 y 1.5% (QL110 y QL115 respectivamente) tenían mejores puntajes. Para realizar los estudios de vida útil se seleccionaron los tratamientos con CH

al 1% y 1% de AES (QN110 y QL110) debido a que estos tratamientos tuvieron buena aceptación para olor y sabor y no presentaron olores o sabores residuales.

El grado de aceptación sensorial de los cuatro recubrimientos seleccionados (Q0, CQ, QN11 y QL11) aplicados en MMP no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ). Las mezclas de recubrimientos a pesar de poseer colores diferentes en solución, no eran diferentes entre ellas al encontrarse como recubrimiento sobre el mango mínimamente procesado. Para el atributo de olor, se encontró que los tratamientos eran diferentes entre ellos ( $p<0.05$ ). La muestra con AES de limón (QL11) obtuvo los mejores puntajes, indicando que fue la que mejor aceptación tuvo. De otro lado, la muestra con control de CH (CQ) fue la muestra con menor aceptación. En cuanto al atributo de sabor, se encontró que las muestras QL11 y Q0 eran significativamente diferentes ( $p<0.05$ ) de las muestras CQ y QN11, estos resultados indican que la muestra de MMP con AES de limón presenta mejor aceptación que la muestra con AES de naranja, siendo tan aceptada como el MMP sin recubrimiento (Q0).

### 3.5.2 Pérdida de peso

La *Figura 3-1* muestra la variación del peso en los trozos de MMP con los diferentes tratamientos. Se puede observar una alta la pérdida de humedad de las muestras en los primeros 3 días de almacenamiento, sin embargo, para los demás días de almacenamiento hasta el día 11 no hay una pérdida significativa comparada con los primeros días. Esta variación se debe a que después de aplicados los recubrimientos sobre el MMP y realizado el escurrido, aún existió exceso de fluidos, además, al proceso normal de maduración de la fruta, que debido a procesos enzimáticos libera agua (Muda *et al.*, 1995); el análisis estadístico, no mostró diferencias entre tratamientos ( $p>0.05$ ), por lo que los recubrimientos no tuvieron ningún efecto sobre la pérdida de humedad de las

muestras de MMP, estos resultados contradicen lo encontrado por Chien *et al* (2007), quien encontró que los recubrimientos de CH actúan como barrera, evitando la pérdida de agua de mango en rodajas.

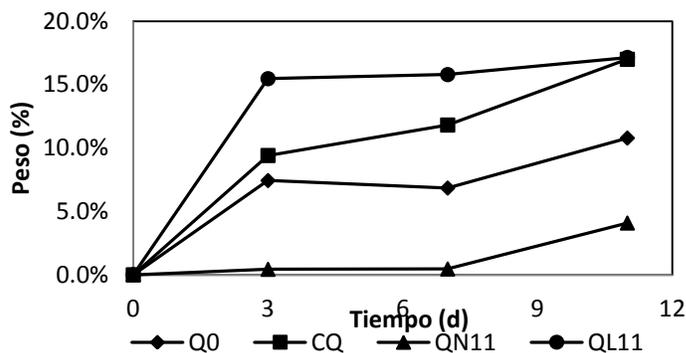


Figura 3-1 Pérdida de humedad del mango (%) con diferentes recubrimientos. Q0 = control negativo, CQ = Control positivo, QN11 = Quitosano y AES de naranja, QL11 = Quitosano y AES de limón.

### 3.5.3 Sólidos solubles, acidez titulable y ácido ascórbico

Los valores en la *Tabla 3-1* muestran la variación del porcentaje de sólidos solubles para el MMP con los diferentes tratamientos. El análisis estadístico mostró que existe variación estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) en el contenido de sólidos solubles entre los tratamientos a lo largo de los 11 días de almacenamiento. Se puede observar que la muestra QC mantuvo los sólidos solubles en 8,4 °brix, mientras que los tratamientos que incluían AES (QL11 y QN11) tuvieron un ligero aumento en la concentración de sólidos solubles. Por otro lado, el tratamiento control (Q0) mostró una disminución en el contenido de sólidos solubles durante el almacenamiento. De acuerdo con varios autores (Hoa y Ducamp, 2008; Sothornvit y Rodsamran, 2008; Tovar *et al.*, 2001), los sólidos solubles tienden a aumentar durante la maduración de las frutas.

Tabla 3-1 Sólidos solubles en el mango mínimamente procesado

Muestra	Día 0	Día 4	Día 8	Día 12
Q0	7.87 ± 0.42 <sup>a</sup>	7.73 ± 0.64 <sup>a</sup>	7.67 ± 0.58 <sup>a</sup>	7.67 ± 0.61 <sup>a</sup>
CQ	8.33 ± 0.64 <sup>b</sup>	8.47 ± 0.58 <sup>b</sup>	8.40 ± 0.72 <sup>b</sup>	8.40 ± 0.80 <sup>b</sup>
QN11	7.67 ± 0.31 <sup>a</sup>	7.80 ± 0.20 <sup>a</sup>	7.87 ± 0.46 <sup>a</sup>	8.07 ± 0.31 <sup>a</sup>
QL11	7.67 ± 0.31 <sup>a</sup>	7.73 ± 0.23 <sup>a</sup>	7.73 ± 0.23 <sup>a</sup>	7.93 ± 0.12 <sup>a</sup>

Valores con letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas

La *Figura 3-2 a* muestra la variación en la acidez de las muestras de MMP, se encontró que las muestras fueron estadísticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) entre sí, siendo la muestra QL11 la que tuvo un mayor descenso en el porcentaje de acidez total. A pesar de la disminución en la acidez titulable de las muestras, el contenido de ácido ascórbico (*Figura 3-2 b*) tuvo una disminución menor, No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para el contenido de ácido ascórbico entre los tratamientos. Sin embargo, la muestra control positivo (CQ) fue la que presentó una disminución mayor en el contenido de ácido ascórbico, contradiciendo lo encontrado por Chien *et al* (2007) quien dijo que el contenido de ácido ascórbico en los recubrimientos de CH no variaban considerablemente.

