
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA**



**“EFECTO DE LA APLICACIÓN DE PELÍCULAS DE QUITOSANO EN
EL TIEMPO DE VIDA UTIL DEL TOMATE”**

TRABAJO DE TITULACION PRESENTADO POR:

Br. Betsy Eréndira López Díaz

Para optar por el título de:

Ingeniero Químico

Tutor:

MPhil. Martha Benavente

Managua, Nicaragua, Junio 2016.

DEDICATORIA

A Dios porque sin él nada de lo que nos proponemos es posible.

A mi mamá Alcira del Carmen Díaz por inculcarme el valor del estudio y siempre ser el motor de vida dentro de la familia.

A mi familia y amigos por creer en mí y mi capacidad para romper cualquier barrera que se interponga para llegar a la meta.

Betsy Eréndira López Díaz

AGRADECIMIENTOS

A mi familia y amigos por siempre acompañarme y brindarme su consejo y ayuda incondicional.

A mi tutora MPhil. Martha Benavente por acogerme para realizar este trabajo que considero es un privilegio haber podido trabajarlo y llevarlo a cabo.

A mi asesor Lic. Alejandro Hernández encargado del laboratorio de alimentos de la facultad de Ingeniería Química por brindarme un poco de su conocimiento y ayudarme en esta tarea.

Al Ing. Arnoldo Hidalgo por proporcionarnos los materiales necesarios para llevar a cabo esta investigación.

OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA

Con el trabajo de diploma “**Efecto de la Aplicación de Películas de Quitosano en el Tiempo de Vida Útil del Tomate**”, desarrollado por la Br. Betsy Eréndira López Díaz, se abre una gran e importante oportunidad para el uso del quitosano en el área de conservación y preservación de los alimentos.

El problema del rápido deterioro de los alimentos tales como frutas, vegetales, lácteos y cárnicos, debido a la presencia de microorganismos los cuales abundan en el suelo, en el agua y en el aire, conducen a buscar métodos y soluciones; así como, desarrollar nuevos productos que permitan contrarrestar y bloquear el efecto que tienen las bacterias, mohos y levaduras sobre los diferentes productos alimenticios.

Durante la realización de este trabajo e interpretación de los resultados experimentales, la estudiante Betsy Eréndira López Díaz demostró poseer suficientes conocimientos en ingeniería química, iniciativa, destreza e independencia para cumplir con el objetivo planteado.

Con la presentación de este trabajo la Br. Betsy Eréndira López Díaz han demostrado ser meritorias del título de Ingeniero Químico, por cuanto solicito al honorable jurado les concedan el grado de aprobado.

MPhil. Martha Benavente
Tutora del estudio,
Profesora Titular, UNI- FIQ

RESUMEN

En este trabajo el objetivo principal fue estudiar el efecto que producían las películas de quitosano en los tomates. Este trabajo consta de dos partes, la primera fue la elaboración de las películas de quitosano y la segunda, la evaluación de su efecto en la vida útil del tomate.

Para llevar a cabo la primera parte, se utilizó quitosano en hojuelas con un tamaño <0.32 mm en solución con dos tipos de ácidos orgánicos: Ácido acético (CH_3COOH) y Ácido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); así como, tres diferentes tipos de aditivos tales como Glicerina, Sorbato de potasio y goma Xantán para proporcionarle, a las películas, las características de flexibilidad, elongación y adherencia. Posterior al proceso de elaboración de la solución, se midió la viscosidad de cada una de las soluciones para con ello analizar su incidencia en el grosor de las películas. En el proceso de moldeado y secado se utilizaron placas de vidrio elaboradas a medida de manera que fuera de fácil manipulación.

Después de evaluar a las películas con las mejores características y medir su grosor, se procedió a llevar a cabo la segunda parte del estudio: la evaluación del efecto de las películas en los tomates a través de sus características sensoriales y físicas: olor, color y peso. Paralelamente, se realizó un análisis microbiológico que incluyó la determinación de mohos, levaduras y cuenta total de aerobios tanto mesófilos y psicrófilos a dos temperaturas diferentes: 30 y 9 °C. Así también, se llevó a cabo un prueba de Acidez titulable con el objetivo de relacionar el porcentaje de acidez con la maduración del objeto de estudio.

Los resultados mostraron que las películas con las mejores características (es decir: flexibles, maleables y moldeables) fueron: las películas de quitosano con ácido cítrico y glicerina, las películas de quitosano con ácido cítrico y goma Xantán y, de cierta manera, las película de ácido acético; ya que éstas últimas cumplían con algunas de las características requeridas para el estudio pues era una película manejable aunque no moldeable debido a que no tenía la propiedad de adherirse a las superficies.

El proceso de recuento microbiológico mostró que los recubrimientos no cumplen su función, ya que no inhiben o reducen el crecimiento de los microorganismos, sino más bien lo precipitan. Por tales razones se concluye que este tipo de recubrimiento no es apto para este tipo de alimentos. Así también, se observó que la temperatura tiene un papel importan en cada uno de los proceso que llevaron a cabo siendo este el de mayor incidencia y notoriedad a la hora de analizar los resultados.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
OPINIÓN DEL CATEDRÁTICO GUÍA.....	3
RESUMEN.....	4
TABLA DE CONTENIDO.....	5
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo General.....	13
2.2 Objetivos Específicos.....	13
3. MARCO TEÓRICO.....	14
3.1 Generalidades de la Quitina y Quitosano.....	14
3.1.1 Disponibilidad.....	14
3.2 Proceso de obtención de la Quitina y Quitosano.....	15
3.2.1 Obtención del quitosano.....	16
3.3 Propiedades de la Quitina y Quitosano.....	16
3.3.1 Grado de acetilación (GA).....	16
3.3.2 Peso molecular y viscosidad.....	16
3.3.3 Solubilidad.....	17
3.3.4 Biodegradabilidad.....	17
3.3.5 Propiedades funcionales.....	18
3.3.6 Propiedades antimicrobianas.....	19
3.3.7 Propiedades biológicas. Efectos dietéticos y metabólicos.....	20
3.4 Aplicaciones de la quitina y quitosano.....	20
3.4.1 Aplicaciones biomédicas.....	20
3.4.2 Aplicación en la agricultura y operaciones post cosecha.....	20
3.4.3 Tratamiento de aguas residuales.....	21
3.4.4 Industria cosmética.....	21
3.4.5 Industria alimenticia.....	21
3.5 Microbiología de los alimentos.....	23

3.6	Factores que intervienen en la alteración de los alimentos.....	25
3.6.1	Temperatura.....	28
3.6.2	Humedad y Sequedad	29
3.6.3	Aire y oxígeno	29
3.6.4	Luz	30
3.7	Principales causas de alteración de los alimentos.....	30
3.7.1	Causas Químicas	30
3.7.2	Causas Biológicas.....	32
3.8	Principales grupos de microorganismos causantes de alteraciones	34
3.8.1	Bacterias	34
3.8.2	Mohos	34
3.8.3	Levaduras.....	34
3.9	Pruebas Microbiológicas.....	35
3.9.1	Método #1 (Camacho, A., M.Giles, 2009).....	35
3.9.2	Método #2.....	37
3.9.3	Método #3 (Prado Barragán et al., 2013)	38
3.10	Películas Comestibles	39
3.10.1	Formación de las películas	40
3.10.2	Aditivos	41
4.	METODOLOGÍA	44
4.1	Materiales.....	44
4.1.1	Quitosano.....	44
4.1.2	Materiales y Equipos de laboratorio.....	44
4.1.3	Reactivos	45
4.2	Parte Experimental.....	45
4.2.1	Elaboración de películas de quitosano.....	45
4.2.2	Determinación de la viscosidad.....	47
4.2.3	Determinación del grosor de las películas de quitosano.....	48
4.3	Evaluación de la vida útil del tomate recubierto con las películas de quitosano	49
4.3.1	Procedimiento para determinar el grado de madurez (acidez)	49
4.3.2	Procedimiento para determinar las propiedades físicas y sensoriales	49
4.3.3	Análisis microbiológico.....	50
5.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	51
5.1	Elaboración de películas de quitosano.....	51

5.1.1	Experimento No. 1 con ácido acético.....	51
5.1.2	Experimento No. 2 con ácido acético y sorbato de potasio.....	51
5.1.3	Experimento No. 3 con ácido acético y glicerina.....	51
5.1.4	Experimento No. 4 con ácido acético y goma xantán	51
5.1.5	Experimento No. 5 con ácido cítrico	52
5.1.6	Experimento No. 6 con ácido cítrico y sorbato de potasio.....	52
5.1.7	Experimento No. 7 con ácido cítrico y glicerina.....	52
5.1.8	Experimento No. 8 con ácido cítrico y goma xantán	52
5.2	Determinación de la viscosidad	53
5.3	Determinación del grosor de las películas de quitosano.....	54
5.4	Análisis microbiológico de películas de quitosano utilizando tomates como objeto de estudio.....	57
5.4.1	Prueba Experimental No. 1.....	57
5.4.2	Prueba Experimental No. 2.....	66
	Propiedades sensoriales antes de la incubación:	66
5.5	Determinación del índice de madurez del tomate (% Acidez)	70
6	CONCLUSIONES	74
7	RECOMENDACIONES.....	75
8	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE TABLAS

N°	Descripción	Página
3.1	Vida útil de almacenamiento de tejidos vegetales y animales.	23
3.2	Sensibilidad de Frutas y Hortalizas a bajas temperaturas	25
3.3	Aplicaciones de las Películas Comestibles	37
3.4	Propiedades fisicoquímicas del glicerol a 20 °C y 101,3 kPa	39
4.1	Material de Laboratorio y Cristalería	41
4.2	Equipo de Laboratorio	41
4.3	Reactivos	42
4.4	Descripción de los materiales utilizados para la elaboración de las películas de quitosano.	44
5.1	Viscosidad de las soluciones preparadas a partir de quitosano con diferentes reactivos.	50
5.2	Propiedades Generales de la goma xantán.	51
5.3	Grosor de las películas de quitosano para el experimento No. 1.	52
5.4	Grosor de las películas de quitosano para el experimento No. 2.	53
5.5	Propiedades fisicoquímicas del glicerina a 20°C (Alenezi et al., 2010).	53
5.6	Descripción del Peso de la muestra y temperatura de almacenamiento del producto, para la prueba experimental No. 1	54
5.7	Resultados después de la incubación de las Muestras No. 1, 2 y 7 del Experimento 1.	55
5.8	Resultados después de la incubación de las Muestras No. 3, 4 y 6 del Experimento 1.	55
5.9	Resultados después de la incubación de la Muestra No. 5 (Experimento 1).	56
5.10	Descripción del %Pérdida de Peso de las muestras a diferentes temperaturas de almacenamiento del producto.	57
5.11	Descripción del Peso de la muestra y temperatura de almacenamiento del producto, de la prueba experimental No. 2.	63
5.12	Resultados después de la incubación de las Muestras No. 1, 2 y 7 (Experimento 2).	64
5.13	Resultados después de la incubación de las Muestras No. 3, 4 y 6 (Experimento 2).	64
5.14	Resultados después de la incubación de la Muestra No. 5 (Experimento 2).	65

5.15	Descripción del %Pérdida de Peso de las muestras a diferentes temperaturas de almacenamiento del producto.	65
5.16	Grado de Acidez de cada muestra y volumen gastado en el experimento N°1	68
5.17	Grado de Acidez de cada muestra y volumen gastado en el experimento N°2	69

LISTA DE FIGURAS

N°	Descripción	Página
3.1	Esquema del procedimiento para determinar mohos, levadura y aeróbicos mesófilos del método 1 (Camacho, A., M.Giles, 2009).	34
3.2	Estructura del glicerol	39
3.3	Estructura química de la goma Xantán	40
4.1	(a) Viscosímetro CANNON 2020 y (b) Micrómetro manual.	45
4.2	Esquema modificado del procedimiento para determinar mohos, levadura y aeróbicos mesófilos del método 1 (Camacho, A., M.Giles, 2009).	47
5.1	Procesador de alimentos al momento de realizar la mezcla de la solución de hojuelas quitosa+Acido+Aditivo.	49
5.2	Placa de vidrio en la cual se moldeo y seco el recubrimiento.	49
5.3	Desmontado de las películas	50
5.4	Imagen 3D de la películas indicando los lugares en que se midió el grosor.	52
5.5	Recuento de la cuenta total de aerobios mesófilos a 25°C	56
5.6	Recuento Mohos y Levaduras a 25°C	57
5.7	Recuento Cuenta Total de Aerobios Mesófilos a 30°C en tomates con películas con Glicerina.	58
5.8	Recuento Cuenta Total de Aerobios Mesófilos a 30°C en tomates sin recubrimiento.	58
5.9	Recuento Cuenta Total de Aerobios Mesófilos a 30°C en tomates con películas con Goma Xantán.	59
5.10	Recuento Mohos y Levaduras a 9°C en tomates con películas con Goma Xantán.	59
5.11	Recuento Mohos y Levaduras a 9°C en tomates con películas con Glicerina.	60
5.12	Recuento Mohos y Levaduras a 9°C en tomates sin recubrimiento.	60
5.13	Recuento Mohos y Levaduras a 30°C en tomates con recubrimiento con Goma Xantán.	61
5.14	Recuento Mohos y Levaduras a 30°C en tomates sin recubrimiento.	62
5.15	Recuento Mohos y Levaduras a 30°C en tomates con recubrimiento con Glicerina.	62
5.16	% de Acidez según las muestras de experimento N°1	68
5.17	% de Acidez según las muestras de experimento N°2	69

1. INTRODUCCIÓN

Nicaragua es un país que se caracteriza porque en su territorio se cultiva una amplia variedad de frutas y vegetales, las cuales son consumidas por sus características sensoriales de color, sabor, aroma, textura y apariencia; así también, aportan a la dieta micronutrientes tales como vitaminas y minerales; y son fuentes de fibra y energía. No obstante, este tipo de alimentos poseen una vida útil relativamente corta debido al deterioro provocado por los factores ambientales y por la acción de los microorganismos por lo que se hace necesario conservar algunos tipos de frutas y vegetales para garantizar su disponibilidad.

Las frutas y vegetales son organismos vivos y es esta naturaleza biológica la causa del desarrollo de una serie de transformaciones que no solo modifican sus características originales, sino que llegan a producir su deterioro. En estas transformaciones se incluyen reacciones químicas y bioquímicas; además, los alimentos que el hombre utiliza para su consumo, son también adecuados para que muchos de los microorganismos que abundan en el suelo, en el agua y en el aire, se desarrollen; por ello, en el deterioro de estos alimentos también intervienen procesos microbianos.

“Todo cuerpo vivo nace, se desarrolla, se degrada y muere”. Los alimentos por su naturaleza biológica no escapan a esta regla general pues su descomposición es un fenómeno natural. Los tejidos vivos son resistentes a la acción degradativa de los microorganismos, pero una vez muertos son consumidos por fuerzas biológicas (Casp-Vanaclocha y Abril Requena, 2003).

Por lo anterior, el hombre, a través de la historia, ha diseñado diferentes métodos de conservación de los alimentos tales como el secado, ahumado, salado, congelado, pasteurización, esterilización, etc. Sin embargo, algunos de estos métodos presentan el inconveniente que modifican la estructura de los alimentos y en algunos casos, cambian sus propiedades organolépticas originales (olor, color, sabor, etc.) y disminuyen las propiedades nutricionales (por ejemplo, vitaminas y minerales por lixiviación) (Vázquez et al., 2005).

En esta medida, el recubrimiento comestible de los alimentos es uno de los métodos prometedores debido a sus propiedades particulares ya que pueden evitar la pérdida de humedad, la pérdida de aromas, inhiben la penetración de oxígeno al tejido de vegetal y el crecimiento microbiano. Muchos materiales tales como polisacáridos tales como la quitina y el quitosano, proteínas, aceites esenciales, puede servir como recubrimientos comestibles (Jianglian y Shaoying, 2013).

Aunque en Nicaragua no se han llevado a cabo estudios sobre la implementación de películas de quitosano en la preservación de los alimentos, se ha trabajado en la obtención de quitina y quitosano a partir de desechos de camarón y langostino por procesos químicos (Escorcía et al., 2006) y biológicos (Marcia et al., 2011).

Entre los estudios realizados en el tema del desarrollo de películas a base de polisacáridos, está el desarrollado por Zamora-Mora et al. (2010) los cuales llevaron a cabo la combinación del colágeno, el principal componente de la matriz extracelular, y de quitosano, un polielectrolito

que favorece la adhesión celular, para producir un material reforzado con buenas características de absorción, hinchamiento y propiedades térmicas, para su posterior aplicación en ingeniería de tejidos. Ellos obtuvieron bio-filmes compuestos de colágeno-quitosano 8:2 y 2:8 las que fueron sometidas a evaluación térmica, presentando valores altos de degradación, así como de las entalpías de deshidratación de los soportes.

La quitina y el quitosano son polisacáridos que pueden ser extraídos del caparazón de crustáceos, moluscos, insectos y otros seres vivos. Las propiedades antimicrobianas de la quitina y el quitosano son conocidas por el hombre desde la antigüedad (Lárez Velásquez, 2008), es por ello que se trata de abordar una investigación más profundizada en cuanto a este producto y el beneficio que tendría sobre los alimentos que consumimos.

Los diferentes estudios han demostrado que el recubrimiento comestible es beneficioso para la vida útil de post-cosecha de frutas y verduras. El revestimiento a base de quitosano ha sido ampliamente utilizado debido a su propiedad de inhibir el crecimiento de microorganismos, es no tóxico, biodegradable, y posee propiedades biocompatibles; sin embargo, presenta deficiencias en el recubrimiento (Pereda et al., 2014). Por ello, Pereda et al. (2014) utilizaron dos métodos para mejorar la propiedad de revestimiento del quitosano.

El primer método involucra la combinación del quitosano con compuestos orgánicos, compuestos inorgánicos o agentes de control biológico. El otro método es que el quitosano solo recubrimiento se aplicó con remedios no de revestimiento incluyendo el tratamiento térmico, tratamiento hipobárica, la fumigación de gas, y el envasado en atmósfera modificada. Después de aplicar mejora de revestimiento a base de quitosano, los efectos conservantes se aumentaron en la mayoría de los casos en comparación con el único revestimiento de quitosano (Pereda et al., 2014).

En base a las características antimicrobianas que presentan las películas de quitosano, se desea estudiar el efecto que tendrán las películas de quitosano sobre diferentes frutas cultivadas en nuestro país.

El presente trabajo monográfico tiene como objetivo producir películas comestibles a partir de quitosano, las cuales pueden actuar como barrera a la transferencia de agua, gases y solutos, y su implementación en alimentos a fin de aumentar su tiempo de vida de anaquel. Para ello, se seleccionó como fruta de estudio el tomate debido a que posee las características necesarias para llevar a cabo este proyecto investigativo a nivel de laboratorio. Entre estas características están menor tiempo de vida (rápido deterioro), se cosechan en varias temporadas al año y son accesibles en el mercado local.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Estudiar el efecto de la aplicación de películas de quitosano en el tiempo de vida útil del tomate.

2.2 Objetivos Específicos

- Elaborar películas de quitosano haciendo uso de distintos reactivos tales como Ácido Acético y Ácido Cítrico para la disolución del polímero; y de Sorbato de potasio, Glicerina y goma Xantán como aditivos.
- Determinar la viscosidad de las mezclas para la elaboración de las películas de quitosano y el grosor de la película.
- Evaluar el tiempo de vida útil del tomate recubierto con las películas de quitosano a diferentes temperaturas (9 y 30°C), a través del análisis de porcentaje de humedad, % de acidez, actividad microbiana de mohos, levaduras y cuenta total de aerobios.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Generalidades de la Quitina y Quitosano

La quitina es un polisacárido que forma parte del caparazón de crustáceos, moluscos, insectos y otros seres vivos, defendiéndolos del contacto con el medio externo (García, 2015). Cuando el grado de desacetilación de la quitina alcanza el 50%, este biopolímero es llamado quitosano. Los grupos amino de este polímero permiten que se solubilice fácilmente en medios ácidos, confiriéndole una innumerable cantidad de aplicaciones (Giraldo-Pedraza, 2015).

Las propiedades de la quitina y el quitosano dependen principalmente de la fuente de obtención y el método de preparación; estos polímeros difieren entre sí por su distribución, masa molecular y grado de acetilación. Entre estas se destaca la formación de espumas, emulsiones, geles con polianiones, y retienen humedad por la presencia de los grupos amino libres que al disolverse en solución acuosa acidificada adquieren carga positiva.

Además se ha reportado que el quitosano controla el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras y ha sido aplicada para suprimir estos organismos en tejidos de plantas y alimentos. Se ha establecido no puede ser digerido por los seres humanos así que está considerado como una fibra dietética con un contenido calórico cero.

3.1.1 Disponibilidad

En contraste con la celulosa de las fibras de las plantas, mucha de la biomasa donde abunda la quitina no está ampliamente disponible para su utilización. La cantidad de quitina de los crustáceos en el medio ambiente marino se ha estimado en 1.560 millones de toneladas. El exoesqueleto de crustáceos (carapachos del cangrejo y de langosta y el caparazón del camarón) es actualmente la fuente industrial principal de quitina. En el caso del camarón y el cangrejo, la quitina representa el 14-27% y 13-15%, respectivamente. En cutículas de crustáceos, la quitina está íntimamente asociada con las proteínas, sales inorgánicas, tales como el carbonato de calcio- y lípidos incluyendo los pigmentos, así el aislamiento abarca varias etapas de purificación (Hernández Beltrán, 2004).

Las cáscaras de almeja y ostra contienen cantidades significativas de quitina. Sin embargo, las producciones del polímero son bajas y el contenido mineral es muy alto en ambos. Contienen quitina al 6 y 4% y cenizas al 90 y 85%, respectivamente. Por el contrario con la cáscara de moluscos, que son la fuente menos pura de quitina, el esqueleto del calamar abarca el 40% de quitina que está casi libre de sales del calcio. La pluma del calamar es en hecho la única fuente importante de p-quitina polimorfa, puesto que los crustáceos contienen exclusivamente a-quitina.

Hay también hongos que producen quitosano en producciones significativas en base a el contenido de la pared celular seca, como el *Mucor rouxií* y *Choanephora cucurbitarum* con 30 y 28% de quitosana, respectivamente. También, dos diatomeas marinas, *Cyclotella*

cryptica y *Thalassiosira fluviatilis* han demostrado ser una fuente de quitina pura que no se asocia a las proteínas.

La quitina se encuentra además en insectos, arácnidos, algas, mariposas, jaibas, cucarachas, corales y zooplancton. No es probable que nuevas fuentes de quitina sean explotadas comercialmente en corto plazo ya que la actual demanda se alcanza adecuadamente por la quitina derivada de los exosqueletos de crustáceos obtenidos como biomasa inútil de la industria del procesamiento de mariscos.

3.2 Proceso de obtención de la Quitina y Quitosano

Los desechos del caparazón de los crustáceos están compuestos por proteínas (20-40%), sales de calcio y magnesio, mayormente carbonato y fosfato (30-60%), quitina (20-30%) y lípidos (0-14%), variando éstas proporciones con la especie y la estación (Abadía-Piquero, 2010).

El aislamiento de la quitina de los biodesechos de crustáceos, implica operaciones básicas (Abadía-Piquero, 2010):

- Eliminación del residual proteico.
- Eliminación de la materia inorgánica.
- Eliminación de pigmentos lipídicos (carotenoides)

Los procesos químicos convencionales se llevan a cabo con operaciones que incluyen: eliminación de proteínas con dilución de álcali y eliminación de sales minerales por tratamiento con ácido pero el paso de la desmineralización puede también preceder el paso de desproteínización. La decoloración es conducida por un típico tratamiento de blanqueado con H₂O₂ y NaClO para destruir los pigmentos carotenoides (Abadía-Piquero, 2010).

Un cuidadoso control sobre estas operaciones es esencial para alcanzar una alta pureza y características físico químicas uniformes de la quitina. También las condiciones de proceso pueden ser adaptadas para obtener características específicas de la quitina de acuerdo con la finalidad propuesta. Recientemente los procesos enzimáticos y biotecnológicos han sido implantados también en los procesos de aislamiento de quitina. En las regiones tropicales, donde más desechos de crustáceos son generados, hay una carencia de tecnología ambiental disponible para la extracción de la quitina, proteínas y pigmentos a nivel industrial (Abadía-Piquero, 2010).

La fermentación bacteriana ha sido sugerida como una alternativa tecnológica para el pre-tratamiento de desechos de camarones, teniendo la ventaja de permitir la recuperación de menos enzimas y proteínas desnaturalizadas en la quitina, así como pigmentos (Marcia et al., 2011).

3.2.1 Obtención del quitosano

El principal criterio para el quitosano de la quitina, es la solubilidad en soluciones ácidas diluidas obtenidas cuando la fracción residual de acetil es baja. El quitosano se puede obtener por 2 vías:

- Química (desacetilación heterogénea u homogénea)
- Enzimática

Para obtener un producto soluble, este debe tener un grado de desacetilación entre 80 y 85% o mayor, y el quitosano se conoce como un producto que tiene generalmente entre un 70 y un 85% de desacetilación (Abadía-Piquero, 2010).

3.3 Propiedades de la Quitina y Quitosano

3.3.1 Grado de acetilación (GA)

Químicamente, la quitina y el quitosano son poliglucosaminas que son distinguidas solamente por el grado de la acetilación de los grupos amino. Las quitinas típicas tienen generalmente grado de acetilación entre 70-95% que corresponde a un contenido de acetilo de un 15.0-20.7% mientras que el quitosano tiene comúnmente un grado de acetilación entre 15-25% que corresponde 3.2 - 5.3 % del contenido de acetilo. El grado de acetilación es probablemente el parámetro más importante de estos polisacáridos y determina grandemente sus características funcionales y fisiológicas (Abadía-Piquero, 2010).

Los factores que afectan el grado de la desacetilación incluyen: concentración del álcali, tratamiento previo, tamaño de partícula, y la densidad de la quitina. Los últimos dos factores afectan el índice de penetración del álcali en la región amorfa y en cierto grado también en las regiones cristalinas del polímero, necesitadas para que la hidrólisis ocurra. En la práctica, el nivel máximo de desacetilación que se puede alcanzar en un solo tratamiento alcalino es cerca de 75-85%.

El grado de acetilación es muy importante para obtener un producto soluble, aunque también influye la distribución de los grupos acetilo (Abadía-Piquero, 2010).

3.3.2 Peso molecular y viscosidad

Otros parámetros importantes son el peso molecular y la viscosidad asociada. Como el quitosano es obtenido de la quitina por desacetilación alcalina, el peso molecular tiene un promedio más bajo al extenderse generalmente entre $1 \times 10^5 - 3 \times 10^5$ Da¹. El quitosano exhibe una amplia gama de viscosidades en los medios ácidos diluidos que dependen principalmente de su peso molecular. La viscosidad relativa es comparable con la viscosidad de las gomas guar o del tragacanto (Abadía-Piquero, 2010).

¹ El Dalton (Da), es usado a veces como unidad de la masa molar, especialmente en bioquímica, con la definición 1 Da = 1 g/mol,

El quitosano es un producto altamente viscoso similar a las gomas naturales. La viscosidad puede variar de 10 a 5000cp. En solución, debido a su comportamiento polielectrolítico, en dependencia de la fuerza iónica del medio, se comporta de manera diferente, lo cual influye notablemente en la viscosidad de la disolución. Debido a la alta viscosidad del quitosano en sistemas de $\text{pH} < 5.5$ puede emplearse como espesante, estabilizante o agente de dispersión.

La quitina microcristalina producida por hidrólisis controlada de ácido puede ser conveniente para el uso como estabilizante y espesante en alimentos. La viscosidad y la estabilidad de la emulsión de la quitina microcristalina es de 10 a 20 veces mayor que la de la celulosa cristalina lo que lo hace conveniente para los usos en mayonesa, mantequilla de cacahuete y otros alimentos tipo emulsión (Abadía-Piquero, 2010).

3.3.3 Solubilidad

Como en la quitina, el grado de cristalinidad y la estructura molecular son los factores dominantes de la solubilidad subyacente, la fuerza mecánica, y otras características funcionales del quitosano.

La solubilidad y la viscosidad del quitosano dependen del grado de desacetilación y degradación del polímero, pero también puede verse incrementada por la adición de formaldehído, cloruros de acilo, anhídridos de ácidos o sales de metales alcalinos. Esto es debido al entrecruzamiento de cadenas que da lugar a un polímero de mayor peso molecular; estas soluciones acuosas resultantes no pueden ser dispersadas ni disueltas por adición de agua (Abadía-Piquero, 2010)

Mientras que la quitina es insoluble en los solventes comunes, el quitosano es soluble en ácidos minerales y orgánicos diluidos. El quitosano no es soluble a $\text{pH} > 6.0$ y funciona solamente en sistemas ácidos, siendo una propiedad relevante para su aplicación en alimentos. Debido a la alta densidad de cargas positivas el quitosano se comporta en soluciones ácidas acuosas como una molécula policationica. Este comportamiento no es típico para la quitina debido a su alto grado de acetilación.

El quitosano es insoluble en H_2SO_4 y de solubilidad limitada en H_3PO_4 . Además, es soluble en mezclas de alcohol y agua (Abadía-Piquero, 2010).

3.3.4 Biodegradabilidad

Como un polímero de interés en sistemas alimenticios, la biodegradación de la quitina y el quitosano es una propiedad importante para ser considerada porque muchas de las aplicaciones en alimentos se relacionan directa o indirectamente con la capacidad de las enzimas para despolimerizarse.

Entre las enzimas (o complejo enzimático) que han sido reportados para ejercer actividad hidrolítica en la quitina y la quitosana se encuentran: quitinasa, quitosanas, lisozima, celilasa, hemicelulasa, pectinasa, lipasa, dextranasa e iguales proteasas tales como pancreatina, pepsina y papaina. Solamente la biodegradabilidad no es una característica relevante de estos

biopolímeros, también la no toxicidad de la degradación de los productos, es lo más significativo para las aplicaciones biomédicas y alimenticias (Abadía-Piquero, 2010).

El quitosano es bioabsorbible y biodegradable, y se ha demostrado que es lentamente degradada principalmente por las enzimas quitosinasas y lisozimas; con las primeras, la biodegradación sucede hasta en un 75%, y hasta en un 35% con lisozimas (Abadía-Piquero, 2010).

3.3.5 Propiedades funcionales

El quitosano puede formar espumas, emulsiones, geles con polianiones, y retener humedad por la presencia de los grupos amino libres que al disolverse en solución acuosa acidificada adquieren carga positiva. En relación a la capacidad del quitosano para formar espuma se ha demostrado que el quitosano realza la capacidad de formación de espuma y la estabilidad de la espuma formada por el huevo, debido a su carga positiva que interactúa con la carga negativa de las proteínas del huevo. Además se ha documentado que el quitosano de bajo peso molecular promueve eficazmente la formación de espuma.

En un estudio realizado en mezclas de aislado de suero y quitosano se mostró un mejoramiento de las propiedades de la espuma con quitosano entre 0.4 y 0.6% y dentro de un estrecho rango de pH (5.5 – 6.0) (Gaffrey, 2014).

Una mezcla de quitosano y lecitina fue utilizada para formar emulsiones y evaluar sus propiedades, obteniéndose una emulsión estable, de pequeños glóbulos grasos con grandes cargas positivas, debido a la adsorción de quitosano a la superficie de las gotas de grasa. Esto demostró la capacidad del quitosano para formar emulsiones.

La estabilidad de la emulsión depende de la concentración de la solución del quitosano. En un estudio realizado cuando la concentración de la solución del quitosano fue de 0.2%, se produjo una separación de fases para todos los valores del rango de desacetilación (75-95%) estudiado. La estabilidad de la emulsión se incrementó en un 10% al adicionar 0.1% de quitosano en estudios realizados para demostrar su efecto sobre la capacidad emulsionante de la yema de huevo; además incrementó la viscosidad de la mayonesa sin variar las propiedades sensoriales de la misma (Gaffrey, 2014).

Se ha demostrado que el quitosano es capaz de formar geles en solución con excelentes propiedades. La presencia de quitosano disminuye la sinéresis del gel debido a su capacidad de retención de agua, variando sus propiedades mecánicas. La pérdida de agua es menor mientras mayor sea el tamaño de la molécula; adsorbe de 230-440% de agua, superando el almidón de papa y a la carboximetilcelulosa (CMC).

Otras propiedades descritas han sido baja toxicidad, afinidad hidrófila, estabilidad frente a la putrefacción, moldeable y modelable (Gaffrey, 2014).

3.3.6 Propiedades antimicrobianas

Se ha reportado que el quitosano controla el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras y ha sido aplicada para suprimir estos organismos en tejidos de plantas y alimentos. Al tener un ion positivo con una base amino (NH_2) atrae moléculas cargadas negativamente; su actividad antibacteriana ha sido explicada por el entrecruzamiento entre un quitosano poli-catiónica y los aniones presentes en la superficie bacteriana, provocando alteraciones en la permeabilidad de la pared celular (Morey-Rodríguez et al., 2012).

Esta propiedad del quitosano se evidenció en un estudio realizado en mayonesa pues disminuyó perceptiblemente el conteo de células viables de microorganismos deteriorantes como el *Lactobacillus fructivorans* y *Zygosaccharomyces bailii* durante el almacenamiento a 25°C. Estos resultados sugieren puede ser utilizado como preservante de alimentos para inhibir el crecimiento de dichos microorganismos.

Se ha demostrado la susceptibilidad de la *Salmonella typhimurium* en glutamato y lactato de quitosana en bufer de fosfato (pH=5.8) a 32 °C. Además actúa sobre la *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* y *Sacharomyces cerevisiae* (Morey-Rodríguez et al., 2012).

También se ha utilizado quitosano en salchichas, como sustituto del nitrito, para inhibir bacterias; observándose que cuando se utilizó 0.2% de quitosano (con peso molecular de 120 KDa) y 50% de niveles normales de nitrito en salchichas, el efecto preservante fue similar a aquellas salchichas que contenían todo el nitrito. El mayor crecimiento bacteriano fue inhibido al 80% por 0.01-0.2% de quitosano (Morey-Rodríguez et al., 2012).

Los efectos del quitosano en levaduras y hongos filamentosos asociados con el deterioro del jugo de manzana han sido estudiados. Se redujo la velocidad de crecimiento de varios microorganismos pero el efecto fue determinado por su concentración. Por ejemplo 1g/L de quitosano redujo la velocidad de crecimiento del *Mucor racemosus* y sin embargo, 5g/L fueron requeridos para completar la inhibición del crecimiento de *Byssochiamys spp.* La levadura más sensible fue *Zygosaccharomyces bailii* y no creció en presencia de 0.1 g/L de quitosano durante el almacenamiento por 32 días a 25°C (Morey-Rodríguez et al., 2012).

El efecto del quitosano en el desarrollo del deterioro de empanadas de picadillo de carne de vaca almacenadas a 30°C por 2 días y a 4°C por 10 días fue investigado, mostrando una reducción de 1 a 2 ciclos logarítmicos de pseudomonas, estafilococos, coliformes, bacterias gram-negativas y micrococos en presencia de 1% de quitosano. Sin embargo, el número de organismos viables presentes en la carne antes de comenzar el experimento fue generalmente mayor (>107 UFC/g) y es posible que la adición de quitosano habría podido ser más eficaz teniendo poblaciones iniciales más bajas.

Las inmersiones en quitosano han sido investigadas como un posible medio para extender la vida de anaquel post cosecha de frutas frescas y vegetales. Por ejemplo, en fresas frescas y pimientos campana sumergidas en soluciones ácidas de quitosano, inoculadas con *Botrytis*

cinérea o *Rhizopus stolonifer*, ha sido reportada una resistencia al deterioro a 13°C igual que las frutas tratadas con un fungicida químico convencional.

El quitosano es usado como un preservante de alimentos en alimentos en Japón, en productos tales como tallarines, salsa de soja, col china y sardinas.

3.3.7 Propiedades biológicas. Efectos dietéticos y metabólicos

Un estudio en ratas demostró que el quitosano reduce la absorción de ácidos biliares y disminuye los niveles de colesterol en sangre. La absorción del colesterol en ratas alimentadas con una dieta con quitosano fue más baja que las dietas que contenían goma guar o celulosa.

Un pequeño estudio en humanos mostró que la ingesta de 3-6g de quitosano por día durante 2 semanas reduce los indicadores de putrefacción en los intestinos, un cambio que puede ayudar a prevenir enfermedades como el cáncer de colon.

El quitosano de bajo peso molecular, al ser absorbida, tiene otros efectos beneficiosos en el organismo como la regeneración del tejido conectivo, ayuda a la formación de los huesos, evita la aparición de tumores, estimula el sistema inmunológico, entre otros.

Los posibles efectos nocivos de un producto con exceso de quitosano (sobre el 5%) incluyen el deterioro de nutrientes esenciales tales como vitaminas liposolubles, ácidos grasos esenciales, y minerales. También se ha observado que el exceso de quitosano da lugar a trastornos físicos del tracto intestinal, como abrasión mecánica (Morey-Rodríguez et al., 2012).

3.4 Aplicaciones de la quitina y quitosano

Por sus naturalezas catiónica en soluciones ácidas, que le confiere propiedades únicas relativas a otros polisacáridos, la industria del quitosano y algunos de sus derivados se ha estimulado internacionalmente, encontrándose un amplio universo de aplicaciones (Morey-Rodríguez et al., 2012).

3.4.1 Aplicaciones biomédicas

Este biomaterial ha sido ensayado para múltiples aplicaciones biomédicas, facilitando el proceso de cicatrización en heridas, lesiones por quemaduras y la recuperación de lesiones cutáneas crónicas; sus efectos han sido asociados con la activación de macrófagos, estimulación de fibroblastos activación mitogénica y facilitación de adhesión intercelular (Morey-Rodríguez et al., 2012).

3.4.2 Aplicación en la agricultura y operaciones post cosecha

En la agricultura, su aplicación potencial se basa en su doble cualidad de inhibir el crecimiento in vitro de hongos y bacterias Fito patógenas, así como activar mecanismos de defensa en las plantas estrechamente relacionados con la inducción de resistencia sistémica al ataque de microorganismos. Estos usos vienen dados fundamentalmente por su alto contenido

de aminos, que le confiere una naturaleza policatiónica de alta densidad de carga, además de su elevada masa molecular (Morey-Rodríguez et al., 2012).

Se ha demostrado que el quitosano es un poderoso inhibidor fúngico, además induce a una mejor germinación y producción de la cosecha en trigo. Además, en experimentos a sembrados en localidades con severa inducción de *Fusarium* amarillo en apio, la incidencia de la enfermedad y la severidad fueron reducidos significativamente.

3.4.3 Tratamiento de aguas residuales

Entre las diversas aplicaciones documentadas para el quitosano, su uso como agente coagulante o floculante para el tratamiento de aguas residuales es el más importante desde el punto de vista económico. La eliminación de colores, metales pesados, materiales radioactivos y taninos es también factible usando quitosano (Morey-Rodríguez et al., 2012).

3.4.4 Industria cosmética

Se emplea en la elaboración de cremas humectantes, limpiadoras, pasta de dientes, lociones de baño, etc. (Morey-Rodríguez et al., 2012).

3.4.5 Industria alimenticia

En la industria alimenticia se han reportado múltiples aplicaciones entre las que se encuentran: Des-acidificación y clarificación de jugos (Morey-Rodríguez et al., 2012).