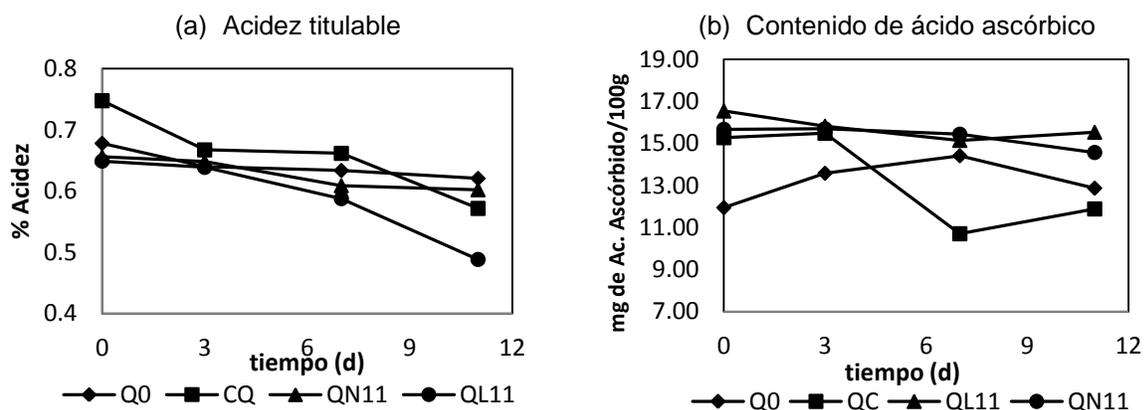


Figura 3-2 Contenido acidez titulable (a) y ácido ascórbico (b) del mango mínimamente procesado con recubrimientos de CH y AES de limón y naranja.

### 3.5.4 Color

La *Tabla 3-2* muestra los valores obtenidos para los parámetros de color del MMP con recubrimientos a lo largo de los 11 días de almacenamiento. El análisis estadístico de la variación de color mostró que para los parámetros  $L^*$ ,  $b^*$  y  $h^*$  no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los tratamientos en el tiempo de almacenamiento del MMP. Sin embargo, se encontró que en la variación la cromaticidad ( $C^*$ ) existieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), se encontró que la muestra C0 presentó menor variación en la saturación del color a diferencia de las demás muestras que q tuvieron un mayor variación durante el almacenamiento. Para el parámetro  $a^*$  (verdes-rojos) existieron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) para la muestra de quitosano (CQ) que presentó mayor variación en el cambio de color. Estos dos parámetros se relacionan directamente con la tasa respiratoria del MMP y con un mayor pardeamiento y por tanto menor efecto en la inhibición de las polifenoloxidasas (PPO). En estudios realizados por Chien *at al* (2007) se reporta una variación significativa en el parámetro  $a^*$ , coincidiendo con los resultados obtenidos en este estudio.

Tabla 3-2 Parámetros de color en las muestras de mango.

Muestra		Día 0	Día 4	Día 8	Día 12
Control C0	a	-6,013 ± 0,57 <sup>a</sup>	-5,827 ± 0,35 <sup>a</sup>	-4,845 ± 1,34 <sup>a</sup>	-3,610 ± 1,16 <sup>a</sup>
	b	56,690 ± 2,56 <sup>a</sup>	54,607 ± 0,55 <sup>a</sup>	54,530 ± 6,29 <sup>a</sup>	63,000 ± 2,71 <sup>a</sup>
	C*	6,013 ± 0,57 <sup>a</sup>	5,827 ± 0,35 <sup>a</sup>	4,845 ± 1,35 <sup>a</sup>	3,610 ± 1,16 <sup>a</sup>
	h*	-1,465 ± 0,01 <sup>a</sup>	-1,465 ± 0,01 <sup>a</sup>	-1,481 ± 0,03 <sup>a</sup>	-1,510 ± 0,02 <sup>a</sup>
	L*	77,303 ± 2,53 <sup>a</sup>	76,590 ± 0,93 <sup>a</sup>	75,78 ± 2,26 <sup>a</sup>	80,05 ± 0,83 <sup>a</sup>
Quitosano CQ	a	-4,500 ± 1,16 <sup>a,b</sup>	-3,597 ± 0,34 <sup>a,b</sup>	-4,728 ± 1,59 <sup>a,b</sup>	-6,203 ± 0,48 <sup>a,b</sup>
	b	58,563 ± 3,75 <sup>a</sup>	59,560 ± 5,55 <sup>a</sup>	52,217 ± 2,58 <sup>a</sup>	52,047 ± 3,74 <sup>a</sup>
	C*	4,500 ± 1,16 <sup>a</sup>	3,597 ± 0,34 <sup>a</sup>	4,728 ± 1,59 <sup>a</sup>	6,203 ± 0,48 <sup>a</sup>
	h*	-1,493 ± 0,02 <sup>a</sup>	-1,504 ± 0,01 <sup>a</sup>	-1,495 ± 0,04 <sup>a</sup>	-1,446 ± 0,02 <sup>a</sup>
	L*	75,47 ± 3,02 <sup>a</sup>	75,76 ± 0,70 <sup>a</sup>	75,35 ± 6,59 <sup>a</sup>	79,14 ± 2,35 <sup>a</sup>
Aceite Esencial de Naranja QN11	a	-3,573 ± 1,29 <sup>b</sup>	-5,053 ± 0,76 <sup>b</sup>	-6,423 ± 0,33 <sup>b</sup>	-6,308 ± 1,22 <sup>b</sup>
	b	59,577 ± 1,55 <sup>a</sup>	58,293 ± 1,26 <sup>a</sup>	55,417 ± 2,04 <sup>a</sup>	56,737 ± 4,80 <sup>a</sup>
	C*	3,573 ± 1,29 <sup>b</sup>	5,053 ± 0,76 <sup>b</sup>	6,423 ± 0,33 <sup>b</sup>	6,308 ± 1,22 <sup>b</sup>
	h*	-1,511 ± 0,02 <sup>a</sup>	-1,484 ± 0,02 <sup>a</sup>	-1,546 ± 0,01 <sup>a</sup>	-1,452 ± 0,03 <sup>a</sup>
	L*	73,75 ± 4,41 <sup>a</sup>	77,77 ± 0,85 <sup>a</sup>	79,85 ± 1,54 <sup>a</sup>	77,33 ± 3,63 <sup>a</sup>
Aceite Esencial de Limón QL11	a	-6,180 ± 1,04 <sup>b</sup>	-6,690 ± 0,17 <sup>b</sup>	-6,345 ± 0,29 <sup>b</sup>	-5,438 ± 0,96 <sup>b</sup>
	b	55,490 ± 2,81 <sup>a</sup>	54,027 ± 1,74 <sup>a</sup>	53,867 ± 2,97 <sup>a</sup>	58,513 ± 0,88 <sup>a</sup>
	C*	6,180 ± 1,04 <sup>b</sup>	6,690 ± 0,17 <sup>b</sup>	6,345 ± 0,29 <sup>b</sup>	5,438 ± 0,96 <sup>b</sup>
	h*	-1,459 ± 0,02 <sup>a</sup>	-1,448 ± 0,01 <sup>a</sup>	-1,454 ± 0,01 <sup>a</sup>	-1,477 ± 0,02 <sup>a</sup>
	L*	78,68 ± 1,31 <sup>a</sup>	77,17 ± 1,75 <sup>a</sup>	79,46 ± 0,99 <sup>a</sup>	76,08 ± 4,67 <sup>a</sup>