- Industria panadera.
- Como agente antimicrobiano.
- Empleo en alimentos dietéticos
- Como emulsificante
- Como preservante
- Como aditivos
- Películas comestibles
- Microencapsulación
- Bebidas y vinos.

La quitina desacetilada parcialmente con variados niveles de N-acetilación ($GA = 0.49 - 1.0$, insoluble en solución ácida), ha sido utilizada como un material adsorbente de intercambio de ion para clarificar jugo de pina ultra filtrado. Muestras de quitina con menor GA removieron cuerpos de colores indeseables responsables del desarrollo de la coloración. El quitosano ha sido también usado acertadamente para evitar la coloración de jugo de manzana a niveles de 200 ppm o más.

La eliminación de componentes fenólicos (catequinas, flavinas, ácidos cinnámicos, etc) del vino blanco los cuales son responsables de las alteraciones del bronceado y de la maderización, es una operación importante para estabilizar el producto. Esto es normalmente alcanzado por clarificación con materiales adsorbentes (albúmina de huevo, sílica, bentonita y pivinipirrolidona). En estudio reciente, el quitosano ($GA = 0.22 - 0.4$) fue un adsorbente

efectivo de componentes polifenólicos y ácido hidroxicinámico tanto como el caseinato comercial y polivinilpirrolidona (PVP) (Morey-Rodríguez et al., 2012).

3.4.5.1 Microencapsulación de enzimas alimenticias

En la industria alimenticia, la microencapsulación puede ser empleada para enmascarar organolépticamente el gusto amargo y olores desagradables en alcaloides, sales o aceites de pescado. El material encapsulado debe satisfacer, entre otros, los siguientes requerimientos: buena calidad sensorial, poseer estabilidad físico química y microbiana, libre de residuos tóxicos, seguro para la salud y no contaminante.

El quitosano es un biopolímero natural que cumple con esos requerimientos y ha sido usada como aditivo alimentario y como componente en cubiertas de comestibles (Casp-Vanaclocha, 2003).

5.4.5.2 Inmovilización de células y enzimas

Tales sistemas tienen perspectivas prometedoras debido a la relevante gama de aplicaciones especializadas en sistemas alimenticios. Las enzimas inmovilizadas ofrecen la posibilidad de conservar su actividad en solventes orgánicos. Otra ventaja intrínseca de inmovilizar las enzimas, es que pueden ser reutilizadas muchas veces.

La quitina ha sido estudiada por ser un buen soporte para inmovilización de enzimas, según parece ofrece una alta estabilidad mecánica, apropiada densidad y baja solubilidad en muchos solventes. Ejemplos de enzimas industriales de alto uso en la industria de los alimentos las cuales han sido inmovilizadas en quitina o quitosano, incluyen α -amilasa y glucoamilasa, D-glucosa isomerasa, α -D-galactosidasa, p-galactosidasa, papaina, pepsina, alfa quimotripsina. La dosis de quitosano como un componente funcional (espesante, emulgente, goma alimentaria) generalmente no excede el 0.5% de la masa del producto (Casp-Vanaclocha, 2008).

5.4.5.3 Aditivos

Pueden ser incorporados materiales dentro de las películas e influencias en las propiedades mecánicas, sensoriales y protectoras. También pueden incrementar las propiedades organolépticas y nutricionales en el alimento, se pueden incorporar agentes saborizantes, pigmentos o aditivos nutricionales (Yu-Hernández, 2004).

Los aditivos pueden ser:

- Plastificantes (ceras, aceites ácidos grasos)
- Conservadores químicos (ácido benzoico, ácido sorbico)
- Surfactantes y emulsificantes (grasas y aceites)

3.5 Microbiología de los alimentos

Desde el momento en que el alimento se cosecha, se recoge o se sacrifica, comienza a pasar por una serie de etapas de descomposición progresiva. Según el alimento esta descomposición puede ser muy lenta como en el caso de semillas y nueces, o puede ser tan rápida que puede volver prácticamente inutilizable un alimento en pocas horas (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

En los tejidos de los organismos vivos, sus componentes están en equilibrio dinámico por el tipo de organismo o por el tipo de metabolismo y por el medio ambiente. Los cambios bioquímicos que se producen en dicho organismo vivo son extremadamente importantes, puesto que afecta la conservación final relacionada con la calidad del alimento.

Desde el punto de vista de la conservación interesan únicamente aquellos cambios que se producen en los alimentos cuando sus procesos bioquímicos han perdido su naturaleza original, por lo que en consecuencia se ha destruido su balance metabólico y se alteran las secuencias normales de las reacciones enzimáticas.

Tabla 3.1 Vida útil de almacenamiento de tejidos vegetales y animales.

Producto	Días de almacenamiento a 21°C
Carne	1-2
Pescado	1-2
Aves	1-2
Frutas	1-7
Frutas secas	360 y mas
Hortalizas de hojas verdes	1-2
Raíces	7-20
Semillas secas	360 y mas

Fuente: Casp-Vanaclocha y Abril-Requena (2003).

El deterioro de los alimentos presenta un carácter diferente dependiendo del tipo de cambio que intervengan: cambios no microbianos internos o externos o cambios producidos por microorganismos. Los cambios bioquímicos no microbianos, pueden ser perceptibles o no por los sentidos del consumidor.

En los alimentos se producen cambios de naturaleza bioquímica que al consumidor no puede percibir visualmente, olfativamente, etc. y que solo pueden detectarse por medidas del laboratorio. Así el valor nutricional de algunos componentes pueden ser seriamente afectados, tales como cambios que incluyen la pérdida de azúcares, la variación en el contenido y composición de sustancia nitrogenadas, gradual oxidación y pérdida de vitamina. Estos cambios se producen por la respiración en la post-cosecha de frutas y hortalizas.

Los cambios que pueden ser percibidos sensorialmente por el consumidor incluyen la decoloración y cambios en el sabor, aroma y consistencia. La decoloración se pone de manifiesto por oscurecimiento no deseables, con modificaciones de color rojo hacia el marrón o el violeta,

del verde hacia el amarillo. El sabor y aroma, o palatabilidad pueden llegar a desaparecer completamente, ya que las temperaturas elevadas favorecen la desaparición de sustancias volátiles y componentes aromáticos del producto. La descomposición de las proteínas y enranciamiento de las grasas son a su vez la causa de la aparición de olores y sabores extraños.

Varios de los cambios no microbianos perceptibles, especialmente los que ocurren cuando el tejido vivo deja de serlo, facilitan la propagación de los microorganismos; por lo tanto, cuando se procesan los alimentos no solo deben de ser protegidos de la contaminación microbiana sino que también se deben eliminar los cambios no microbianos indeseables.

Los microorganismos de varios tipos, producen los cambios indeseables más graves en los alimentos perecederos. Se producen pérdidas substanciales de nutrientes y considerables cambios en las características externas los microorganismos representan el agente más temible de alteración del alimento, el más activo debido a sus elevadísimas velocidades de reproducción en condiciones adecuadas. Están dotados de una carga enzimática notablemente desarrollada, de forma que se puede decir que no existen los alimentos compuestos que no sea atacado y degradado por al menos una especie microbiana (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

Las causas responsables de la aparición de estos cambios, se traducen en fenómenos de alteración que se pueden clasificar:

- **Físicas:** pueden aparecer durante la manipulación, preparación, preservación o conservación de los productos y en general no perjudican por sí sola a la comestibilidad del alimento pero sí a su valor comercial.
- **Químicas:** se manifiesta durante el almacenamiento de los alimentos, pero su aparición no es debida a la acción de enzimas son alteraciones más graves que las anteriores y con frecuencia pueden perjudicar la comestibilidad del producto.
- **Biológicas:** son sin duda más importantes a su vez se pueden subdividir en:
 - o **Enzimáticas:** por acción de enzimas propias del alimento por ejemplo la senescencia de las frutas.
 - o **Parasitarias:** debidas a la infestación por insectos, roedores, pájaros, etc. Importantes no solo por las pérdidas económicas que suponen los productos consumidos o dañados por ellos sino por el hecho de que dañan al alimento y lo ponen a disposición de infecciones provocadas por microorganismos.
 - o **Microbiológicas:** debidas a la acción de microorganismos que son responsables de las alteraciones más frecuentes y más graves.

Generalmente en el deterioro de los alimentos intervienen simultáneamente varias de las causas citadas, por ejemplo las causas físicas y las parasitarias abren el camino a la intervención de causas microbiológicas así mismo suelen actuar conjuntamente las causas químicas y biológicas.

3.6 Generalidades del Tomate

El tomate ocupa un lugar preponderante con relación al desarrollo económico y social de la agricultura a nivel mundial, reportándose que requiere de 140 jornales por hectárea.

El jitomate es una planta nativa de América Tropical, cuyo origen se localiza en la región de los Andes (Chile, Colombia, Ecuador, Bolivia y Perú) y donde se encuentra la mayor variabilidad genética y abundancia de tipos silvestres. (CIDH) (2016).

3.6.1 Morfología y taxonomía

Familia: Solanaceae.

Nombre científico: *Lycopersicon sculentum* Mill.

Planta: perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual. Puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta. Existen variedades de crecimiento limitado (determinadas) y otras de crecimiento ilimitado (indeterminadas).

La planta de tomate no es muy exigente en cuanto a suelos, excepto en lo que se refiere al drenaje, aunque prefiere suelos sueltos de textura silíceoarcillosa y ricos en materia orgánica. No obstante se desarrolla perfectamente en suelos arcillosos enarenados. (CIDH) (2016).

3.6.2 Principales tipos de tomate comercializados:


- **Tipo Beef.** Plantas vigorosas hasta el 6º-7º ramillete, a partir del cual pierde bastante vigor coincidiendo con el engorde de los primeros ramilletes. Frutos de gran tamaño y poca consistencia. Producción precoz y agrupada. Cierre pistilar irregular. Mercados más importantes: mercado interior (zona de Andalucía), mercado exterior (EEUU).
- **Tipo Marmande.** Plantas poco vigorosas que emiten de 4 a 6 ramilletes aprovechables. El fruto se caracteriza por su buen sabor y su forma acostillada, achatada y multilocular.
- **Tipo Vemone.** Plantas finas y de hoja estrecha, de porte indeterminado y marco de plantación muy denso. Frutos de calibre G que presentan un elevado grado de acidez y azúcar, inducido por el agricultor al someterlo a estrés. Su recolección se realiza en verde pintón marcando bien los hombros. Son variedades con pocas resistencias a enfermedades que se cultivan con gran éxito en Cerdeña (Italia).
- **Tipo Moneymaker.** Plantas de porte generalmente indeterminado. Frutos de calibres M y MM, lisos, redondos y con buena formación en ramillete.
- **Tipo Cocktail.** Plantas muy finas de crecimiento indeterminado. Frutos de peso comprendido entre 30 y 50 g, redondos, generalmente con 2 lóculos, sensibles al rajado


y usados principalmente como adorno de platos. También existen frutos aperados que presentan las características de un tomate de industria debido a su consistencia, contenido en sólidos solubles y acidez, aunque su consumo se realiza principalmente en fresco. Debe suprimirse la aplicación de fungicidas que manchen el fruto para impedir su depreciación comercial.

- **Tipo Cereza (Cherry).** Plantas vigorosas de crecimiento indeterminado. Frutos de pequeño tamaño y de piel fina con tendencia al rajado, que se agrupan en ramilletes de 15 a más de 50 frutos. (CIDH) (2016).


3.6.3 Enfermedades

3.6.3.1 Enfermedades producidas por hongos

 **Oidiopsis:** *Leveillula taurica* (Lev.) Arnaud. Es un parásito de desarrollo semi interno y los conidióforos salen al exterior a través de los estomas. En Almería es importante en los cultivos de pimiento y tomate y se ha visto de forma esporádica en pepino. Los síntomas que aparecen son manchas amarillas en el haz que se necrosan por el centro, observándose un fieltro blanquecino por el envés. En caso de fuerte ataque la hoja se seca y se desprende. Las solanáceas silvestres actúan como fuente de inóculo. Se desarrolla a 10-35 °C con un óptimo de 26 °C y una humedad relativa del 70 %.


 **Podredumbre gris:** *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetrel. ASCOMYCETES: HELOTIALES. Anamorfo: *Botrytis cinerea* Pers.

Parásito que ataca a un amplio número de especies vegetales, afectando a todos los cultivos hortícolas protegidos de Almería y que puede comportarse como parásito y saprofito. En plántulas produce Damping-off. En hojas y flores se producen lesiones pardas. En frutos se produce una podredumbre blanda (más o menos acuosa, según el tejido), en los que se observa el micelio gris del hongo. Las principales fuentes de inóculo las constituyen las conidias y los restos vegetales que son dispersados por el viento, salpicaduras de lluvia, gotas de condensación en plástico y agua de riego. La temperatura, la humedad relativa y fenología influyen en la enfermedad de forma separada o conjunta. La humedad relativa óptima oscila alrededor del 95 % y la temperatura entre 17 °C y 23 °C. Los pétalos infectados y desprendidos actúan dispersando el hongo.

 **Podredumbre blanca:** *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary. ASCOMYCETES: HELOTIALES. Anamorfo: no se conoce.


Hongo polífago que ataca a todas las especies hortícolas cultivadas en Almería. En plántulas produce Damping-off. En planta produce una podredumbre blanda (no desprende mal olor) acuosa al principio que posteriormente se seca más o menos según la succulencia de los tejidos afectados, cubriéndose de un abundante micelio algodonoso blanco, observándose la presencia de numerosos esclerocios, blancos al principio y

negros más tarde. Los ataques al tallo con frecuencia colapsan la planta, que muere con rapidez, observándose los esclerocios en el interior del tallo. La enfermedad comienza a partir de esclerocios del suelo procedentes de infecciones anteriores, que germinan en condiciones de humedad relativa alta y temperaturas suaves, produciendo un número variable de apotecios.

 **Mildiu:** *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. OOMYCETES: PERONOSPORALES.

Este hongo es el agente causal del Mildiu del tomate y de la patata, afectando a otras especies de la familia de las solanáceas. En tomate ataca a la parte aérea de la planta y en cualquier etapa de desarrollo. En hojas aparecen manchas irregulares de aspecto aceitoso al principio que rápidamente se necrosan e invaden casi todo el foliolo. Alrededor de la zona afectada se observa un pequeño margen que en presencia de humedad y en el envés aparece un fieltro blancuzco poco patente. En tallo, aparecen manchas pardas que se van agrandando y que suelen circundarlo. Afecta a frutos inmaduros, manifestándose como grandes manchas pardas, vítreas y superficie y contorno irregular. Las infecciones suelen producirse a partir del cáliz, por lo que los síntomas cubren la mitad superior del fruto. Las fuentes de inóculo primario son desconocidas en Almería. La dispersión se realiza por lluvias y vientos, riegos por aspersión, rocíos y gotas de condensación. Las condiciones favorables para su desarrollo son: altas humedades relativas (superiores al 90 %) y temperaturas entre 10 °C y 25 °C. Las cepas existentes son: T0.0 (ataca sólo a patata), T.0 (ataca a variedades de tomate sin resistencia) y T.1. (ataca a las líneas de tomate con Gen Ph1). Existen variedades de tomate con Gen Ph2, pero su protección no es total. (CIDH) (2016).

3.6.3.2 Enfermedades producidas por bacterias

 **Mancha negra del tomate:** *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (Okabe) Young et al.

Afecta a todos los órganos aéreos de la planta. En hoja, se forman manchas negras de pequeño tamaño (1-2 mm de diámetro) y rodeadas de halo amarillo, que pueden confluir, llegando incluso a secar el foliolo. En tallos, peciolos y bordes de los sépalos, también aparecen manchas negras de borde y contorno irregular. Las inflorescencias afectadas se caen. Tan sólo son atacados los frutos verdes, en los que se observan pequeñas manchas deprimidas. Las principales fuentes de infección las constituyen: semillas contaminadas, restos vegetales contaminados y la rizosfera de numerosas plantas silvestres. El viento, la lluvia, las gotas de agua y riegos por aspersión disemina la enfermedad que tiene como vía de penetración los estomas y las heridas de las plantas. Las condiciones óptimas de desarrollo son temperaturas de 20 a 25 °C y períodos húmedos. (CIDH) (2016).

3.7 Factores que intervienen en la alteración de los alimentos

Sobre estas causas de deterioro de los alimentos influyen una serie de factores ambientales (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.7.1 Temperatura

Independientemente de su efecto sobre los microorganismos, el frío y el calor, no controlados pueden causar deterioro de los alimentos. Dentro de la escala moderada de temperatura en la que se manejan los alimentos, de 10 a 38°C, para cada aumento de 10°C se duplica aproximadamente la velocidad de las reacciones químicas, incluyendo las velocidades tanto de las reacciones enzimáticas como de las no enzimáticas.

Tabla 3.2 Sensibilidad de Frutas y Hortalizas a bajas temperaturas

Producto	Temp.	Daños Si 0°C < T Alm. < Temp.
Manzanas	1-2	Ennegrecimiento interno
Aguacates	7	Ennegrecimiento interno
Plátanos	13	No toma color al madurar
Pepinos	7	Áreas acuosa, descomposición
Berenjenas	7	Manchas doradas, depresiones en la piel
Limones	13-14	Depresiones en la piel, decoloración interna
Melones	5-10	Depresiones en la piel, descomposición superficial
Sandias	2	Depresiones en la piel, mal sabor
Naranjas	1,5-2,5	Depresiones en la piel, desecación interna
Pimientos	7	Decoloración cerca del cáliz
Tomates Verdes	13	No toma color al madurar
Tomates Maduros	10	Rotura de los tejidos

Fuente: Casp-Vanaclocha y Abril-Requena (2003).

3.6.1.1 Clasificación de los microorganismos según su medio de crecimiento

Psicrófilos: son los organismos capaces de vivir por debajo de los 5° C, sus temperaturas de mínimas de desarrollo van de -5 a 5° C, sus temperaturas óptimas se encuentran entre 12 y 15°C y sus temperaturas máximas de desarrollo son de 15 a 20° (Láñez, 2005).

Existen dos tipos de psicrófilos:

- **Psicrófilos obligados.** Su temperatura óptima está en torno a los 15-18 °C, aunque viven perfectamente a cero grados e incluso a temperaturas más baja, Hay algunos cuya temperatura óptima es aún más baja, los **psicrófilos extremos**; un ejemplo es *Polaromonas vacuolata*, que vive en las aguas de la Antártida, su temperatura óptima es de 4 °C y no sobrevive por encima de 14 °C.

- **Psicrófilos facultativos.** Como su nombre indica, tienen la facultad de resistir el frío, pero su temperatura óptima es más alta, en torno a los 20-30 °C. Estos organismos son los culpables de que los alimentos se estropeen en los frigoríficos.

Mesófilos: se refiere a un organismo cuya temperatura de crecimiento óptima está entre los 15 y los 35 °C (un rango considerado moderado).

El hábitat de los organismos mesófilos incluye el suelo, el cuerpo de un animal, etc. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en los 37 °C, la temperatura normal de un cuerpo humano.

Termófilos: El término **termófilo** se aplica a organismos vivos que pueden soportar condiciones extremas de temperatura relativamente altas, por encima de los 45°C. Se cree que se desarrollaron en sitios con actividad volcánica (como géiseres) en las dorsales oceánicas. Se caracterizan por tener una membrana celular rica en lípidos saturados ya que contienen enzimas que les permiten trabajar en condiciones extremas.

Los termófilos sobreviven en temperaturas con un mínimo de 20 °C y un máximo de 75 °C, mientras que las hipertermófilas soportan temperaturas superiores a 75 °C, llegando incluso a superar a veces los 100 °C, siempre que exista agua en estado líquido, como ocurre en las profundidades oceánicas, donde la presión es elevada.

3.7.2 Humedad y Sequedad

Muchos productos son sensibles a la presencia de agua física en su superficie, producidas por la condensación de agua a cambios de temperatura. Esta agua puede producir hidropatías que habitualmente llevan a la aparición de manchas y otros defectos superficiales (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.7.3 Aire y oxígeno

Además de los efectos que el oxígeno tiene sobre el desarrollo de los microorganismos, el aire y el oxígeno ejerce efectos destructores sobre las vitaminas (particularmente A y C), sobre los colores, los sabores y otros componentes de los alimentos. La acción química del oxígeno del aire sobre los pigmentos de las carnes y otros productos cárnicos es de dos tipos. Oxigenación y oxidación (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

La oxigenación o fijación inestable del oxígeno sobre la mioglobina y la hemoglobina para dar Oximioglobina y Oxihemoglobina, es el origen de la vivacidad del color rojo de la carne

El oxígeno interviene también en la oxidación de las grasas, produciendo efectos variables en función de la naturaleza de las grasas y de su estado. Los ácidos grasos insaturados son más sensibles cuando están libres, su grado de instauración aumenta su sensibilidad y la velocidad de oxidación.

El oxígeno interviene además en las actividades metabólicas de las células vegetales y animales, entre las cuales la más importantes son la respiración, biosíntesis de etileno (en el caso de los vegetales) y en los procesos de oxidación catalizados por polifenol-oxidasas y que tienen lugar entre el oxígeno y un sustrato fenólico. El oxígeno se puede eliminar aplicando vacío arrastrándolo por medio de un gas inerte (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.7.4 Luz

La luz es responsable de la destrucción de algunas vitaminas particularmente la ribloflavina, vitamina “A” y “C”, además puede deteriorar los colores de muchos alimentos. Los alimentos que tienen sensibilidad a la luz pueden ser fácilmente protegidos contra ellos por medio de envases que no permitan su paso (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.8 Principales causas de alteración de los alimentos

Las causas de alteración de los alimentos pueden ser de naturaleza física, química y biológica, también se ha indicado que las causas físicas y las parasitas, incluidas dentro de las biológicas son importantes porque abren el camino al ataque de microorganismos en consecuencia las causas más comunes de alteración de los productos alimentarios son de naturaleza biológica y estas, sin duda la más importante por los daños económicos producidos son los microorganismos y las enzimas naturales de los alimentos (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.8.1 Causas Químicas

Entre las reacciones químicas que conducen al deterioro de los alimentos existen dos particularmente importante: el pardeamiento no enzimático y el enranciamiento de las grasas.

3.8.1.1 Pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard)

Se incluyen una serie de reacciones muy complejas por medio de las cuales, y en determinadas condiciones los azúcares reductores pueden reaccionar con las proteínas y producir una serie de pigmentos de color pardo-oscuro y unas modificaciones en olor y sabor de los alimentos, que en algunos casos son deseables (asados, tostados y frituras) y otros indeseables (colores oscuros que se desarrollan durante el almacenamiento) (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

El nombre de pardeamiento no enzimático sirve para diferenciarlo del pardeamiento enzimático, rápido, que se observa en las frutas y hortalizas como consecuencias de su oxidación, el pardeamiento no enzimático se presenta durante procesos tecnológicos o de almacenamiento de diversos alimentos. Se acelera por el calor y por lo tanto se causa en las operaciones de cocción, pasteurización, esterilización y deshidratación.

El pardeamiento no enzimático es debido a una reacción que tiene lugar entre un grupo aldehído o cetona, procedente de los azúcares reductores y grupos amino de aminoácidos o proteínas, va acompañado por una reducción de la solubilidad de las proteínas, una disminución del valor nutritivo y la producción de sabores extraños (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

El pardeamiento de Maillard incluye una serie de reacciones en la que el desarrollo del color tiene lugar en el último paso del proceso se puede resumir en tres pasos (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003):

Paso inicial (no hay producción de color):

- Condensación azúcar-amino para formar una glucosilamina-N-sustituida. Reacción reversible.
- Re arreglo de Amadori, la glucosilamina se transforma en una aldosamina

Paso intermedio (formación de colores amarillos muy ligeros y producción de olores desagradables)

- Deshidratación de azúcares, se forman derivados del furfural reductoras o dehidrreductoras, dependiendo del pH y la actividad de agua del sistema.
- Fragmentación de azúcares, se forman compuestos alfa-hidroxicarboxilos, glucoaldehidos, gliceraldehidos, piruvaldehidos, acetol, diacetil, etc
- Degradación de Strecker, aminoácidos más dehidroreductoras de 3) dormán aldehídos con un átomo de carbono menos que el aminoácido inicial, mas CO₂.

Paso final (formación de pigmentos):

- Condensación aldólica de compuestos intermedios para formar pigmentos insaturados con propiedades fluorescentes.
- Polimerización de aldehídos con aminas, como consecuencias de las reacciones de Strecker se forman además de los citados aldehídos y CO₂, nuevos compuestos carboxílicos que pueden reaccionar entre sí con los aldehídos o sustancias aminas y producir compuestos volátiles aromáticos deseables o no, tales como pirazinas entre la que se destaca la dimetil pirazina que es por ejemplo el constituyente del aroma de las patatas chips.
- Los pigmentos responsables del color producidos en las fases finales del pardeamiento son las melanoidinas coloidales, si las reacciones de Maillard y Estrecker son muy intensas, no solo producen sabores desagradables sino que dan lugar algunas sustancias potencialmente toxica.

3.8.1.2 Enranciamiento de los lípidos

Las grasas y los aceites son susceptibles a diferentes reacciones de deterioro que reducen el valor nutritivo del alimento y además forman compuestos volátiles que producen olores y sabores desagradables. Estos se deben, por una parte, a que el enlace éster de los acilgliceridos pueden sufrir una hidrolisis química o enzimática y por otra parte a que los ácidos grasos insaturados son sensibles a reacciones de oxidación en términos generales la rancidez se ha utilizado para describir diferentes mecanismos a través de los cuales se alteran los líquidos (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

El grado de deterioro depende del tipo de grasa o aceite, los más susceptibles a estos cambios son los de origen marino seguidos por los aceites vegetales y finalmente por las grasas animales, el deterioro de lípidos se ha dividido en dos grupos de reacciones: Enranciamiento hidrolítico y Enranciamiento oxidativo. El primero se debe básicamente a la acción de lipasas que liberan

ácidos grasos de los triacilglicéridos, mientras que el segundo se refiere a la acción del oxígeno y de las lipoxigenasas sobre las insaturaciones de los ácidos grasos.

3.8.2 Causas Biológicas

Son las más importantes en el deterioro de los alimentos y las de más graves consecuencias entre estas particularmente las producidas por las enzimas naturales de los alimentos y las causadas por microorganismos.

3.8.2.1 Enzimas naturales de los alimentos

Las plantas y los animales tienen sus propias enzimas cuya actividad en gran parte sobreviven a la recolección y el sacrificio, intensificándose con frecuencia a partir de ese momento, debido a que las reacciones enzimáticas son controladas y equilibradas con mucha precisión en la planta o en el animal que vive y funciona normalmente pero este equilibrio se rompe cuando el animal es sacrificado o la planta retirada del campo (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

Si estas enzimas no son activadas siguen catalizando reacciones químicas en los alimentos, algunas de estas reacciones si no se les permite progresar más allá de un cierto límite son muy deseables, por ejemplo la maduración de algunas frutas después de la cosecha y el ablandamiento natural de las carnes, pero más allá del límite óptimo estas reacciones llevan a la descomposición de los alimentos, los tejidos debilitados son atacados por infecciones microbianas.

La célula vegetal, con respecto a la célula animal presenta sistemas enzimáticos específicos, las enzimas que sintetizan y degradan los constituyentes de las paredes celulares (polisacáridos), las enzimas de la vía de la biosíntesis del etileno y las enzimas del ciclo de Calvin, por ejemplo. Los dos primeros sistemas desempeñan un papel importante en el proceso de maduración del vegetal, cuando se alcanza este estado en los procesos de alteración de la célula vegetal esta alteración se manifiesta a nivel macroscópico por un ablandamiento de las frutas o de las hortalizas (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

Los golpes (causa física de deterioro) aceleran el ablandamiento, puesto que destruyen la integridad celular con liberación de hidrolasas contenidas en las vacuolas y porque estimulan la producción de etileno. Así mismo los cristales de hielo formados durante la congelación son perjudiciales para la firmeza de las frutas y de las hortalizas por las mismas razones: liberación de enzimas que hidrolizan las paredes.

A estos sistemas enzimáticos hay que añadir otras enzimas que no son específicas de los vegetales, tales como lipoxigenasa y la polifenoloxidasas, que intervienen en los procesos de post-maduración de los vegetales y cuyos efectos no son deseables (aparición de olores y colores desagradables) y las lipasas que son causantes de lipólisis, enranciamiento lipolítico, muy notable en productos lácteos (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.7.2.2 Efectos del metabolismo de los microorganismos en los alimentos

La acción de los microorganismos en los alimentos tiene como fin la mineralización de materia orgánica, desafortunadamente este largo camino del desarrollo de los microorganismos da lugar a la formación de toda una serie de compuestos siempre más simples, que en la mayor parte de los casos tiene como consecuencia la modificación de las características organolépticas del producto, la aparición de fenómenos de alteración y en consecuencia el alimento deja de ser adecuado para el consumo humano y en algunos casos nocivos para la salud (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

Las vías metabólicas, fundamentalmente pueden reducirse a dos: oxidación y fermentación. Aunque la carga enzimática de los microorganismos es tal que pueden atacar simultáneamente a la mayor parte de los sustratos, las vías metabólicas se exponen separadamente según el grupo principal de sustrato (hidratos de carbono, lípidos, proteínas, etc.) además hay que señalar que los metabolismos formados de la ruptura de un compuesto determinado pueden posteriormente ser metabolizados siguiendo una vía metabólica propia de otro grupo de sustancia (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

Los hidratos de carbono son utilizados por microorganismos esenciales como fuente energética. Generalmente salvo raras excepciones los polisacáridos son primero divididos en monosacáridos, los cuales a su vez son degradados a compuestos de 1,2,3 y 4 átomos de carbono, con excepción de pocas especies microbianas, los monosacáridos son divididos en primer lugar por ácidos pirúvicos, el cual será posteriormente en condiciones aeróbicas oxidado completamente hasta la formación de CO_2 y H_2O o bien en anaerobios en compuestos orgánicos más simples característicos del tipo de fermentación microbiana involucrada.

Según los productos finales obtenidos se pueden distinguir varios tipos de fermentación alcohólica, láctica, etc., la fermentación en condiciones controladas es utilizada para la conservación de alimentos pero también pueden ser causantes de alteraciones (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

Los productos más interesantes de la separación de lípidos son los ácidos grasos, algunos de los cuales específicamente de la cadena corta (ácido acético, propiónico, butírico, caprónico). Pueden producir olores y sabores desagradables, en otros casos estos ácidos pueden formar principios de olores agradables pero anormales como el butirato de tilo (olor de piña) o el isovalerianato de etilo (olor de fresa), esterificando los alcoholes que se originan de la fermentación de azúcares.

La degradación de las proteínas no es nunca deseable cuando se desarrolla sobre productos frescos, tales como carnes, pescados, etc. Y su desaparición provoca siempre una depreciación del valor comercial del producto. Es en cambio deseable cuando es controlado y detenida en el momento oportuno, en todos los productos alimentarios sometidos a maduración pero en todos los casos es siempre indeseable cuando la degradación es intensa hasta límites tales que producen verdaderos cambios de las características organolépticas dando lugar genéricamente a productos de putrefacción.

La putrefacción aeróbica es debida a un gran número de microorganismos aeróbicos, esporógenos o no, gram positivos y gram negativo, muchas de estas especies son psicrófilas por lo que en el proceso se puede manifestar también a bajas temperaturas, la putrefacción anaeróbica se debe a la actividad de microorganismos anaeróbicos pertenecientes al género *Clostridium* (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.9 Principales grupos de microorganismos causantes de alteraciones

Los principales tipos de microorganismos son : bacterias, mohos y levaduras, que pueden atacar prácticamente todos los componentes de los alimentos y cuando estos se contaminan bajo condiciones naturales es probable que actúen a la vez varios tipos de microorganismos y contribuyen a una serie de cambios simultáneos (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.9.1 Bacterias

El crecimiento de las bacterias, tanto en el interior de los alimentos como en la superficie de los mismos suele ser suficientemente abundante como para proporcionarle un aspecto desagradable, o para convertirlos en perjudiciales, las bacterias que producen pigmentos modifican el color de la superficie de los alimentos, también la superficie de los líquidos puede estar recubierta de un velo debido al crecimiento de bacterias, puede además comunicar viscosidad a la superficie de los alimentos y producir turbiedad a toda masa de los líquidos.

3.9.2 Mohos

Los mohos invaden con rapidez cualquier sustrato gracias a su eficacia en la propagación, a un crecimiento rápido y a que poseen una rica carga enzimática. La alteración de los alimentos por mohos se debe a las modificaciones que estos producen durante su desarrollo, toman del sustrato todos los elementos necesarios para su crecimiento y para producir la energía necesaria para sus procesos vitales, transformándolos gracias a sus poderosos sistemas enzimáticos (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.9.3 Levaduras

Las levaduras que contaminan los alimentos, con frecuencia son especies bien conocidas que provocan cambios indeseables en ellos. Estos cambios pueden manifestarse de dos formas una puramente estética, debida a la presencia física de levaduras (turbidez o formación de una película en la superficie de los líquidos) y otra, más profunda resultado del metabolismo de las levaduras que pueden provocar aumento de pH, aromas particulares, etc.

Las levaduras para su crecimiento necesitan oxígeno fuentes de carbono orgánicas y nitrógeno mineral u orgánico, diversos minerales y una temperatura y pH adecuados. Algunas además necesitan de una o varias vitaminas y otros factores de crecimiento. Utilizan numerosos sustratos carbonados, bien por vía oxidativa únicamente o como pasa en la mayoría de los casos, por vía fermentativa, después de una fase inicial de crecimiento anaeróbico (Casp-Vanaclocha y Abril-Requena, 2003).

3.10 Pruebas Microbiológicas

A continuación se describen los tres métodos más utilizados para la realización de las pruebas microbiológicas:

3.10.1 Método #1 (Camacho, A., M.Giles, 2009).

1. Se pesa 10.0 g de muestra en una caja Petri estéril y se pasa a un matraz Erlenmeyer que contenga 90.0 ml de una solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2 ó agua peptonada al 0.1%.
2. Se homogeniza la muestra con la solución anterior en un vaso de licuadora estéril durante 10.0 seg. a velocidad mínima; o se pasa a una bolsa de Stomacher y se homogeniza por 30.0 seg a una velocidad normal. Esta es la dilución primaria.
3. De la suspensión o solución anterior, se toma 1.0 ml y se transfiere a un tubo de ensayo que contenga 9.0 ml de solución amortiguadora de fosfatos de pH 7.2, se agita y se repite esta operación tantas veces como diluciones sean necesarias (Esquema de la Fig. 6.2). Se debe utilizar una pipeta estéril para cada dilución.

NOTA: Los microorganismos filamentosos forman las colonias a partir de una spora o de un fragmento de hifa o de un cúmulo de hifas. Debido a esto, el número de UFC/ml puede variar dependiendo de las condiciones de homogeneización de la muestra (a mayor tiempo de homogeneización mayor será la ruptura de las hifas y por lo tanto se aumentarían las UFC/ml), por lo que se debe poner especial cuidado en esta etapa. Los tiempos de homogeneización citados en esta metodología son los recomendados en la Norma Oficial Mexicana para este grupo microbiano.

4. Se coloca por duplicado en cajas Petri estériles, 1.0 ml de cada una de las diluciones de la muestra, utilizando una pipeta estéril.
5. Se funde el medio contenido en los tubos de 22 × 175 mm con 20.0 ml de agar papa dextrosa y/o de agar extracto de malta estériles. Se enfría y se mantiene a $\pm 45^{\circ}\text{C}$.
6. Para lograr acidificar los medios a un pH de 3.5, se adiciona por cada 100.0 ml de agar, 1.4 ml de ácido tartárico al 10% esterilizado por filtración en membrana o bien, se esteriliza la solución a $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Esto significa que a cada tubo conteniendo 20.0 ml del medio fundido y mantenido a $\pm 45^{\circ}\text{C}$ se le deberá adicionar 0.3 ml del ácido, o colocarlas en la caja de Petri teniendo precaución de que no toque la muestra antes de agregar el medio de cultivo.
7. Después de la acidificación, se utiliza un tubo de medio acidificado como testigo y se mide el pH para corroborar que se encuentre a 3.5 utilizando un potenciómetro.
8. En cada caja de Petri con inóculo, se vierte de 15.0 a 20.0 ml de agar papa dextrosa acidificado y/o agar extracto de malta acidificado, fundidos y mantenidos a $\pm 45^{\circ}\text{C}$. El

tiempo transcurrido entre la preparación de las diluciones y el momento en que es vertido el medio de cultivo no debe de exceder de 20.0 min.

9. Se mezcla cuidadosamente el medio con seis movimientos de derecha a izquierda, seis en el sentido de las manecillas del reloj, seis en sentido contrario y seis de atrás hacia adelante, sobre una superficie lisa, teniendo cuidado de no humedecer con el medio la tapa de la caja de Petri. Se permite que la mezcla en las cajas Petri solidifique, dejándolas reposar sobre una superficie horizontal fría.
10. Se verifica la esterilidad de los medios acidificados para lo cual se verterá en una caja de Petri sin inóculo, de 15.0 a 20.0 ml del agar papa dextrosa acidificada y/o agar extracto de malta acidificado. Después de la incubación estas cajas no deberán presentar desarrollo de colonias.
11. Se invierte las cajas y se colocan en la incubadora a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.
12. Se cuenta las colonias de cada placa después de 3, 4 y 5 días de incubación. Después de 5 días, se seleccionan aquellas placas que contengan entre 10 y 150 colonias. Si alguna de las cajas muestra crecimiento extendido de mohos o si es difícil contar colonias bien aisladas, se considera la cuantificación de 4 días de incubación o incluso las de 3 días. En este caso, se informa el período de incubación en los resultados de los análisis.
13. Se realiza una tinción húmeda para mohos con colorante de lactofenol azul de algodón, para un examen microscópico y una posible identificación de los mohos que se hayan desarrollado.
14. Se realiza una tinción de Gram para la observación microscópica de las levaduras obtenidas.
15. Se cuentan las colonias de cada placa representativa, después de 3, 4 y 5 días de incubación (a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ o a temperatura ambiente).
16. Se consideran las cuentas de placas con 10 a 150 colonias como las adecuadas para el informe. Multiplicar por el inverso de la dilución.
17. Se informa las unidades formadoras de colonias por gramo o mililitro (UFC/g o ml) de mohos y levaduras (cada uno en forma independiente), incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 días.
18. Se describen las características macroscópicas y microscópicas observadas, de los mohos y/o levaduras desarrollados a partir de la muestra analizada.
19. Si alguna parte de la caja muestra crecimiento extendido de hongos, o si es difícil contar las colonias, se considera el desarrollo de estos microorganismos a los 4 días de incubación y aún a los 3 días. En este caso se debe informar el periodo de incubación de 3 ó 4 días, en los resultados del análisis.