Valores con letras diferentes corresponder a diferencias significativas entre tratamientos (p<0.05).

### 3.5.5 Textura

Para la variación de la firmeza (*Figura 3-3 a*) en las muestras de MMP no muestra variaciones estadísticas (p>0.05), por lo que no existe diferencia en la pérdida de firmeza de las muestras con el tiempo, aunque si es posible observar que la muestra control (Q0) tuvo un ligero aumento al final de los 11 días. La muestra con AES de naranja mostró una disminución de su firmeza al final del tiempo de almacenamiento. La muestra con AES de limón mostró una reducción constante durante el almacenamiento desde 3,23 N hasta 2,06 N indicando que la combinación de AES de limón y CH no fue efectiva como recubrimiento. Esto concuerda con la discusión de Beaulieu y Lea (2003) quienes afirman que después de 7 días de almacenamiento el principal problema de deterioro en el MMP es la pérdida de firmeza. Lo anterior también es posible afirmarlo debido a la disminución de la elasticidad (*Figura 3-3 b*) que experimenta el MMP durante los 11 días de

almacenamiento, debido al rompimiento de tejidos, proceso propio de la maduración del mango.

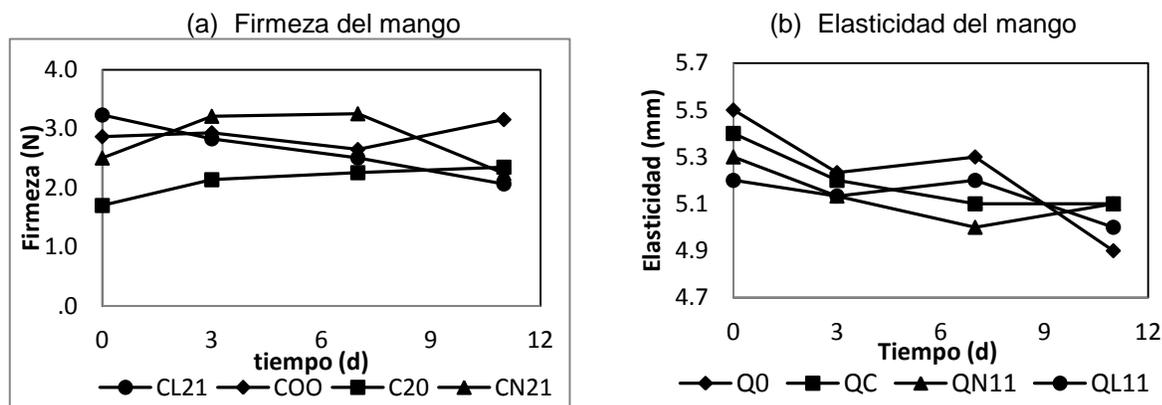


Figura 3-3 Firmeza (a) y la elasticidad (b) en el mango mínimamente procesado con recubrimientos de CH y AES de limón y naranja.

### 3.5.6 Capacidad antioxidante

El contenido de fenoles totales (*Figura 3-4 a*) de las muestras de mango tubo una disminución marcada durante los primeros 3 días de almacenamiento, a partir de este momento se mantuvo casi constante hasta el día 11 de almacenamiento. No se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los diferentes tratamientos. Melo *et al* (2008) , Ma *et al* (2011) y Robles *et al* (2009) en sus estudios realizados a diferentes variedades de mango reportan valores que se encuentran por debajo (0, 100 mg AG/ml y 0,193 mg AG/ml) del valor reportado para mango sin ningún recubrimiento (0,197 mg AG/ml), esto es debido a que los AES están constituidos principalmente por compuestos fenólicos como el limoneno en concentraciones superiores al 30% (Di-Vaio *et al.*, 2010), por lo que el mango con recubrimiento y AES aumenta considerablemente su contenido de compuestos fenólicos. Se observa que al cabo de 11 días, el contenido de fenoles disminuye debido a la presencia de oxígeno durante el almacenamiento, también debido

a la misma naturaleza de los compuestos fenólicos, particularmente los flavonoides tienen una fracción soluble en agua (Martinez *et al.*; 2002, Melo *et al.*, 2008).

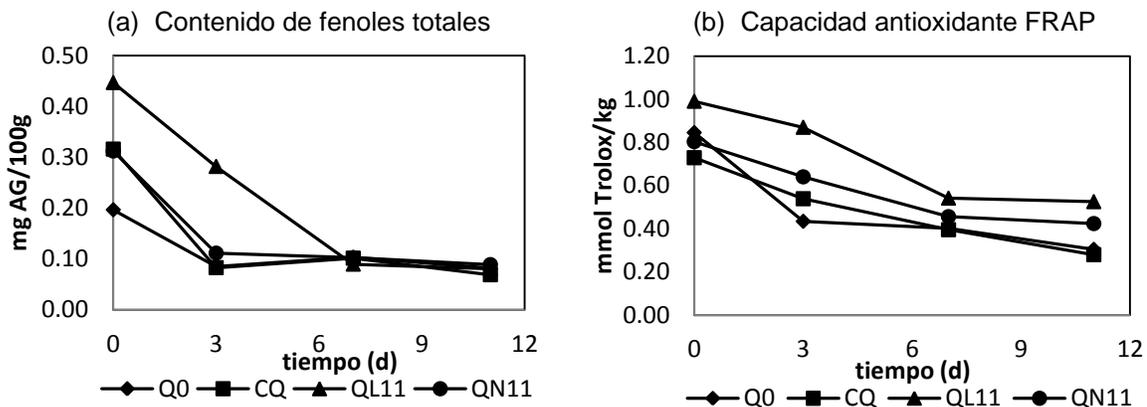


Figura 3-4 Contenido de fenoles totales y capacidad antioxidante del mango mínimamente procesado con recubrimientos de CH y AES de limón y naranja