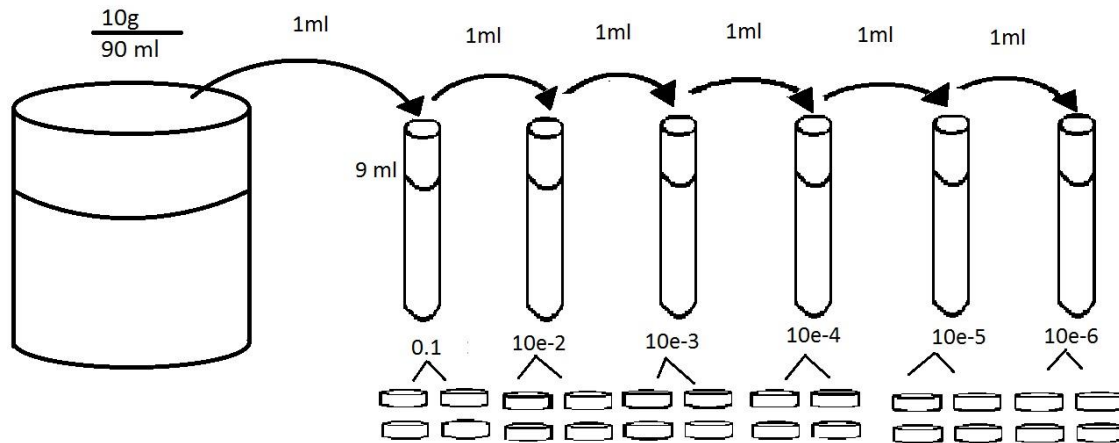


Fig. 3.1 Esquema del procedimiento para determinar mohos, levadura y aeróbicos mesófilos del método 1 (Camacho, A., M.Giles, 2009).

3.10.2 Método #2

1. Se esteriliza todo y cada uno de los instrumentos y/ o equipo que se utilizará durante el análisis (pipetas, porta objetos, tubos de ensayos, cajas de Petri, Beaker)
2. Se selecciona el medio de cultivo en dependencia del análisis que se desea llevar a cabo (cuenta total, mohos y levaduras).
3. Se prepara el medio de cultivo rellenando la caja de Petri con 15 a 20 ml a una temperatura de 50°C. Este procedimiento se lleva a cabo en una caja de incubación.
4. Seguido de esto hacemos un macerado del tomate que en este caso se utilizaran 25 gramos de alimentos más 225 ml de diluyentes en un Beaker de 500 ml y se procede a etiquetar.
5. Luego se hace un seriado de dilución, lo cual consiste verter en un tubo de ensayo 1 ml de la solución madre que ya contenga 9 ml de agar líquido, de este primer tubo de ensayo se toma 1 ml y se vierte en un segundo tubo de ensayo que también contiene agar líquido, luego se repite la operación hasta llegar a un mínimo de seis tubos de ensayos.
6. De un tubo de ensayo se toma 1 ml de solución vertiéndolo en una caja de Petri que contiene el medio de cultivo, siguiendo este mismo procedimiento con los otros tubos de ensayos.
7. Se deja encubando durante el tiempo requerido para luego proceder el recuento de micro organismo y analizar los resultados.

3.10.3 Método #3 (Prado Barragán et al., 2013)

1. Preparación de la muestra: Diluciones.

1.1 *Dilución primaria*: se pesa 10 g del alimento en condiciones asépticas. Se transferir a un vaso de licuadora previamente lavado y desinfectado con alcohol, agregar 90 ml de solución salina estéril (0.9 % p/v) y licuar por un minuto. Si el alimento no necesita licuarse pesar 10 g de producto o 10 ml directamente en un frasco de dilución con 90 ml de solución salina estéril y agitar vigorosamente para homogenizar la muestra. Esta dilución corresponderá a 10-1.

1.2 Diluciones decimales: Se tomará 0.1 ml de la dilución 10-1 y se transferirán a un tubo que contiene 9.0 ml de solución salina estéril (10-2). Esta operación se repetirá para preparar tantas diluciones decimales como sea necesario (10-3, 10-4, 10-5).

2. Inoculación por la técnica de extensión superficial en placa

2.1 Inocular 0.1 ml de cada dilución en placas de agar de cuenta estándar, extendiendo homogéneamente sobre la superficie con una varilla de vidrio en ángulo previamente esterilizada (perfectamente limpia, desinfectada con alcohol, flameada y enfriada).

2.2 Invertir las cajas e Incubar a 35°C por 24 a 48 h.

3. Interpretación de los resultados de la cuenta total estándar

3.1 Completada la incubación seleccionar las placas que contengan entre 30 y 300 colonias.

3.2 Contar todas las colonias desarrolladas en las placas seleccionadas (excepto las de mohos y levaduras), incluyendo las colonias puntiformes. Hacer uso del microscopio para resolver los casos en los que no se pueden distinguir las colonias de las pequeñas partículas de alimento. Determinar las unidades formadoras de colonia (UFC) por ml o g de acuerdo a la ecuación:

$$\frac{UFC}{ml} = \frac{N \times FDD}{V} \quad \text{Ec.1}$$

Donde UFC es la unidad formadora de la colonia, N es el número de colonias significativa en la última placa considerada, FDD es el factor decimal de dilución y V es el volumen inicial sembrado.

$$FDD = \frac{1}{FD} \quad \text{Ec.2}$$

Siendo FD el factor de dilución.

3.11 Películas Comestibles

De acuerdo a Krochta et al. (1994) las películas comestibles se definen como capas continuas y delgadas, de material comestible formada sobre (como cubierta) o colocada entre los componentes de los alimentos, y proveen un medio para acarrear ingredientes de los alimentos o aditivos y mejoran el manejo de los mismos

Según Hardenburg (1967), la aplicación de las películas comestibles, para la protección de los alimentos con el fin de prolongar su vida de anaquel se remonta desde los siglos XII y XIII en China donde se utilizaban ceras para recubrir a los cítricos retardando su desecación. Mientras, en el siglo XVI, el recubrimiento de las frutas se llevaba a cabo con parafinas previniendo la pérdida de humedad del alimento (Labuza y Contreras-Medellín, 1981).

Las propiedades que ofrecen las películas comestibles dependen de los componentes de los cuales estén elaborados (Krochta et al, 1994). Las películas pueden estar compuestas por: 1) proteínas (gelatina, caseína, etc), 2) celulosa, almidón o materiales con base en dextrina, 3) alginatos y gomas, 4) ceras, lípidos o derivados de los monoglicéridos y 5) la mezcla de cualquiera de estos grupos (Guilbert, 1986).

Kester y Fennema (1986) mencionan que la importancia de las películas comestibles recae en la capacidad de actuar como un conjunto para mejorar la calidad del alimento en general, extender el tiempo de vida de anaquel y mejorar la eficiencia económica de los materiales para empaquetamiento.

Entre algunas de las propiedades funcionales que desempeñan las películas comestibles aplicadas a algunos alimentos, se mencionan (Kester y Fennema, 1986):

- Reducir la pérdida de humedad
- Reducir el transporte de gases (CO₂ y O₂)
- Reducir la migración de aceites y grasas
- Reducir el transporte de solutos
- Mejorar las propiedades mecánicas y de manejo de los alimentos
- Proveer integridad estructural a los alimentos
- Retener los componentes volátiles
- Contener aditivos

Debido a que las películas son tanto componentes del alimento como empaques del mismo deben reunir los requisitos siguientes (Krochta et al., 1994):

- Buenas cualidades sensoriales
- Alta eficiencia mecánica y de barrera
- Estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiana.
- Deben estar libres de tóxicos
- Seguros para la salud
- De tecnología simple
- No deben de tener contaminantes
- De bajo costo tanto de materiales como en los procesos.

Guilbert (1986) menciona algunas de las ventajas de utilizar películas comestibles:

- Pueden ser ingeridas por el consumidor.
- Su costo es generalmente bajo.
- Su uso reduce los desechos y la contaminación ambiental.
- Pueden mejorar las propiedades organolépticas, mecánicas y nutricionales de los alimentos.
- Proporcionan protección individual a pequeñas piezas o porciones de alimento.
- Pueden ser usadas en alimentos heterogéneos como barrera entre los componentes.

En la Tabla 3.3 se muestran resumidas las aplicaciones de las películas comestibles en alimentos.

Tabla 3.3 Aplicaciones de las Películas Comestibles.

Propósito	Aplicaciones
Proveer una protección individual vs la humedad y el oxígeno	Pescado fresco, queso, carne y derivados, Botana
Retardar el crecimiento microbiano externo	Alimentos de humedad intermedia
Controlar el balance de humedad dentro de un alimento heterogéneo	Pizzas, pays, sandwiches, pasteles
Mejorar las propiedades mecánicas	Cacahuates, camarones, botana, jaiba
Proveer integridad estructural para reforzar la estructura del alimento	Carne reestructurada, pescado, Alimentos. Liofilizados
Restringir la migración de humedad	Frutas, horneados, congelados
Proteger las piezas que estarán dentro de tazas o bolsas	Quesos, congelados, helados
Proteger las superficies o el empaçado de la absorción de grasa	Cubos de queso, fruta seca, botana, congelados
Mejorar la apariencia del alimento, añadiéndole brillo	Productos de panificación, frutas, botana
Impartir o mejorar sabor, color y palatabilidad	Alimentos diversos

Fuente: Adaptada de Gilbert (1986).

3.11.1 Formación de las películas

Existen dos fuerzas operando cuando un polímero está siendo aplicado a una superficie o matriz, : cohesión y adhesión. El grado de cohesión afecta las propiedades de la película así como la densidad, la porosidad, permeabilidad, flexibilidad y fragilidad de la película (Guilbert, 1986).

Cuando las películas proteicas se exponen a un calor excesivo se afecta la cohesión: ya que las moléculas son inmovilizadas prematuramente provocando defectos como perforaciones y fractura prematura de la película (Guzmán, 2003). Las soluciones de concentración intermedia generalmente resultarán en el incremento de la fuerza cohesiva debido a la viscosidad óptima y solvatación del polímero (Guilbert, 1986).

3.11.2 Aditivos

Varios materiales pueden ser incorporados dentro de las películas comestibles y tener influencia en las propiedades mecánicas, protectoras y sensoriales. Para incrementar las propiedades organolépticas o nutricionales en los alimentos se pueden incorporar agentes saborizantes, pigmentos o aditivos nutricionales en las películas comestibles o cubiertas (Guilbert, 1986).

Los aditivos pueden ser:

- Plastificantes (ceras, aceites, ácidos grasos).
- Conservadores químicos (ácido benzoico, ácido sórbico).
- Surfactantes y emulsificantes (grasas, aceites).

La influencia que tendrá el aditivo en las propiedades de la película dependerá del grado de concentración, de la estructura química, del grado de dispersión en la película y de la interacción con los polímeros (Okhamafe y York, 1954).

3.11.2.1 Glicerina

La glicerina ($C_3H_8O_3$ /1, 2, 3-propanotriol) es uno de los alcoholes más utilizados en la industria química, además de ser uno de los más simples en estructura. Es común encontrar este compuesto como intermedio en el metabolismo de los organismos vivos y formando ésteres de ácidos grasos (Molinero Merino, 2012).

Su fórmula (ver Figura 3.2) muestra tres grupos hidroxílicos que le confieren propiedades como disolvente; una molécula bastante polar e higroscópica, absorbiendo agua rápidamente a temperatura ambiente. Además de ser miscible con agua también lo es con metanol, etanol y con isómeros del 3 propanol, butanol y pentanol. Su solubilidad es menor en acetona, dietil éter y dioxano. Debido a su posición y, por tanto, a su mayor accesibilidad para otras moléculas, los hidroxilos primarios terminales reaccionan más fácilmente que el grupo hidroxilo secundario o central. Es una molécula susceptible a la oxidación; normalmente los carbonos terminales lo hacen a grupos aldehído o carboxilo mientras que el carbono central lo hace a grupos carbonilo (Molinero Merino, 2012).

La glicerina se caracteriza por ser un compuesto muy estable y compatible con muchas sustancias. Así mismo, presenta propiedades físicas y químicas que permiten su utilización y aplicación en innumerables procesos químicos para la obtención de variados compuestos de interés, principalmente para la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria (Molinero Merino, 2012).

Tabla 3.4 Propiedades fisicoquímicas del glicerol a 20 °C y 101,3 kPa.

Descripción	Valor
Fórmula Química	$C_3H_5(OH)_3$
Densidad (g/cm^3)	1.26
Peso Molecular (g/mol)	92.1
Punto de fusión ($^{\circ}C$)	18.2
Punto de ebullición ($^{\circ}C$)	290
Coefficiente de temperatura (mN/mK)	- 0.06
Tensión superficial (mN/m)	64
Viscosidad ($Pa.s$)	1.5

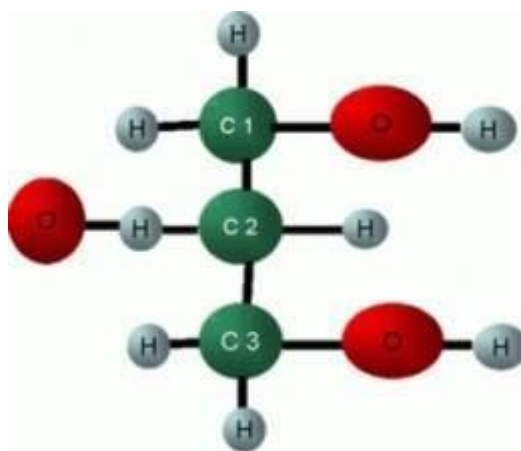


Fig.3.2 Estructura del glicerol

3.11.2.2 Goma Xantán

Heteropolisacárido ramificado sintetizado por diferentes especies de bacterias *Xanthomonas*, principalmente *X. campestris*, que produce la goma como una cobertura de protección. Después de su producción el medio se pasteuriza y se separa por filtración el microorganismo. La goma xantano está formada por residuos de D-glucosa, D-manosa y ácido D-glucurónico en una relación molar de 2.8:3.2; también contiene aproximadamente 4.7% de grupos acetilo y 3.5% de ácido pirúvico; su peso molecular es de alrededor de 3,000,000.

Es una goma pseudoplástica, soluble en agua fría o caliente, y forma soluciones muy viscosas estables en un rango de pH de 1-9 así como a la presencia de diversas sales en el medio; produce soluciones traslúcidas aún a altas concentraciones, es resistente a la degradación enzimática, funciona como un buen crioprotector, es compatible con otras gomas y presenta sinergia con los galactomananos (Badui, Salvador - 2006).

Legalmente es un aditivo permitido por la FDA y, en Europa y en México, su aplicación debe darse bajo las “buenas prácticas de manufactura”. Su aplicación se recomienda en la producción de artículos cocinados, aderezos, salsas, productos elaborados a base de jitomate, bebidas, productos lácteos y fruta procesada. (Badui, Salvador - 2006)

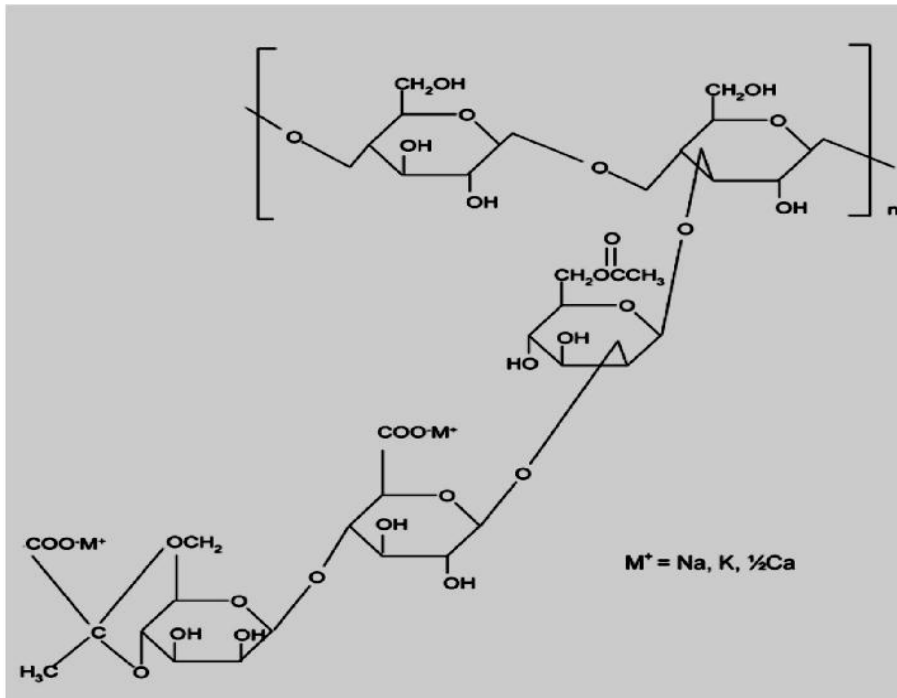


Fig 3.3 Estructura química de la goma Xantán

4. METODOLOGÍA

La investigación experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Alimentos y en el Laboratorio de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería Química, UNI.

4.1 Materiales

4.1.1 Quitosano

El quitosano para la fase experimental se obtuvo por desacetilación química con NaOH al 50%, a nivel de laboratorio a partir de quitina extraída del caparazón de camarón, por el método propuesto por Hernández y Escorcía (2006). El caparazón de camarón fue suministrado por la empresa CAMANICA (Grupo PESCANOVA).

4.1.2 Materiales y Equipos de laboratorio

En la Tabla 4.1 y 4.2 se describen los materiales y equipos, respectivamente, que se utilizaron para desarrollar el trabajo de investigación.

Tabla 4.1 Material de Laboratorio y Cristalería

Materiales	Capacidad	Cantidad
Balón Volumétrico	50 ml	2
Beaker	250 ml	2
Beaker	1000ml	1
Pesa sustancias	50 ml	2
Portaobjetos	-----	1
Petri film	1ml	124 Unidades
Tubo de ensayo	10 ml	62 Unidades
Papel filtro	-----	30 Unidades
Pipeta	10 ml	30 Unidades
Placa de vidrio	15 x 12 cm	5
Espátulas	-----	1
Papel de parafilm	-----	1

Tabla 4.2 Equipo de Laboratorio

Equipo	Marca
Agitador rotatorio o Shaker	Barnstead – Labline
Balanza Analítica	Denver Instrument Company TL-204
Procesador de Alimentos	Black and Decker
Viscosímetro	Canon 2020
Micrómetro	Stanley

4.1.3 Reactivos

En la siguiente tabla se muestra la lista de reactivos y su grado de pureza, los cuales fueron utilizados en la parte experimental.

Tabla 4.3. Reactivos

Reactivo	Grado de pureza
Agua destilada	----
Ácido acético	100.0 %
Ácido cítrico	Grado comercial
Sorbato de potasio	Grado comercial
Glicerina	Grado comercial
Goma xantan	Grado comercial

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Elaboración de películas de quitosano

A continuación se describe el procedimiento de los diferentes experimentos que se llevaron a cabo para la elaboración de películas de quitosano, usando ácido acético y ácido cítrico para su disolución; y glicerina y goma xantán, para estudiar el efecto de éstos reactivos en algunas de las propiedades mecánicas de las películas tales como flexibilidad, fragilidad, grado de elongación, grado de adherencia, transparencia.

4.2.1.1 Experimento No. 1 con ácido acético

Para esta prueba se pesaron 5.0 g de hojuelas de quitosano seco, con un diámetro < 0.32 mm y se añadió una solución de 50 ml de ácido acético al 5%. La mezcla se agitó durante 1 minuto a 2000 rpm en un procesador de alimentos. Posteriormente, ésta se vertió en pequeñas cantidades en una placa de vidrio y se dejó secar a la temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 25°C) en un lapso de tiempo entre 6 y 8 horas.

4.2.1.2 Experimento No. 2 con ácido acético y sorbato de potasio

En un beaker de 250 ml, se introdujo 5.0 g de quitosano y 1.305 g de sorbato de potasio². Se agregó 50 ml de una solución de ácido acético al 5.0% y se mezcló en un agitador magnético a 1200 rpm. Cuando la mezcla fue homogénea, se vertió en una placa de vidrio la cual se dejó secar en un lapso entre 6 y 8 horas, a la temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 25°C).

² Este dato fue considerado tomando en cuenta el artículo A. J. Avila, (2010): Películas de quitosano con sorbato de potasio unido física y covalentemente. Estudios de aplicación.

4.2.1.3 Experimento No. 3 con ácido acético y glicerina

Se pesaron 5.0 g de hojuelas de quitosano seco con un diámetro < 0.32 mm, se añadieron 50 ml de una solución de ácido acético al 5.0% y 5 gotas de glicerina. La mezcla se agitó en un procesador de alimentos durante 1 minuto a 2000 rpm y posteriormente, se vertió en una placa de vidrio, dejando secar a temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 25°C) en un lapso de tiempo de 6-18 horas.

4.2.1.4 Experimento No. 4 con ácido acético y goma xantán

En un beaker de 250 ml, se introdujo 5.0 g de hojuelas de quitosano seco con un diámetro < 0.32 mm, 50 ml de una solución de ácido acético al 5.0% y 10 mg de goma xantán. La mezcla se agitó en un procesador de alimentos durante 1 minuto a 2000 rpm y posteriormente, se vertió en una placa de vidrio, dejándose secar a temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 25°C) en un lapso de tiempo 6-8 horas.

4.2.1.5 Experimento No. 5 con ácido cítrico

Se pesaron 5.0 g de quitosano y se introdujeron en un beaker de 250 ml. Se agregó 50 ml de una solución de ácido cítrico al 20.0% y se mezcló en un agitador magnético a 1200 rpm. Cuando la mezcla fue homogénea, se vertió en una placa de vidrio la cual se dejó secar a la temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 25°C) en un lapso entre 6 y 8 horas.

El ácido cítrico se utilizó a esta concentración ya que en ensayos previos se observó que a menores concentraciones de este reactivo (5.0%, 10.0% y 15.0%) había poca disolución del quitosano.

4.2.1.6 Experimento No. 6 con ácido cítrico y sorbato de potasio

Se pesaron 5.0 g de quitosano y 1.305 g de Sorbato de potasio y se introdujeron en un beaker de 250 ml. Se agregó 50 ml de una solución de ácido cítrico al 20.0% y se mezcló en un agitador magnético a 1200 rpm. Cuando la mezcla fue homogénea, se vertió en una placa de vidrio la cual se dejó secar a la temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 25°C) en un lapso entre 6 y 8 horas.

4.2.1.7 Experimento No. 7 con ácido cítrico y glicerina

En un beaker de 250 ml, se introdujeron 5.0 g de hojuelas de quitosano seco con un diámetro < 0.32 mm, 50 ml de una solución de ácido cítrico al 20.0% y 5 gotas de glicerina. La mezcla se agitó en un procesador de alimentos durante 1 minuto a 2000 rpm y posteriormente, se vertió en una placa de vidrio, y se dejó secar a temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 25°C) en un lapso de tiempo de 6-18 horas.

4.2.1.8 Experimento No. 8 con ácido cítrico y goma xantán

En un beaker de 250 ml, se introdujeron 5.0 g de hojuelas de quitosano seco con un diámetro < 0.32 mm, 50.0 ml de una solución de ácido cítrico al 20% y 10.0 mg de goma xantán. La mezcla se agitó en un procesador de alimentos durante 1 minuto a 2000 rpm y posteriormente, se vertió en una placa de vidrio, y se dejó secar a temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 25°C) en un lapso de tiempo 6-8 horas.

En la siguiente Tabla se presenta la descripción de los materiales y las cantidades utilizadas en cada uno de los experimentos propuestos para la elaboración de las películas de quitosano.

Tabla 4.4. Descripción de los materiales utilizados para la elaboración de las películas de quitosano

No. Experimento	Descripción de los materiales	Cantidades
1	Hojuelas de quitosano	5.0 g
	Ácido acético al 5% (v/v)	50.0 ml
2	Hojuelas de quitosano	5.0 g
	Ácido acético al 5% (v/v)	50.0 ml
	Sorbato de potasio	1.305 g
3	Hojuelas de quitosano	5.0 g
	Ácido acético al 5.0% (v/v)	50.0 ml
	Glicerina	5 gotas
4	Hojuelas de quitosano	5.0 g
	Ácido acético al 5.0% (v/v)	50.0 ml
	Goma xantán	10.0 mg
5	Hojuelas de quitosano	5.0 g
	Ácido cítrico al 20.0% (p/v)	50.0 ml
6	Hojuelas de quitosano	5.0 g
	Ácido cítrico al 20%	50.0 ml
	Sorbato de potasio	1.305 g
7	Hojuelas de quitosano	5.0 g
	Ácido cítrico al 20%	50.0 ml
	Glicerina	5 gotas
8	Hojuelas de quitosano	5.0
	Ácido cítrico al 20%	50.0 ml
	Goma xantán	10.0 mg

4.2.2 Determinación de la viscosidad

Para la medición de la viscosidad de las mezclas de quitosano para la formación de las películas de recubrimiento se utilizó un Viscosímetro CANNON 2020 (ver Fig. 4.1) y un beaker de 250 ml.

El procedimiento es el siguiente: Se seleccionó una aguja, dependiendo de la consistencia de las soluciones, y se acopló al viscosímetro. Cuando la aguja se fijó, se niveló el viscosímetro y se

posicionó el beaker con la muestra hasta que el nivel del fluido estuvo ubicado en la ranura de inmersión de la aguja, seguidamente se seleccionó una velocidad y se esperó el tiempo necesario hasta que se estabilizó la lectura de la viscosidad (para mayor eficacia en las lecturas se deben evitar que estén por debajo del 10%).



(a)

(b)

Fig. 4.1 (a) Viscosímetro CANNON 2020 y (b) Micrómetro manual.

4.2.3 Determinación del grosor de las películas de quitosano

A las muestras que se les determino el grosor fueron: Quitosano +Acido Cítrico + Glicerina y Quitosano +Ácido Cítrico +Goma Xantán, debido a que estas fueron las que tenían las mejores características para utilizar: maleabilidad y elasticidad.

Para este procedimiento se utilizó un micrómetro manual (ver Fig. 6.1). Los pasos que se siguieron son:

1. Se colocó el objeto entre las dos puntas del micrómetro
2. Se hizo girar la tuerca de fijación hasta que las puntas hagan contacto con el objeto.
3. Se Verificó que las dos puntas estén tocando el objeto uniformemente
4. Se ajustó la tuerca de fijación mientras que el micrómetro todavía sostenga el objeto
5. Por último se procedió a la lectura en la parte de la pantalla, cabe destacar que estas medidas están expresadas en milímetro.

4.3 Evaluación de la vida útil del tomate recubierto con las películas de quitosano

Este estudio se llevó a cabo utilizando dos de los diferentes tipos de películas obtenidos en el ítem 4.2.1. La selección se basó en las mejores características que presentaron las películas para el objeto de estudio, tales como color, olor, flexibilidad, fragilidad, grado de elongación, grado de adherencia.

Para cada tipo de lámina (A y B) se realizaron dos pruebas a distintas temperaturas: 9°C (psicrófilos), 30°C (mesófilos), para un total de 7 pruebas. En cada prueba se utilizó 1 tomate, de los cuales 4 fueron recubiertos por la película de quitosano y 3 no, los cuales sirvieron de comparación.

Los tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill, Fuente: INTA, 2014) fueron analizados en diferentes períodos de tiempo (0, 2 y 5 días), de acuerdo a las siguientes determinaciones: Porcentaje de acidez, crecimiento de mohos, crecimientos de levaduras, crecimiento de aerobios, peso, color, olor y textura. Cabe señalar que en el día 5 se recogió la información acerca del crecimiento de mohos y levaduras; y el día 2 se realizó una cuenta total de psicrófilos y mesófilos aeróbicos.

A continuación se describe el procedimiento de cada una de las determinaciones.

4.3.1 Procedimiento para determinar el grado de madurez (acidez)

A 10 ml del jugo de tomate se agregó 3 gotas de fenolftaleína y 25 ml de agua destilada. Esta solución se tituló con hidróxido de sodio al 0.1 N. Para determinar el porcentaje de acidez se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{Acidez} = B \times N \times K \times 100 / W \quad \text{Ec.4}$$

En donde B es el NaOH consumido en la titulación (ml); N es la normalidad del NaOH (0.1N); K es la constante de acidez del ácido predominante en la fruta (ácido cítrico) que 0.064 y W es el peso o volumen de la muestra (ml).

4.3.2 Procedimiento para determinar las propiedades físicas y sensoriales

Las primeras propiedades que se determinaron fueron el color y textura, esta se hizo por medio de un análisis comparativo auxiliándose de pruebas fotográficas entre el primer y último día del experimento.

La segunda prueba que se determinó es el olor, esta se hizo por medio del sentido del olfato, notándose el grado de enranciamiento del tomate por el paso de los días.

La tercera prueba es el peso, para realizar esta prueba se utilizó una balanza electrónica en la cual se tomó el peso del tomate el día inicial y el día final del experimento.

4.3.3 Análisis microbiológico

La determinación de mohos, levadura y aeróbicos mesófilos y psicrófilos está basado en los métodos descritos en el ítem 3.9.1; es decir, se tomaron parámetros y procedimientos de cada uno de éstos métodos para poder realizar el análisis:

- 1) Se esterilizaron todos y cada uno de los instrumentos y equipos que se utilizaron durante el análisis (pipetas, porta objetos, tubos de ensayos, cajas de Petri, beaker).
- 2) Se seleccionó el medio de cultivo en dependencia del análisis que se desea llevar a cabo (cuenta total, mohos y levaduras). En este caso se utilizaron plaxas Petrifilm de Mohos y Levaduras y Cuenta Total.
- 3) Se preparó la solución buffer en un Erlenmeyer de 1000 ml agregando 8.5 g de Cloruro de sodio.
- 4) En un beaker de 500 ml se maceraron 25 g de tomate y se agregaron 225 ml de diluyente y se procedió a etiquetar como Solución madre.
- 5) Luego se hizo un seriado de dilución, el cual consistió en verter en un tubo de ensayo 1 ml de la solución madre que contenía 9 ml de solución buffer. De este primer tubo de ensayo se tomó 1 ml y se vertió en un segundo tubo de ensayo que también la solución búfer, luego se repitió la operación hasta llegar a un mínimo de siete tubos de ensayos.
- 6) De un tubo de ensayo se tomó 1 ml de solución vertiéndolo en una caja de Petri (petrifilm) que contenía el medio de cultivo, siguiendo este mismo procedimiento con los otros tubos de ensayos.

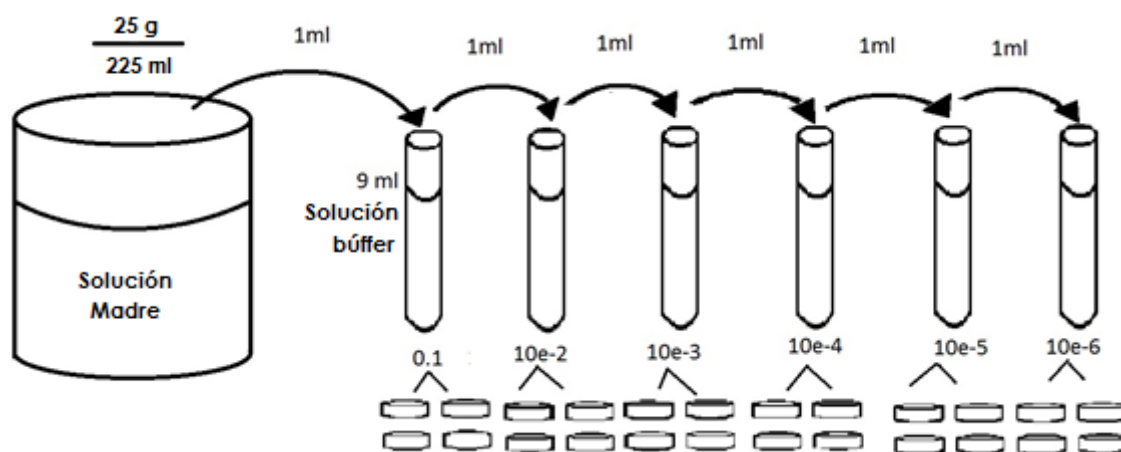


Fig. 4.2 Esquema modificado del procedimiento para determinar mohos, levadura y aeróbicos mesófilos del método 1 (Camacho, A., M.Giles, 2009).

- 7) Se dejó incubando durante el tiempo requerido para luego proceder el recuento de micro organismo y analizar el resultado.

5. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Elaboración de películas de quitosano

La elaboración de las películas implicó el uso de placas de vidrio con una medida de 11 × 15 cm, en las cuales se agregaron 30 ml de solución de quitosano. El líquido se dejó reposar por 10 minutos hasta que éste quedó uniforme en toda la placa. Posteriormente, se dejó en reposo por aproximadamente 18 horas hasta que la película estuvo seca completamente.

Cuando se logró obtener la película se procedió a removerla de la placa. Este proceso se llevó a cabo entre 5 a 20 minutos (dependiendo de la naturaleza frágil de cada película al ser depuesta de la moldura). Posteriormente, cada una de las películas fueron analizadas tomando en cuenta sus características sensoriales y físicas tales como: apariencia, olor, sabor, color y flexibilidad.

A continuación se detalla las principales características de las películas obtenidas a partir de la mezcla de quitosano con diferentes reactivos disolventes (ácido acético y ácido cítrico) y aditivos (sorbato de potasio, glicerina y goma xantán).

5.1.1 Experimento No. 1 con ácido acético

Al desmontar la película de quitosano con ácido acético se observaron las siguientes características: película lisa, con un olor característico del ácido acético, sin sabor, con color amarillento y flexible. Su apariencia se asemeja a la de una lámina plástica comercial como el celofán.

5.1.2 Experimento No. 2 con ácido acético y sorbato de potasio

En esta película de quitosano con ácido acético y sorbato de potasio se pudo observar, en cuanto a sus características físicas, las siguientes: contextura lisa sin burbujas, su consistencia es como la de una lámina plástica no muy resistente (quebradiza), persiste el olor a ácido acético, sin sabor, y su color fue entre amarillento y blanco traslucido.

5.1.3 Experimento No. 3 con ácido acético y glicerina

La película de quitosano con ácido acético y glicerina no posee mucha flexibilidad, ni elasticidad, su color es amarillento, completamente lisa y no se puede moldear a una superficie. Es un polímero bastante resistente que no se quiebra con facilidad.

5.1.4 Experimento No. 4 con ácido acético y goma xantán

En esta película se pudo observar que no es elástica pero si muy flexible; es decir, que se puede doblar aunque no se puede moldear a una superficie y no se quiebra con facilidad. Su color es amarillento y completamente lisa, parecida a la del plástico comercial.

5.1.5 Experimento No. 5 con ácido cítrico

En la película obtenida de quitosano con ácido cítrico se observó que no tiene olor, con un sabor ácido característico del ácido cítrico, es de color amarillento traslucido y no posee mucha flexibilidad, con respecto a su consistencia es quebradiza.

5.1.6 Experimento No. 6 con ácido cítrico y sorbato de potasio

La película obtenida de quitosano con ácido cítrico con sorbato de potasio no se pudo desmontar de la placa de vidrio debido a su consistencia quebradiza, se pudo notar un color blanquecino. En cuanto a las demás características no se pudieron valorar por lo anteriormente mencionado.

5.1.7 Experimento No. 7 con ácido cítrico y glicerina

La película obtenida de quitosano con ácido cítrico con glicerina es completamente lisa, de color transparente, muy flexible y elástica (moldeable y manejable) como un guante de látex. Es adherible, con un sabor característico del ácido cítrico, sin olor. Una característica importante es que si se ejerce demasiada presión o fuerza tiende a romperse.

5.1.8 Experimento No. 8 con ácido cítrico y goma xantán

La película obtenida en esta prueba es completamente lisa, de color transparente, muy flexible y elástica (moldeable y manejable) como un guante de látex, se adhería a la superficie, con un sabor característico del ácido cítrico, sin olor y tiende a romperse.



Fig. 5.1 Procesador de alimentos al momento de realizar la mezcla de la solución de *hojuelas de quitosano + Acido + Aditivo*.

Fig. 5.2 Placa de vidrio en la cual se moldeó y se secó el recubrimiento.





Fig. 5.3 Desmontado de las películas

Los resultados mostraron que las películas con las mejores características, es decir, película flexible, maleable y moldeable; fueron aquellas obtenidas a partir de: (i) quitosano con ácido cítrico con glicerina, (ii) quitosano con ácido cítrico con goma Xantán y (iii) quitosano con ácido acético. Esta última cumple con parte de las características antes mencionadas ya que es una película manejable, aunque no moldeable debido a que no tiene la propiedad de adherirse a las superficies.

5.2 Determinación de la viscosidad

Una de las características más importantes en el área de mecánica de fluidos es el conocimiento de la viscosidad de un líquido. En este estudio se determinó la viscosidad de las soluciones líquidas que se obtuvieron al mezclar el biopolímero quitosano con diferentes reactivos. A continuación se muestran los resultados obtenidos:

Tabla 5.1 Viscosidad de las soluciones preparadas a partir de quitosano con diferentes reactivos

Tipo de solución	Tipo de aguja	Velocidad RPM*	Viscosidad (Cpoise)
Quitosano + Ácido Acético	S63	20	1266
Quitosano + Ácido Cítrico	S63	50	228
Quitosano + Ácido Acético + Sorbato de potasio	S63	50	298
Quitosano + Ácido Cítrico + Sorbato de potasio	S63	50	302
Quitosano + Ácido Acético + Glicerina	S63	50	1025
Quitosano + Ácido Cítrico + Glicerina	S63	20	1698
Quitosano + Ácido Cítrico + Goma Xantán	S63	20	3495
Quitosano + Ácido Acético + Goma Xantán	S63	10	4750

* Velocidad se ajustó cada tipo de fluido para la determinación de la viscosidad.

Los resultados muestran que la viscosidad de las soluciones obtenidas está estrechamente ligada a los reactivos utilizados para disolver el quitosano y los aditivos añadidos.

Se observa que la menor viscosidad fue aquella donde se usó ácido cítrico como solvente y se agregó sorbato de potasio a la mezcla; mientras que la de mayor viscosidad fueron aquellas donde se añadió goma xantán a la mezcla. Esto puede deberse a que la goma es pseudo-plástica, soluble en agua fría o caliente, y forma soluciones muy viscosas estables en un rango de pH de 1-9. En la Tabla 5.2 se muestra algunas propiedades de la goma xantán, observándose la alta viscosidad que tiene este reactivo a 25°C.

Tabla 5.2 Propiedades Generales de la goma xantán.

Propiedades	Unidades	Mínimo	Máximo
pH	–	6.0	8.0
Viscosidad Brookfield (1%) 50 rpm, 25°C	cps	1000	
Arsénico	ppm	0	3
Plomo	ppm	0	5
Hierro	ppm	0	10

Fuente: Almidones y desarrollos industriales S.A de C.V, ADISA (2016).

5.3 Determinación del grosor de las películas de quitosano

El grosor es la distancia perpendicular entre dos superficies, el material que formará la matriz es un parámetro importante para la elaboración de películas plásticas. El espesor determina información sobre las propiedades mecánicas y de barrera (Bertuzzi et al., 2002).

Para esta determinación se utilizó un micrómetro manual. Con este equipo se midieron cada uno de los extremos de cada película (ver Fig. 5.4) como el procedimiento lo indica; es decir, colocamos la parte de la película que se quiere medir entre las dos extremidades del micrómetro y se procede a cerrar el aparato hasta obtener el valor del grosor.

Cabe mencionar que para esta determinación se utilizaron solo dos tipos de películas: Película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán y Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina; las que fueron elegidas por las propiedades que poseen (tales como maleabilidad y elongación), las cuales eran las requeridas para llevar a cabo el estudio del efecto en el producto alimenticio.

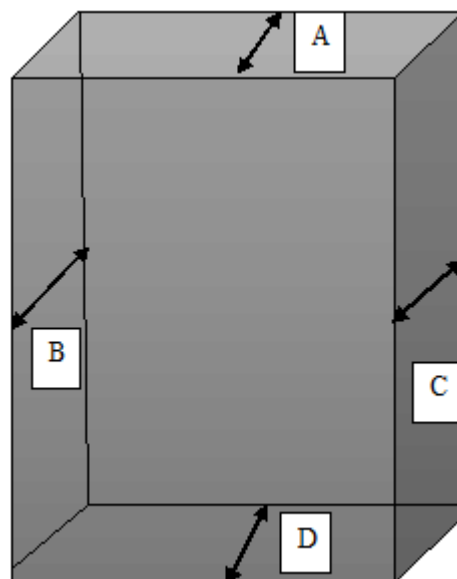


Fig.5.4. Imagen 3D de la películas indicando los lugares en que se midió el grosor.