En cuanto a la actividad antioxidante por el método de FRAP (*Figura 3-4 b*) se encontró que todas las muestras disminuyeron su contenido a lo largo del tiempo de almacenamiento. Para la muestra QL11 que mostró mayor capacidad antioxidante, esta disminuyó a lo largo de los 11 días de almacenamiento desde 0,991 mmol Trolox/kg hasta 0,525 mmol de Trolox/kg de muestra, siendo la disminución más marcada. Sin embargo, no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre tratamientos. Los valores reportados, son mucho menores que aquellos encontrados por Ma *et al.* (2011) quien reporta valores superiores a 1.0 mmol/kg de muestra, sin embargo son valores similares a los reportados por Liu *et al.* (2013) y a los de Palafox *et al.* (2012).

Se puede observar que la actividad antioxidante del mango no varía por efecto del CH o los AES con respecto del patrón (Q0) o de aquella reportada en la bibliografía (Robles *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2011, Palafox *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2013), sin embargo, debido a la composición de los AES de limón y naranja, el contenido de fenoles totales si se ve afectado de manera considerable.

### 3.5.7 Análisis microbiológico

Al realizar la evaluación de la actividad antimicrobiana de los recubrimientos CH y AES de limón y naranja aplicados en mango mínimamente procesado se encontró que en todos los casos hubo disminución del contenido de coliformes totales (*Tabla 3-4*). Después de 11 días de almacenamiento solo se encontraron coliformes totales en la muestra control, las muestras con CH y AES presentaron inhibición a partir del día 7. En ningún momento se evidenció crecimiento de coliformes fecales.

Se observó un efecto bacteriostático contra bacterias mesófilas, pues, aunque los recuentos aumentaron en el tiempo, este incremento no fue representativo. Chien *et al* (2007) reportó un incremento de 1.59 unidades logarítmicas en los recuentos de aerobios mesófilos para recubrimientos de CH al 1%, en el presente estudio se reportó un incremento de 1.48 unidades logarítmicas para el tratamiento CQ y 0.68 unidades para la muestra QL11. La interacción CH-AES de limón mostró un efecto aditivo. No fue observado crecimiento de psicrófilos aerobios a lo largo del periodo de estudio.

Tabla 3-3 Efecto de quitosano y aceites esenciales sobre los cambios microbiológicos del mango mínimamente procesado (log UFC/ml)

	Tiempo	Día 0	Día 3	Día 7	Día 11
<b>C0</b>	<i>C. totales</i>	1.18 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.60 <sup>a</sup>	0.60 <sup>a</sup>
	<i>Mesófilos</i>	2.34 <sup>a</sup>	2.95 <sup>a</sup>	3.81 <sup>a</sup>	4.04 <sup>a</sup>
	<i>Mohos y levaduras</i>	1.36 <sup>a</sup>	3.19 <sup>a</sup>	4.41 <sup>a</sup>	4.57 <sup>a</sup>
<b>CQ</b>	<i>C. totales</i>	1.18 <sup>a</sup>	0.48 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
	<i>Mesófilos</i>	2.36 <sup>a</sup>	2.93 <sup>a</sup>	3.48 <sup>a</sup>	3.85 <sup>a</sup>
	<i>Mohos y levaduras</i>	0.00 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	3.87 <sup>a</sup>	4.00 <sup>a</sup>
<b>QN11</b>	<i>C. totales</i>	0.95 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
	<i>Mesófilos</i>	2.40 <sup>a</sup>	2.74 <sup>a</sup>	3.40 <sup>a</sup>	3.57 <sup>a</sup>
	<i>Mohos y levaduras</i>	0.00 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	3.18 <sup>a</sup>	3.31 <sup>a</sup>
<b>QL11</b>	<i>C. totales</i>	1.08 <sup>a</sup>	0.85 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
	<i>Mesófilos</i>	2.36 <sup>a</sup>	2.70 <sup>a</sup>	2.99 <sup>a</sup>	3.04 <sup>a</sup>
	<i>Mohos y levaduras</i>	0.54 <sup>a</sup>	1.54 <sup>a</sup>	2.78 <sup>a</sup>	3.02 <sup>a</sup>

Se observó incremento en los recuentos de mohos y levaduras. Sin embargo, al comparar los tratamientos con el control se observa los recuentos finales en el día 11 son inferiores al control, en especial el tratamiento QL11 con una diferencia de 1.5 unidades logarítmicas. En estudios previos se encontró que el quitosano presenta efecto inhibitorio contra diferentes tipos de mohos típico de productos hortofrutícolas (Ziani *et al.*, 2009).

Los recuentos microbianos sobre mango mínimamente procesado durante los 11 días de almacenamiento mostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) para coliformes, mesófilos, mohos y levaduras. En ningún momento se presentó crecimiento de psicrófilos aerobios, tampoco de coliformes fecales, este último indicando un adecuado proceso de manipulación de las muestras. Los coliformes totales mostraron una tendencia a disminuir.

### 3.6 Conclusiones

La evaluación sensorial mostró que el uso de concentraciones superiores al 1% de AES de limón o naranja en los recubrimientos afecta la aceptación sensorial del mango, por lo que debe moderarse su uso. Se encontró que la concentración adecuada es 1% en solución acuosa. Se encontró que el MMP con el recubrimiento de quitosano y aceite esencial de limón (QL11) presentó una mayor aceptación sensorial. Además, su contenido inicial de fenoles totales fue mayor que las demás muestras. La estabilidad de la muestra de MMP con CH y AES de limón en los parámetros de color y mayor actividad inhibitoria "*in vivo*" de microorganismos patógenos y alterantes hace que este recubrimiento sea viable en la conservación de mango mínimamente procesado. El MMP nunca superó niveles de crecimiento microbiano que llegaran a afectar la calidad microbiológica del mismo durante el tiempo de estudio. La presencia de CH o de AES no afectan la firmeza o la elasticidad del MMP durante 11 días de almacenamiento. La

capacidad antioxidante del MMP tiene estrecha relación con los recubrimientos estudiados, al igual que el contenido de fenoles totales debido a la presencia y composición de los AES. El AES de naranja presentó una actividad inhibitoria menor que el AES de limón. Las características fisicoquímicas del MMP fueron aceptables, sin embargo a nivel sensorial el recubrimiento de CH y AES de naranja no tuvo aceptación sensorial debido a los sabores extraños que confería al mango. Es posible poner en consideración el uso de recubrimientos comestibles de CH y AES de limón para fines comerciales debido a las características que este concede al mango durante el almacenamiento en refrigeración.

### 3.7 Referencias bibliográficas

- AOAC. (2002). Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. In A. INTERNATIONAL (Ed.), (17th ed.).
- Bajpai, V. K., Baek, K.-H., & Kang, S. C. (2011). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International, In Press, Corrected Proof*. doi: 10.1016/j.foodres.2011.04.052
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology, 46*(2), 446-475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106
- Beaulieu, J. C., & Lea, J. M. (2003). Volatile and quality changes in fresh-cut mangos prepared from firm-ripe and soft-ripe fruit, stored in clamshell containers and passive MAP. *Postharvest Biology and Technology, 30*(1), 15-28. doi: 10.1016/s0925-5214(03)00081-4

- Chien, P.-J., Sheu, F., & Yang, F.-H. (2007). Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*, 78(1), 225-229. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2005.09.022
- Di Vaio, C., Graziani, G., Gaspari, A., Scaglione, G., Nocerino, S., & Ritieni, A. (2010). Essential oils content and antioxidant properties of peel ethanol extract in 18 lemon cultivars. *Scientia Horticulturae*, 126(1), 50-55. doi: 10.1016/j.scienta.2010.06.010
- Djioua, T., Charles, F., Lopez-Lauri, F., Filgueiras, H., Coudret, A., Jr, M. F., . . . Sallanon, H. (2009). Improving the storage of minimally processed mangoes (*Mangifera indica* L.) by hot water treatments. *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 221-226. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.10.006
- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.047
- Embuscado, M. E., & Huber, K. C. (2009). *Edible films and coatings for food applications*: Springer.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, *In Press, Corrected Proof*. doi: 10.1016/j.tifs.2011.02.004
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Valle, V. D., Velez, D., & Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110(2), 428-435. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.02.020

- Hoa, T. T., & Ducamp, M.-N. (2008). Effects of different coatings on biochemical changes of 'cat Hoa loc' mangoes in storage. *Postharvest Biology and Technology*, 48(1), 150-152. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.09.021
- Holguin, M., Higuera, I., Rubio, B., Vargas, M., Muños, A., & Díaz, G. (1998). *Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano*. Bogotá: INVIMA - Ministerio de Salud.
- ICONTEC. (1994). Frutas frescas, mangos (pp. 6).
- Liu, F.-X., Fu, S.-F., Bi, X.-F., Chen, F., Liao, X.-J., Hu, X.-S., & Wu, J.-H. (2013). Physico-chemical and antioxidant properties of four mango (*Mangifera indica* L.) cultivars in China. *Food Chemistry*, 138(1), 396-405. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.111>
- Ma, X., Wu, H., Liu, L., Yao, Q., Wang, S., Zhan, R., . . . Zhou, Y. (2011). Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. *Scientia Horticulturae*, 129(1), 102-107. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.015>
- Machado, S., & Schieber, A. (2010). Bioactive Compounds in Mango (*Mangifera indica* L.) *Bioactive Foods in Promoting Health: Fruits and Vegetables* (pp. 507 - 523): Elsevier Inc.
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. [Original]. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 7.
- Materano, W., Zambrano, J., Valera, A., Quintero, I., Alvarez, R., Maffei, M., & Torres, C. (2004). Efecto del Estado de Madurez en Mango Minimamente Procesado. 48, 59-61. Retrieved from

- Melo, E. d. A., Maciel, M. I. S., Lima, V. L. A. G. d., & Nascimento, R. J. d. (2008). Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 193-201.
- Muda, P., Seymour, G. B., Errington, N., & Tucker, G. A. (1995). Compositional changes in cell wall polymers during mango fruit ripening. *Carbohydrate Polymers*, 26(4), 255-260. doi: 10.1016/0144-8617(95)00028-6
- Nussinovitch, A. (2009). Biopolymer Films and Composite Coatings. In K. Stefan, T. N. Ian & B. U. Johan (Eds.), *Modern Biopolymer Science* (pp. 295-326). San Diego: Academic Press.
- Oms-Oliu, G., Rojas-Graü, M. A., González, L. A., Varela, P., Soliva-Fortuny, R., Hernando, M. I. H., . . . Martín-Belloso, O. (2010). Recent approaches using chemical treatments to preserve quality of fresh-cut fruit: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 57(3), 139-148. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.04.001
- Palafox-Carlos, H., Yahia, E., Islas-Osuna, M. A., Gutierrez-Martinez, P., Robles-Sánchez, M., & González-Aguilar, G. A. (2012). Effect of ripeness stage of mango fruit (*Mangifera indica* L., cv. Ataulfo) on physiological parameters and antioxidant activity. *Scientia Horticulturae*, 135(0), 7-13. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.11.027>
- Robles-Sánchez, R. M., Rojas-Graü, M. A., Odriozola-Serrano, I., González-Aguilar, G. A., & Martín-Belloso, O. (2009). Effect of minimal processing on bioactive compounds and antioxidant activity of fresh-cut 'Kent' mango (*Mangifera indica* L.). *Postharvest Biology and Technology*, 51(3), 384-390. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.09.003>
- Ryley, J., & Kajda, P. (1994). Vitamins in thermal processing. *Food Chemistry*, 49(2), 119-129. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146\(94\)90148-1](http://dx.doi.org/10.1016/0308-8146(94)90148-1)