En total se midieron ocho películas, cuatro para cada tipo. Las Tablas 5.3 y 5.4 presentan los resultados de la medición del grosor de las láminas de glicerina y de goma xantán respectivamente:

Tabla 5.3 Grosor de las películas de quitosano para el experimento No. 1.

No. de muestra	Tipo de recubrimiento	Grosor				Temperatura (°C)
		A	B	C	D	
1	Película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	0.15	0.25	0.25	0.30	9
2	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	0.19	0.21	0.25	0.30	9
3	Película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	0.20	0.25	0.21	0.25	30
4	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	0.20	0.25	0.21	0.25	30

Tabla 5.4 Grosor de las películas de quitosano para el experimento No. 2.

No. de muestra	Tipo de recubrimiento	Grosor				Temperatura
		A	B	C	D	(°C)
1	Película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	0.15	0.25	0.25	0.30	9
2	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	0.22	0.25	0.30	0.30	9
3	Película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	0.35	0.25	0.25	0.25	30
4	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	0.25	0.21	0.20	0.30	30

Posterior a la determinación de la viscosidad, las soluciones se vertieron en una placa de vidrio, y se dejó secar a la temperatura ambiente del laboratorio (aproximadamente 25°C) en un lapso de tiempo entre 6 y 8 horas. Observándose que:

- La humedad del ambiente es un factor que puede variar el tiempo de secado de las películas y que por lo tanto, afectar el grosor de las películas.
- La nivelación de la superficie de la mesa (donde se colocaba la placa de vidrio con la mezcla) estaba ligeramente inclinada, lo cual puede afectar que el grosor de las películas no fuera homogéneo.

La rapidez de secado de las películas también puede ser influenciada por la temperatura, y las propiedades que les confieren cada aditivo a las mismas. En la Tabla 5.5 se presentan algunas propiedades de la glicerina que pueden afectar el tiempo de secado.

Tabla 5.5 Propiedades fisicoquímicas del glicerina a 20°C (Alenezi et al., 2010).

Descripción	
Punto de fusión	18.2°C
Punto de ebullición	290°C
Viscosidad	1.5 Pa.s

Aunque la no homogeneidad en el grosor de la película la certeza no sea un factor que inflencie la efectividad de la película, se puede decir que el grosor si puede afectar el tiempo de maduración y la respiración de la fruta.

De todos resultados mostrados en la Tabla 5.3 y 5.4, la muestra con mayor grosor fue la numero 3 del experimento número 2, la cual se refiere a la película de quitosano+ ácido cítrico+ Goma Xantán.

5.4 Análisis microbiológico de películas de quitosano utilizando tomates como objeto de estudio

Para realizar este estudio se necesitaron 14 tomates. El análisis se hizo primero con 7 tomates y para corroborar los resultados se repitió el mismo procedimiento para el resto de tomates. Para la metodología empleada, se consideraron las siguientes muestras:

- 2 tomates con recubrimiento de Quitosano (Q), Ácido Cítrico (AC) y Goma Xantán.
- 2 tomates con recubrimiento de Quitosano (Q), Ácido Cítrico (AC) y Glicerina.
- 3 tomates sin recubrimiento.

5.4.1 Prueba Experimental No. 1

Propiedades sensoriales antes de la incubación:

- **Color:** característico del tomate proveniente de los pigmentos de carotenoide. (Badui Dergal, 1999).
- **Olor:** propio del tomate inducido por el metabolismo del aminoácido leucina³, (Badui Dergal, 1999).
- **Peso:** En la siguiente tabla se registra el peso de la muestra y la temperatura a la cual fue sometida la muestra.

Tabla 5.6 Descripción del Peso de la muestra y temperatura de almacenamiento del producto, para la prueba experimental No. 1.

No. de muestra	Tipo de recubrimiento	Peso (g)	Temperatura (°C)
1	Película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	39.9	9
2	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	23.7	9
3	Película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	48.1	30
4	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	51	30
5	Sin recubrimiento	35.3	25
6	Sin recubrimiento	46.4	30
7	Sin recubrimiento	32.6	9

³ Química de los alimentos, Salvador Badui Dergal, México, 1999, pp 465.

A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada tipo de películas tomando en cuenta el crecimiento de microorganismos con respecto a la temperatura y al tiempo de incubación.

Resultados del análisis microbiológico de las Muestras No. 1, 2 y 7 (Experimento 1).

- Temperatura 2 de Incubación (9°C)

Tabla 5.7 Resultados después de la incubación de las Muestras No. 1, 2 y 7 del Experimento 1.

Mohos y levaduras a 120 horas de Incubación a 9°C				
Tipo de recubrimiento	10²	10³	10⁴	10⁵
Quitosano + AC + Goma Xantán	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Quitosano + AC + Glicerina	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Sin recubrimiento	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Aerobios mesófilos a 48 horas de Incubación a 9°C				
Tipo de recubrimiento	10²	10³	10⁴	10⁵
Quitosano + AC + Goma Xantán	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Quitosano + AC + Glicerina	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Sin recubrimiento	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹

Resultados del análisis microbiológico de las Muestras No. 3, 4 y 6 (Experimento 1).

- Temperatura 1 de Incubación (30 °C)

Tabla 5.8 Resultados después de la incubación de las Muestras No. 3, 4 y 6 del Experimento 1.

Mohos y levaduras a las 120 horas de Incubación a 30°C				
Tipo de recubrimiento	10²	10³	10⁴	10⁵
Quitosano + AC + Goma Xantán	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Quitosano + AC + Glicerina	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Sin recubrimiento	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Aerobios mesófilos a las 48 horas de Incubación a 30 °C				
Tipo de recubrimiento	10²	10³	10⁴	10⁵
Quitosano + AC + Goma Xantán	16,5	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Quitosano + AC + Glicerina	Incontables	12	77,5	45
Sin recubrimiento	12	5	<1x10 ¹	<1x10 ¹

Resultados del análisis microbiológico de la Muestra No. 5 (Experimento 1).

A Temperatura ambiente (25°C):

Tabla 5.9 Resultados después de la incubación de la Muestra No. 5 (Experimento 1).

Aerobios mesófilos a las 48 horas de Incubación a 25°C							
Tipo de recubrimiento	10¹	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁶	10⁷
Sin recubrimiento	Incontables	58	59,5	<1x10 ⁴	<1x10 ⁴	NC*	NC

Mohos y levaduras a las 120 horas de Incubación a 25°C							
Tipo de recubrimiento	10¹	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁶	10⁷
Sin recubrimiento	NC	17	NC	NC	NC	NC	NC

*No crece

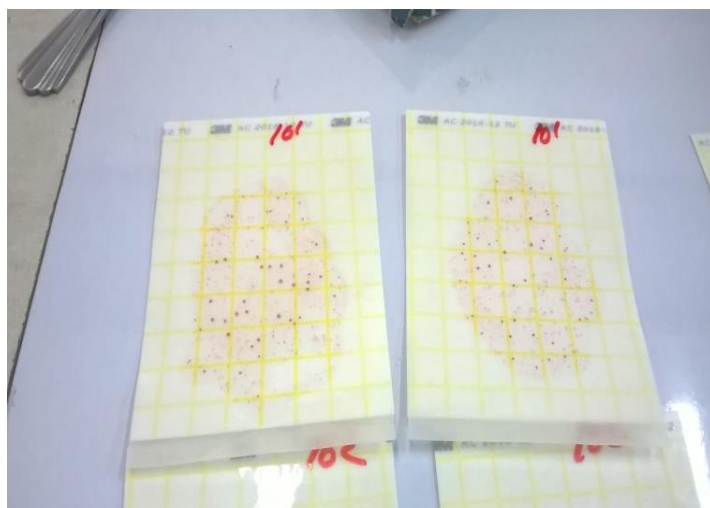


Fig. 5.5 Recuento de la cuenta total de aerobios mesófilos a 25°C



Fig. 5.6 Recuento Mohos y Levaduras a 25°C

Propiedades sensoriales después de la incubación (Experimento 1):

- **Color:** Característico del tomate proveniente de los pigmentos de carotenoide.
- **Olor:** Propio del tomate inducido por el metabolismo del aminoácido leucina, (Química de los alimentos, Salvador Badui Dergal, México, 1999, pp 465)
- **Peso:** en la tabla siguiente se muestra el porcentaje de pérdida de peso para cada muestra.

Tabla 5.10 Descripción del %Pérdida de Peso de las muestras a diferentes temperaturas de almacenamiento del producto.

No. de muestra	Tipo de recubrimiento	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	%Pérdida de peso	Temperatura (°C)
1	Quitosano + AC + Goma Xantán	39.9	39.2	1.75	9
2	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	23.7	23.5	0.84	9
3	Quitosano + AC + Goma Xantán	48.1	35.9	25.36	30
4	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	51	37.3	26.86	30
5	Sin recubrimiento	35.3	-	-	25
6	Sin recubrimiento	46.4	35.7	23.06	30
7	Sin recubrimiento	32.6	31	4.91	9

Fig. 5.7 Recuento Cuenta Total de Aerobios Mesófilos a 30°C en tomates con películas con Glicerina.

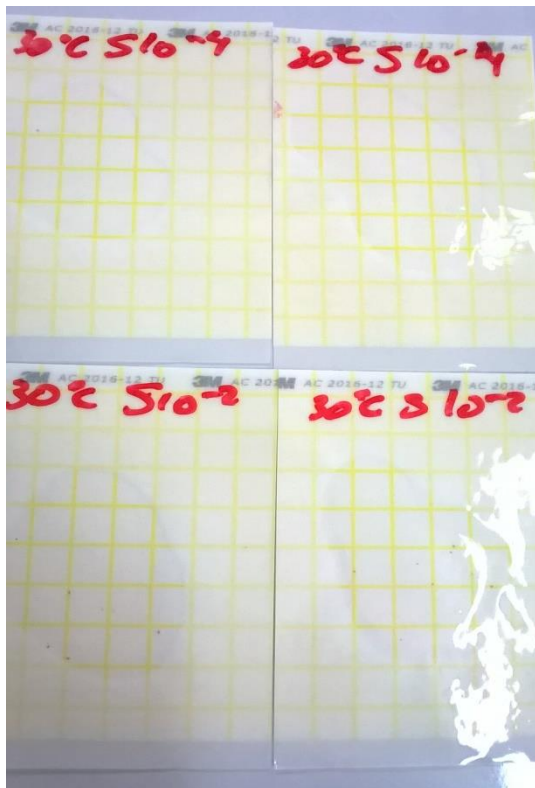
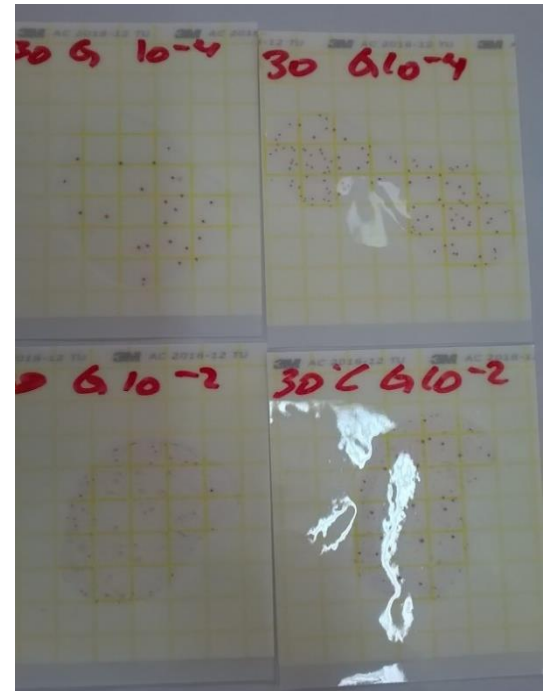


Fig. 5.8 Recuento Cuenta Total de Aerobios Mesófilos a 30°C en tomates sin recubrimiento.

Fig. 5.9 Recuento Cuenta Total de Aerobios Mesófilos a 30°C en tomates con películas con Goma Xantán.

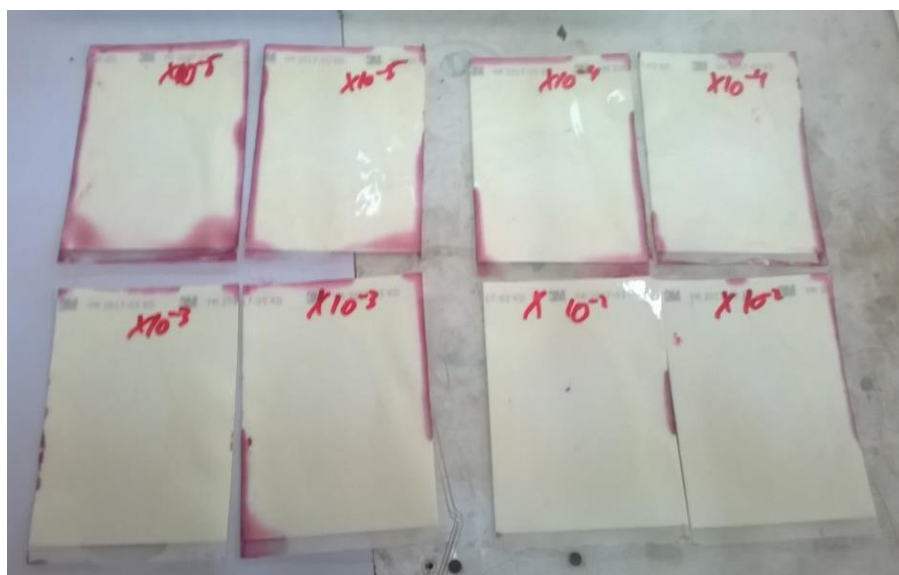
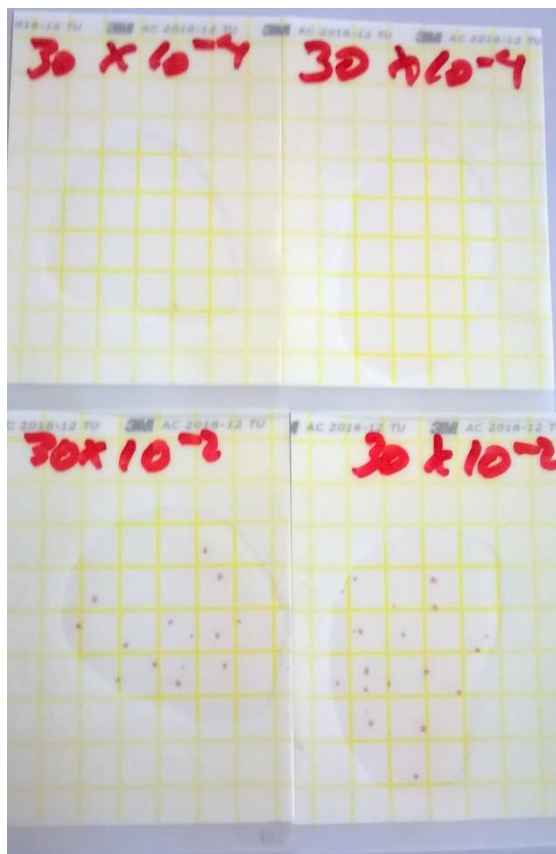


Fig. 5.10 Recuento Mohos y Levaduras a 9°C en tomates con películas con Goma Xantán.



Fig. 5.11 Recuento Mohos y Levaduras a 9°C en tomates con películas con Glicerina.



Fig. 5.12 Recuento Mohos y Levaduras a 9°C en tomates sin recubrimiento.

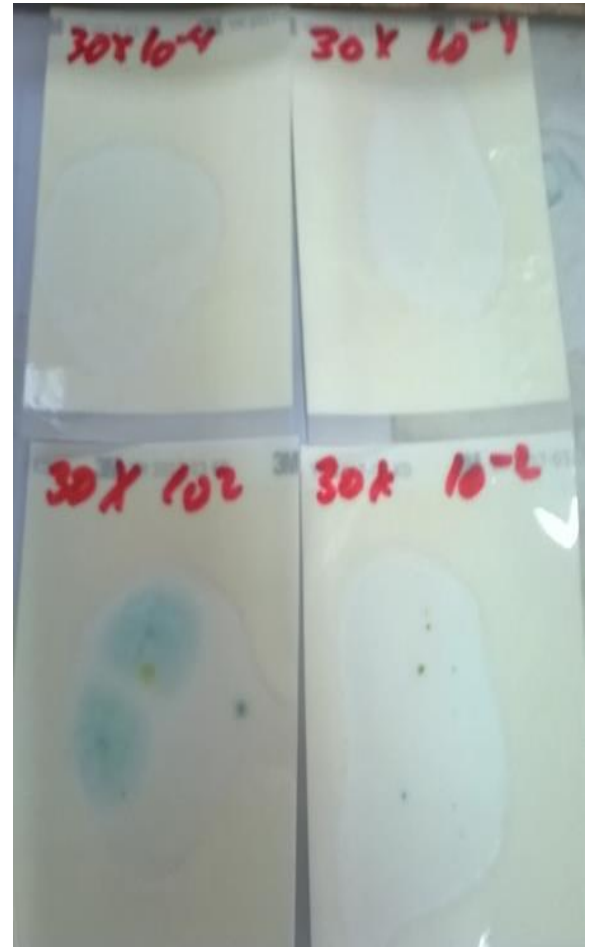


Fig. 5.13 Recuento Mohos y Levaduras a 30°C en tomates con recubrimiento con Goma Xantán.

Fig. 5.14 Recuento Mohos y Levaduras a 30°C en tomates sin recubrimiento.

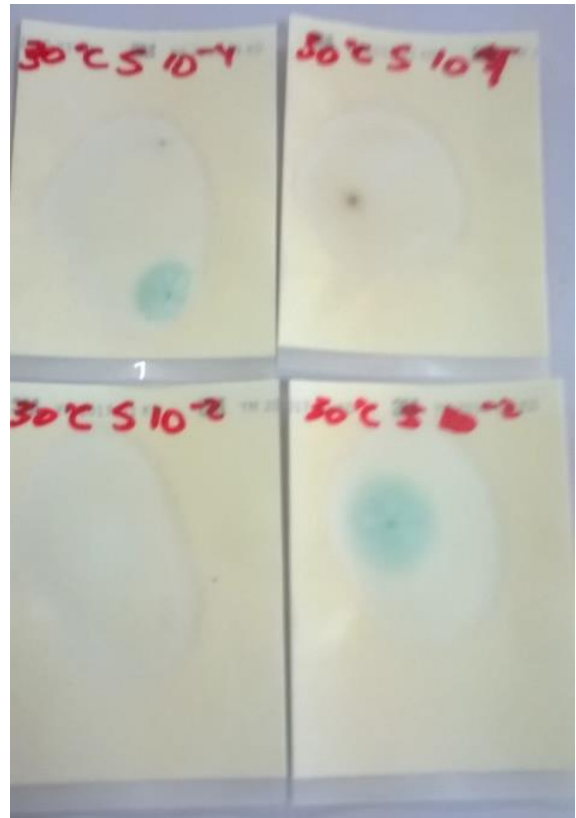


Fig 5.15 Recuento Mohos y Levaduras a 30°C en tomates con recubrimiento con Glicerina.

5.4.2 Prueba Experimental No. 2

Propiedades sensoriales antes de la incubación:

- **Color:** Característico del tomate proveniente de los pigmentos de carotenoide. (Badui Dergal, 1999)
- **Olor:** Propio del tomate inducido por el metabolismo del aminoácido leucina, (Badui Dergal, 1999)
- **Peso:** en la Tabla 5.11 se registra el peso de la muestra y la temperatura a la cual fue sometida la muestra.