- Sánchez-González, Cháfer, González-Martínez, Chiralt, & Desobry, S. (2011). Study of the release of limonene present in chitosan films enriched with bergamot oil in food simulants. *Journal of Food Engineering, In Press, Corrected Proof*. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.02.016
- Sánchez-González, L., González-Martínez, C., Chiralt, A., & Cháfer, M. (2010). Physical and antimicrobial properties of chitosan–tea tree essential oil composite films. *Journal of food engineering, 98*, 10.
- Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology, 60*(1), 57-63. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.11.004
- Sothornvit, R., & Rodsamran, P. (2008). Effect of a mango film on quality of whole and minimally processed mangoes. *Postharvest Biology and Technology, 47*(3), 407-415. doi: 10.1016/j.postharvbio.2007.08.005
- Tovar, B., Garcla, H. S., & Mata, M. (2001). Physiology of pre-cut mango II. Evolution of organic acids. *Food Research International, 34*(8), 705-714. doi: 10.1016/s0963-9969(01)00092-8
- Vargas, M., Chiralt, A., Albors, A., & González-Martínez, C. (2009). Effect of chitosan-based edible coatings applied by vacuum impregnation on quality preservation of fresh-cut carrot. *Postharvest Biology and Technology, 51*(2), 263-271. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.07.019
- Ziani, K., Fernández-Pan, I., Royo, M., & Maté, J. I. (2009). Antifungal activity of films and solutions based on chitosan against typical seed fungi. *Food Hydrocolloids, 23*(8), 2309-2314. doi: 10.1016/j.foodhyd.2009.06.005





## 4. Capacidad inhibitoria *in vitro* de recubrimientos de quitosano y aceites esenciales de cítricos con aplicaciones en mango mínimamente procesado.

RICO-RODRÍGUEZ, Fabián; GUTIÉRREZ-CORTÉS, Carolina; DÍAZ-MORENO, Consuelo

### 4.1 Resumen

El quitosano CH es un biopolímero de origen animal con actividad antimicrobiana comprobada sobre un amplio grupo de microorganismos entre los cuales se encuentran patógenos y alterantes. De igual manera, los aceites esenciales (AES) presentan efecto inhibitorio, particularmente los obtenidos a partir de cítricos. Se evaluó el efecto inhibitorio de recubrimientos de CH (1%) y AES de limón (1%) y naranja (1%) frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* Sp. y *Saccharomyces cerevisiae*. El AES de limón presentó mejor inhibición contra los microorganismos estudiados. La combinación de CH con AES de limón presentó indicios de actividad inhibitoria contra los diferentes microorganismos utilizados, por lo que se propone su aplicación como recubrimiento para la biopreservación de alimentos

**Palabras claves:** capacidad antimicrobiana, aceites esenciales, quitosano, biopreservación

## 4.2 Abstract

Chitosan (CH) is a biopolymer from animal sources with proven inhibitory effect against a wide range of microorganisms among which is pathogenic and spoiler ones. In the same way, essential oils (AES) present inhibitory effect, particularly those from citric plants. It was evaluated the inhibitory effect of CH (1%) and AES of lemon (1%) and orange (1%) against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* and *Saccharomyces cerevisiae*. Lemon AES showed higher inhibition levels against the studied microorganisms. Combination of CH and lemon AES showed evidence of inhibitory effect against the 4 microorganisms. It's suggested its application as coating for food biopreservation.

**Keywords:** inhibitory activity, essential oils, chitosan, biopreservation.

## 4.3 Introducción

El quitosano es un polisacárido derivado de la quitina de los exoesqueletos de los crustáceos. Es un compuesto no tóxico, biodegradable, biofuncional, citotóxico y antimicrobiano (Falguera *et al.*, 2011). Es utilizado como componente de recubrimientos y películas junto con compuestos como hidrocolides, vitaminas, proteínas, aceites esenciales, entre otros, para empacar y proteger alimentos con el fin de mejorar la vida útil y la calidad de los productos (Vargas *et al.*, 2009). Se cree que su forma de acción se debe posiblemente al grupo amino que interacciona con las membranas celulares de las bacterias debilitándolas. También puede inhibir la producción de toxinas y crecimiento microbiano, además puede unirse al ADN bacteriano o fúngico e interferir en la síntesis de RNAm y proteínas (Dutta *et al.*, 2009).

Los aceites esenciales son metabolitos secundarios producidos por las plantas. Son compuestos bioactivos, altamente volátiles presentes con actividad antibacterial (Bajpai *et al.*, 2012). Debido a su actividad antimicrobiana son muy utilizados en la industria farmacéutica y en alimentos. En esta última, se ha encontrado que factores como el pH, la temperatura, la carga microbiana del alimento, un ambiente favorable y hasta su modo de presentación pueden favorecer su actividad biológica. A su vez se ha descrito su potencial utilización en vegetales. Se ha reportado su eficacia para inhibir el crecimiento de *Salmonella* sp. y otros agentes patógenos (Bajpai, *et al.*, 2012).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad inhibitoria de recubrimientos de quitosano y aceites esenciales *Escherichia coli*, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus* y *Sacharomyces cerevisiae*.

## **4.4 Materiales y métodos**

### **4.4.1 Recubrimientos**

Las soluciones de CH comercial (Kittoflo®) y CH analítico (Sigma-Alrich) (para evaluación de actividad antimicrobiana) y aceites esenciales de limón y naranja (Aromasynt SAS) se prepararon según una modificación del procedimiento reportado por Sanchez-Gonzales *et al* (2011). Se disolvió CH (1 % m/v) en una solución de ácido láctico al 1% v/v a 40 °C durante 2 h, se filtró y posteriormente se adicionó glicerol (0,5 %v/v) y Tween80® (0,5 %v/v) y se emulsificó el AES de limón o naranja en concentración de 1,0 % v/v con agitación a 800 rpm durante 3 h y se desgasificó a 25°C controlando la temperatura para evitar evaporación de los AES, la solución se ajustó a un pH de 3.5.

#### 4.4.2 Actividad antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y AES de limón y naranja fue evaluada “*in vitro*” utilizando cepas de *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* sp. (ATCC 13076) y *S. cerevisiae* (ATCC 2601). Los cultivos puros se activaron en tubos con 5 ml de caldo nutritivo estéril (Oxoyd) y se incubaron por 24 h a 37 °C. Posteriormente se sembraron en agar nutritivo (Oxoyd) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Se realizó el análisis de actividad inhibitoria de las soluciones de CH comercial (Kittoflo®) y grado analítico (Sigma-Alrich) en mezcla con los AES de limón y naranja por el método de difusión en agar en medio Müller-Hinton (Oxoyd). SE uso una modificación del procedimiento reportado por Espina *et al* (2011). La suspensiones de microorganismos se realizaron utilizando como patrón el tubo 0.5 en la escala de MacFarland correspondiente a 10<sup>8</sup> UFC/ml. Posteriormente se realizaron diluciones hasta alcanzar una concentración de 10<sup>5</sup> UFC/ml, de la cual se tomó 0.1 ml para realizar la siembra en superficie. Se impregnaron discos de papel filtro estériles con 50 µl de CH comercial y CH analítico con AES de limón o naranja y se colocaron en la superficie de las cajas de petri inoculadas. La actividad antimicrobiana “*in vitro*” se evaluó de acuerdo al diámetro de los halos de inhibición (Espina, *et al.*, 2011) utilizando como patrón la medida de los halos obtenidos con discos de ampicilina de 10 µg.

### 4.5 Resultados y discusión

#### 4.5.1 Actividad antimicrobiana

Los valores de referencia para establecer la susceptibilidad de los microorganismos estudiados se presentan en la *Tabla 4-1* tomando como referencia la ampicilina (10 µg). La actividad antimicrobiana “*in vitro*” (*Tabla 4-2*) se evidenció midiendo los halos de

inhibición que se formaron alrededor de cada disco con solución de estudio. *E. coli* presenta una sensibilidad intermedia frente a la ampicilina, con halo de inhibición de 16 mm. Frente al quitosano comercial y al AES de limón, presentó zonas de inhibición con diámetros inferiores al control, por lo que no se considera sensible. Las demás sustancias estudiadas no presentaron ningún indicio de inhibición sobre *E. coli*

Tabla 4-1 Valores de referencia (mm) Ensayos de susceptibilidad de la NCCLS para ampicilina 10 µg.

Microorganismo	Resistente	Intermedio	Susceptible
<i>E. coli</i>	<13	14 – 16	>17
<i>Salmonella</i> sp.	<13	14 – 16	>17
<i>S. aureus</i>	<28	-	>29

*Nota:* Los valores corresponden al diámetro de inhibición alrededor de los discos.

Fuente: (NCCLS, 2007)

*Salmonella* sp. presentó sensibilidad al efecto de la ampicilina y sensibilidad intermedia para el AES de limón. Con el resto de sustancias la inhibición no fue representativa. Para las interacciones de AES de naranja y quitosano comercial (CCN) y analítico (CAN) no presentó inhibición alguna.

*S. aureus* presentó resistencia a la ampicilina en el control, así como en todas las mezclas estudiadas, con halos inferiores a 28 mm de diámetro.

En el caso de *S. cerevisiae* los halos obtenidos estuvieron entre 10 y 14 mm. Presentó susceptibilidad intermedia para AES de limón y con los demás tratamientos se mostró resistente, según valores reportados por Espina *et al* (2011) quienes consideraron resistencia con halos menores a 12 mm, susceptibilidad intermedia con halos entre 12 y 20, y susceptibilidad fuerte con halos mayores a 20mm.

En general se observó que los aceites esenciales puros presentaron mayores diámetros en los halos de inhibición. Sin embargo en el caso de *E. coli*, el aceite de naranja no presentó actividad alguna. Se encontró además, que no hubo una variación considerable en el diámetro de inhibición entre los dos tipos de quitosano (analítico y comercial). No se presentó inhibición de ninguno de los microorganismos estudiados cuando se uso el aceite de naranja mezclado con el quitosano sin importar su procedencia. Lo anterior sugiere un posible efecto antagónico entre el quitosano y el AES de naranja, ya que si presentó indicios de inhibición en forma pura.

Tabla 4-2 Diámetros de inhibición (mm) de CH y AES de limón y naranja

Micro-organismo	Ampicilina	CA	CC	AEL	AEN	CCL	CCN	CAL	CAN
<i>S.cereviciae</i>	14	10	10	14	12	10	N	12	N
<i>E.coli</i>	16	10	10	12	N	N	N	N	N
<i>S.aureus</i>	18	12	10	14	12	10	N	10	N
<i>Salmonella</i> ssp	18	8	8	14	10	12	N	12	N

N = No se presentó inhibición

CA = Quitosano analítico; CC = Quitosano comercial; AEL = aceite esencial de limón; AEN = aceite esencial de naranja, CCL = Quitosano comercial y AES de limón; CCN = Quitosano comercial y AES de naranja; CAL = Quitosano analítico y AES de limón; CAN = Quitosano analítico y AES de naranja.

La interacción del CH de ambas procedencias con AES de limón mostró capacidad para inhibir en un pequeño porcentaje el crecimiento de *S. cereviciae*, *St. aureus* y *Salmonella* sp. Sin embargo, estas combinaciones fueron ineficientes contra *E. coli* en las concentraciones utilizadas.

Espina L, *et al* (2011) encontró que los AES de limón y naranja son incapaces de inhibir el crecimiento de *E. coli*, *St. aureus* y *Salmonella enteritidis*. En el presente estudio se

demostró indicios de actividad que se podría mejorar con un incremento en las concentraciones de AES.

## 4.6 Conclusiones

Los AES de limón y naranja combinados con el CH presentaron una actividad antimicrobiana moderada. Sin embargo, este efecto limitado puede mejorarse utilizando concentraciones de AES más altas en las muestras. Se comprobó el efecto antimicrobiano del quitosano reportado en la literatura. Se encontró efecto aditivo al combinar el CH analítico y AES de limón al ser usado contra los diferentes microorganismos estudiados. Los AES de limón y naranja son una posibilidad para inhibir el crecimiento de patógenos y alterantes de alimentos, lo cual puede ser una alternativa en la biopreservación de alimentos. *E. coli* mostró resistencia a la mayoría de interacciones evaluadas, por lo que es necesario determinar si la concentración de CH o AES tiene efecto sobre su capacidad de inhibición. Es necesario comprobar el efecto de la interacción de recubrimientos de CH y AES de limón y naranja en matrices alimentarias para una posible aplicación como biopreservante y verificar su acción *in vivo*, así como el efecto sensorial que este puede llegar a causar en los consumidores.

## 4.7 Referencias bibliográficas

- Bajpai, V. K., Baek, K.-H., & Kang, S. C. (2012). Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. *Food Research International*, 45(2), 722-734. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.052>

- Dutta, P. K., Tripathi, S., Mehrotra, G. K., & Dutta, J. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*, 114(4), 1173-1182. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.047
- Espina, L., Somolinos, M., Lorán, S., Conchello, P., García, D., & Pagán, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 7.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A., & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science & Technology*, *In Press, Corrected Proof*. doi: 10.1016/j.tifs.2011.02.004
- NCCLS. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Seventeenth informational supplement Vol. 27. C. a. I. s. institute (Ed.) (pp. 177).
- Sánchez-González, L., Pastor, C., Vargas, M., Chiralt, A., González-Martínez, C., & Cháfer, M. (2011). Effect of hydroxypropylmethylcellulose and chitosan coatings with and without bergamot essential oil on quality and safety of cold-stored grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 60(1), 57-63. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.11.004
- Vargas, M., Chiralt, A., Albors, A., & González-Martínez, C. (2009). Effect of chitosan-based edible coatings applied by vacuum impregnation on quality preservation of fresh-cut carrot. *Postharvest Biology and Technology*, 51(2), 263-271. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.07.019





## **5. Conclusiones y recomendaciones**

### **5.1 Conclusiones**

Se evaluaron las características fisicoquímicas de las películas de quitosano al 1 y 2% con adición de aceites esenciales de limón y naranja en concentraciones de 0,5; 1,0 y 1,5%, encontrando que el espesor, contenido de humedad, resistencia al corte, elasticidad, y el color de las mismas dependen principalmente de la concentración de quitosano. Se encontró además, que a mayor concentración de quitosano menor es la permeabilidad al vapor de agua y el espesor de las mismas. Por otro lado, el contenido de humedad disminuyó con el aumento de las concentraciones de quitosano. Los parámetros de color de las películas de quitosano y aceites esenciales tienen variación entre tratamientos, las muestras con 2% de quitosano tienen mayor luminosidad que aquellas con 1%. La presencia de aceites esenciales de limón y naranja no ejerce efecto sobre las propiedades fisicoquímicas evaluadas en las películas.

Se realizó la evaluación sensorial de los recubrimientos de quitosano al 1 y 2% con aceites esenciales al 0,5; 1,0 y 1,5% en MMP. Se determinó que la concentración de quitosano al 2% genera sabores residuales no deseados en el MMP. De igual manera, se encontró que los aceites esenciales en concentración superior al 1% producen un sabor amargo en el MMP, haciendo que este sea rechazado.

La aceptación sensorial es un limitante importante para el uso de los recubrimientos de quitosano y aceites esenciales. El análisis sensorial permitió determinar que el MMP con

las combinaciones de recubrimientos que mejor aceptación tuvieron por los consumidores fueron quitosano al 1% - aceite esencial de limón al 1% aceite esencial de naranja al 1%. Se encontró que el MMP con recubrimiento de quitosano y aceite esencial de naranja al 1% no fue sensorialmente aceptado por los consumidores debido a la presencia de sabores residuales a pescado y a fruta podrida.

Se determinaron los parámetros de calidad del mango mínimamente procesado con recubrimientos de quitosano al 1% y aceites esenciales al 1%. La firmeza del mango con recubrimiento de quitosano y aceites esenciales se mantiene a lo largo de su vida de almacenamiento (11 días). La muestra control tuvo valores de firmeza más altos que las muestras de MMP con recubrimientos. Este parámetro es altamente representativo al evaluar su aceptación sensorial.

Se halló que los recubrimientos presentan un alto contenido de sustancias antioxidantes en el día 0 de almacenamiento comparado con la muestra patrón, sin embargo, estos disminuyeron a lo largo del tiempo de almacenamiento. Debido a la presencia de los aceites esenciales en los recubrimientos, el contenido de fenoles totales fue más alto en estas muestras que en la muestra control.

Se observó variación en los parámetros de color de la cromaticidad ( $C^*$ ) y el parámetro  $a^*$ , estando relacionado principalmente con el pardeamiento enzimático y los procesos oxidativos propios del mango durante el almacenamiento. La muestra control tuvo una variación mucho mayor que las muestras con recubrimientos por lo que estos recubrimientos mostraron efectividad como barrera al oxígeno.

Se demostró que los recubrimientos afectan de forma positiva la vida útil del mango mínimamente procesado, al determinarse la efectividad como inhibidor *in vitro* e *in vivo*

del crecimiento de coliformes totales y actuar como agente bacteriostático contra mesófilos aerobios, mohos y levaduras.

La vida útil del mango mínimamente procesado se puede aumentar a través del uso de recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales manteniendo de manera efectiva sus características fisicoquímicas y estructurales.

## **5.2 Recomendaciones**

Uno de los aspectos más importantes en la evaluación de la vida útil del mango con recubrimientos comestibles de quitosano y aceites esenciales es su aceptación sensorial. Por esta razón se recomienda determinar un umbral de aceptación de las diferentes concentraciones de estos recubrimientos con el fin de optimizar los efectos que este pueda tener sobre la matriz alimentaria estudiada.

Se requiere evaluar parámetros de calidad tipo fisiológico, como velocidad de respiración, transpiración y producción de etileno, debido a que estos aspectos afectan considerablemente la vida útil de los productos vegetales y su adecuado manejo puede ayudar a incrementar la vida útil de los productos.



## **A. Anexo: Nombrar el anexo A de acuerdo con su contenido**

Los Anexos son documentos o elementos que complementan el cuerpo del trabajo y que se relacionan, directa o indirectamente, con la investigación, tales como acetatos, cd, normas, etc. Los anexos deben ir numerados con letras y usando el estilo "Título anexos".



**B. Anexo: Nombrar el anexo B de acuerdo con su contenido**



## **Bibliografía**