Tabla 5.11 Descripción del Peso de la muestra y temperatura de almacenamiento del producto, de la prueba experimental No. 2.

No. de muestra	Tipo de recubrimiento	Peso (g)	Temperatura (°C)
1	Con película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	61.3	9
2	Con película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	68.9	9
3	Con película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	55.3	30
4	Con película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	47.9	30
5	Sin recubrimiento	45.2	25
6	Sin recubrimiento	108.32	30
7	Sin recubrimiento	99.82	9

En las siguientes tablas se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de películas tomando en cuenta el crecimiento de microorganismos con respecto a la temperatura y al tiempo de incubación.

Resultados del análisis microbiológico de las Muestras No. 1, 2 y 7 (Experimento 2).

- Temperatura 2 de Incubación (9°C)

Tabla 5.12 Resultados después de la incubación de las Muestras No. 1, 2 y 7 (Experimento 2).

Mohos y levaduras a 120 horas de Incubación a 9°C				
Tipo de recubrimiento	10²	10³	10⁴	10⁵
Quitosano + AC + Goma Xantán	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Quitosano + AC + Glicerina	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Sin recubrimiento	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Aerobios mesófilos a 48 horas de Incubación a 9°C				
Tipo de recubrimiento	10²	10³	10⁴	10⁵
Quitosano + AC + Goma Xantán	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Quitosano + AC + Glicerina	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Sin recubrimiento	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹

Resultados del análisis microbiológico de las Muestras No. 3, 4 y 6 (Experimento 2).

- Temperatura 1 de Incubación (30 °C)

Tabla 5.13 Resultados después de la incubación de las Muestras No. 3, 4 y 6 (Experimento 2).

Mohos y Levaduras a 120 horas de Incubación 30 °C				
Tipo de recubrimiento	10²	10³	10⁴	10⁵
Quitosano + AC + Goma Xantán	90	17	2,5	<1x10 ¹
Quitosano + AC + Glicerina	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Sin recubrimiento	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Aerobios mesófilos a las 48 horas de Incubación a 30 °C				
Tipo de recubrimiento	10²	10³	10⁴	10⁵
Quitosano + AC + Goma Xantán	10	7	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Quitosano + AC + Glicerina	33	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹
Sin recubrimiento	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹

Resultados del análisis microbiológico de la Muestra No. 5 (Experimento 2).

- A Temperatura ambiente (25°C):

Tabla 5.14 Resultados después de la incubación de la Muestra No. 5 (Experimento 2).

Aerobios mesófilos a las 48 horas de Incubación a 25 °C							
Tipo de recubrimiento	10¹	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁶	10⁷
Sin recubrimiento	Incontables	2	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	NC*	NC
Mohos y levaduras a las 120 horas de Incubación a 25 °C							
	10¹	10²	10³	10⁴	10⁵	10⁶	10⁷
Sin recubrimiento	NC	2	<1x10 ¹	<1x10 ¹	<1x10 ¹	NC	NC

Propiedades sensoriales después de la incubación (Experimento 2):

- **Color:** Característico del tomate proveniente de los pigmentos de carotenoide.
- **Olor:** Propio del tomate inducido por el metabolismo del aminoácido leucina, (Química de los alimentos, Salvador Badui Dergal, México, 1999, pp 465)
- **Peso:** en la tabla siguiente se muestra el porcentaje de pérdida de peso para cada muestra.

Tabla 5.15. Descripción del %Pérdida de Peso de las muestras a diferentes temperaturas de almacenamiento del producto.

No. de muestra	Tipo de recubrimiento	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	%Pérdida de peso	Temperatura (°C)
1	Quitosano + AC + Goma Xantán	61.3	61.3	0%	9
2	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	68.9	68.9	0%	9
3	Quitosano + AC + Goma Xantán	55.3	52.1	5.8%	30
4	Película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	47.9	44.4	7.3%	30
6	Sin recubrimiento	108.32	50	46.1%	30
7	Sin recubrimiento	99.82	97.9	1.92%	9

Nota: Muestra N°5 No se refleja en esta Tabla debido a que solo se utilizó como referencia.

A continuación se detallan las observaciones más importantes de ambas pruebas experimentales:

- Los parámetros que más influenciaron en el crecimiento microbiano fueron la temperatura y el tipo de películas utilizadas en el experimento.
- Las mayores pérdidas en peso de los tomates fueron en los experimentos a temperatura de 30°C como lo indican las tablas de pérdida de peso.
- Se pudo determinar que la influencia que tuvo la temperatura a 9°C con respecto al crecimiento de mohos y aerobios psicrófilos en cada uno de las muestras fue un factor determinante por ende crecimiento fue mínimo. En cambio para los Mesófilos es decir 30°C podemos ver que en los resultados se determinó que a dilución 10^2 en las películas de quitosano + Ácido Cítrico + Glicerina en la cual la glicerina como aditivo le confiere mayor permeabilidad a la película.(C. H. Caicedo, G. Ayala,2010).
- Así también se observa que en el experimento N°2 en las películas de quitosano + Ácido cítrico + Goma Xantán, hay crecimiento de aerobios en las diluciones 10^2 y 10^3 , la cual, según el ítem 5.3, es la película de mayor grosor.
- Se observó que en ningún experimento hubo crecimiento de levaduras.
- El crecimiento de mohos fueron mínimos en los experimentos a 25°C y 30°C y nulo a 9°C:

El quitosano inhibe multitud de especies de hongos, exceptuando, o siendo menos efectivo con aquellas que lo poseen en sus paredes celulares (Roller y Covill, 1999; Allan y Hardwiger, 1979), como cabría esperar. Los hongos que poseen quitosano como componente de sus paredes celulares deberían ser menos sensibles a la aplicación de dosis razonables de éste por dos razones: (a) la presencia natural de quitosano en las paredes celulares no genera efectos adversos para el microorganismo y (b) las interacciones electrostáticas del quitosano añadido (exógeno), cargado positivamente, deberían verse menos favorecidas con paredes celulares que poseen quitosano endógeno que cuando éstas poseen material con cargas negativas (Larez–Velazquez, 2008).

Para lograr una mayor efectividad fungicida del biopolímero, los más importantes son (Larez–Velazquez, 2008):

- Existe una alta correlación entre la concentración de quitosano aplicada y la inhibición fúngica; por ello, para una buena efectividad se deberá encontrar la dosis adecuada en cada situación.
- Existen evidencias de que la sensibilidad de los hongos patógenos hacia el quitosano puede cambiar en los diferentes estados de su desarrollo.

Según Liu et al. (2007), el quitosano es mejor inhibidor de la germinación de *Penicillium expansum* que la de *Botrytis cinerea*, contrariamente a lo que se observó en el crecimiento micelial de estas especies. De manera similar, un estudio reciente ha mostrado que el quitosano

es más efectivo sobre los conidios que sobre las hifas de algunos hongos fitopatógenos (Palma-Guerrero et al., 2008).

En general, estos resultados son similares a los reportados para otros agentes fungicidas, como por ejemplo el caso reportado por Everett et al. (2005), quienes encontraron que la germinación de esporas de *Botryosphaeria parva* fue menor con la aplicación del agente fluazinam que la de *Colletotridum gloeosporioides*, pero ocurrió lo contrario para la inhibición del crecimiento micelial. (Larez–Velazquez, 2008).

5.5 Determinación del índice de madurez del tomate (% Acidez)

La maduración es un conjunto de procesos de desarrollo y cambios observados en la fruta. Como consecuencia de la maduración, la fruta desarrolla una serie de características fisicoquímicas que permiten definir distintos estados de madurez de la misma. En los índices de madurez, se pueden identificar ciertos aspectos:

- Desarrollo del color
- Desarrollo del sabor y aroma
- Cambios en la firmeza

La mayoría de las frutas son particularmente ricas en ácidos orgánicos que están usualmente disueltos en la vacuola de la célula, ya sea en forma libre o combinada como sales, ésteres, glucósidos, etc. La acidez libre (acidez titulable) representa a los ácidos orgánicos presentes que se encuentran libres y se mide neutralizando los jugos o extractos de frutas con una base fuerte (Bosquez M. Elsa).

La madurez fisiológica (sazonamiento) de los frutos frecuentemente está asociada a muchos cambios en su composición química, y algunos de ellos pueden emplearse como indicadores de madurez satisfactorios. (Bosquez M. Elsa)

En la Tabla 5.16 se presentan los resultados del porcentaje de acidez de la prueba Experimental No. 1 y En la Tabla 5.17 los resultados de la prueba Experimental No. 2.

Tabla 5.16 Grado de Acidez de cada muestra y volumen gastado en el experimento N°1.

No. de muestra	Tipo de recubrimiento	NaOH 0.1N (ml)	Porcentaje de Acidez (%)	Temperatura (°C)
1	Con película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	0.95	0.061	9
2	Con película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	1.30	0.083	9
3	Con película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	1.50	0.096	30
4	Con película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	-	-	30
5	Sin recubrimiento	2.90	0.186	25
6	Sin recubrimiento	1.50	0.096	30
7	Sin recubrimiento	2.00	0.128	9

*En la muestra N°4 no se pudo realizar este procedimiento debido a que no había muestra.

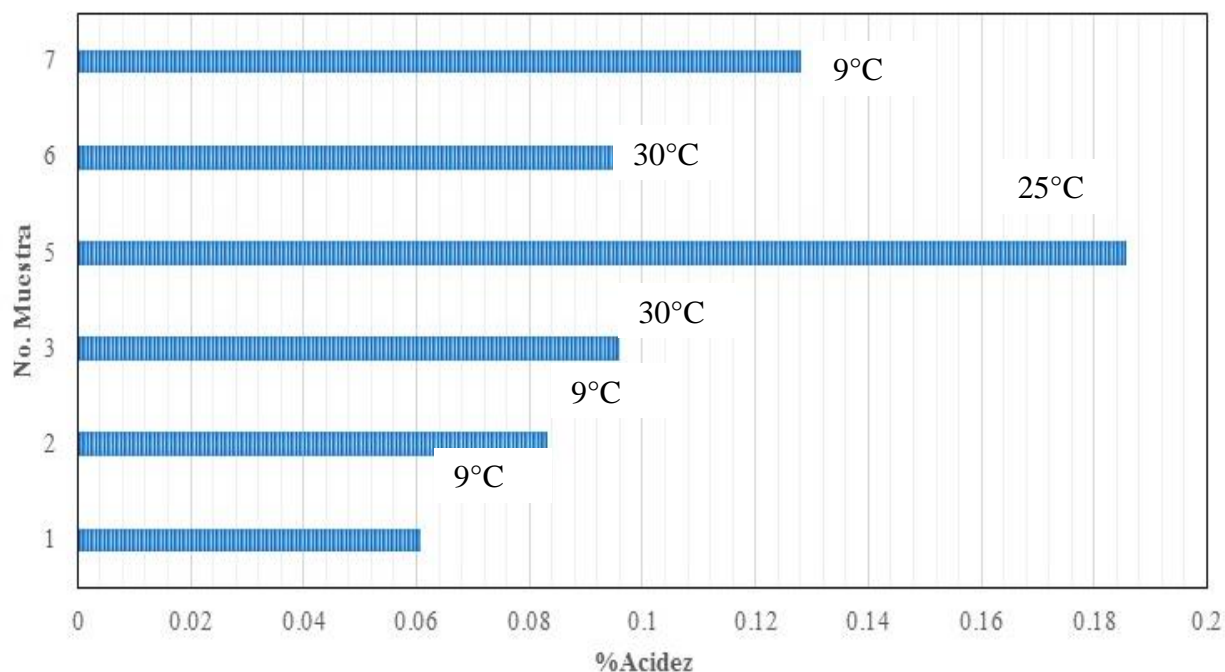


Fig. 5.16 % de Acidez según las muestras de experimento N°1.

Los resultados del primer experimento muestran que el mayor porcentaje de acidez se presenta en los tomates sin recubrimiento. Así también se observa que la temperatura influye en este parámetro ya que a baja temperatura el porcentaje de acidez es menor.

Tabla 5.17 Grado de Acidez de cada muestra y volumen gastado en el experimento N°2.

No. de muestra	Tipo de recubrimiento	NaOH(ml)	% de Acidez	Temperatura
1	Con película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	7.25	0.464	9
2	Con película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	4.50	0.288	9
3	Con película de quitosano + ácido cítrico + goma xantán	3.75	0.240	30
4	Con película de quitosano + ácido cítrico + glicerina	1.50	0.096	30
5	Sin recubrimiento	2.25	0.144	25
6	Sin recubrimiento	1.00	0.064	30
7	Sin recubrimiento	1.50	0.096	9

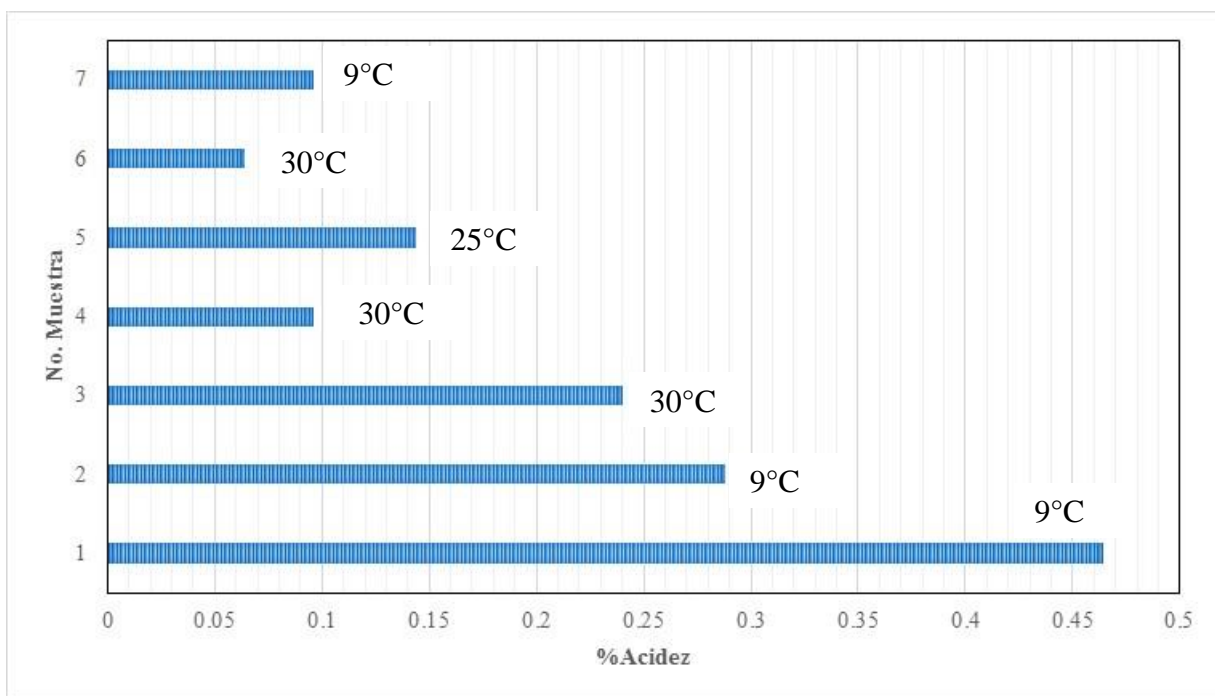


Fig. 5.17 % de Acidez según las muestras de experimento N°2

Los resultados del segundo experimento muestran que en los tomates con recubrimiento se presenta el mayor porcentaje de acidez; a diferencia que los resultados mostrados en el Experimento No. 1. Por tanto se concluye que no se puede determinar la influencia de las películas en el proceso de maduración de los tomates. Sin embargo en este parámetro también observamos que la temperatura controlada influye debido a que entre más baja temperatura más disminuye el proceso de maduración, así mismo influye la temperatura del ambiente aparte de la temperatura controlada.

6 CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se concluye que:

- Las películas con las mejores características (flexible, maleable y moldeable) fueron aquellas obtenidas a partir de: (i) quitosano con ácido cítrico con glicerina, (ii) quitosano con ácido cítrico con goma Xantán y (iii) quitosano con ácido acético. Esta última cumple con parte de las características antes mencionadas ya que es una película manejable, aunque no moldeable debido a que no tiene la propiedad de adherirse a las superficies.
- La viscosidad de las mezclas (quitosano + reactivos) está estrechamente ligada a la humedad del ambiente ya que influye en el tiempo de secado y al mismo tiempo, en el grosor de la película debido al movimiento que tiene el fluido.
- El grosor de la película es un factor que afecta en el tiempo de maduración y en la respiración del alimento.
- La temperatura es un factor muy importante en el crecimiento de mohos y aerobios psicrófilos ya que a la temperatura de 9°C se observó, en cada una de las muestras, que el crecimiento de los microorganismos fue mínimo o nulo. Mientras que a 30°C, para los mesófilos, se pudo constatar que hubo un mayor crecimiento de aerobios mesófilos y de mohos. Así también, podemos decir que no hubo crecimiento de levaduras, para cada uno de los casos.
- Las películas a base de glicerina permiten un mayor crecimiento de Microorganismos debido a que este aditivo le confiere mayor permeabilidad a las películas.
- No se puede determinar la influencia de las películas en el proceso de maduración de los tomates. Sin embargo, la temperatura controlada influye en la maduración debido a que entre más baja es la temperatura más disminuye el proceso de maduración.

7 RECOMENDACIONES

Para la realización de futuros estudios relacionados al efecto de la aplicación de películas de quitosano, se recomienda lo siguiente Recomendaciones:

- Incrementar el margen de tiempo (días) para poder observar correctamente el proceso de maduración del fruto.
- Implementar el método de elaboración de películas con otro tipo de ácido orgánico, debido a que con los reactivos utilizados sobresale el olor característico del ácido acético y el sabor característico del ácido cítrico.
- Las películas a base de glicerina permiten un mayor crecimiento de Microorganismos debido a que este aditivo le confiere mayor permeabilidad a las películas.
- No se puede determinar la influencia de las películas en el proceso de maduración de los tomates. Sin embargo, la temperatura controlada influye en la maduración debido a que entre más baja es la temperatura más disminuye el proceso de maduración.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abadia-Piquero, J. (2010). Preparación y caracterización mecánica de hidrogeles de quitosano para soporte de células de cartílago. (Trabajo de grado), Escuela Universitaria Ingeniería Técnica Industrial, Zaragoza.

Alfonso-Arce, C.C. (2011). Caracterización de películas comestibles de quitosano y la afectación de las propiedades por la aplicación de aceites: tales como el de tomillo y romero. Tesis para optar al título de Especialista en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Bogotá, Colombia.

Almidones y desarrollos Industriales S.A de C.V, ADISA (2016). Goma Xantana (Goma Xantana Fufeng). México. Extraído de: <http://adisa.mx/pdf/sector-alimenticio/subproductos/GOMA-XANTANA.pdf>

Badui Dergal, Salvador. (2006). Química de los Alimentos. Cuarta Edición. Capítulo 2. Polisacáridos. Mexico.

Bosquez M. Elsa (2016). Fisiología y tecnología postcosecha de frutas y hortalizas. Practica de laboratorio núm. 2. Aplicación de parámetros de madurez y calidad. México D.F. Extraído de:
http://www.academia.edu/6504004/FISIOLOGIA_Y_TECNOLOGIA_POSTCOSECHA_DE_FRUTAS_Y_HORTALIZAS.

Caicedo, C. H., G. Ayala, A. C. Agudelo, R. A. Vargas. (2010). Efecto Del Glicerol En Las Propiedades Eléctricas, Comportamiento De Fase Y Permeabilidad Al Vapor De Agua En Películas Basadas En Almidón De Papa. Facultad de Ingeniería y Administración. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Universidad del Valle, Cali, Colombia.

Camacho, A., Giles, M., Ortegón, A., Palao, M., Serrano B. y Velázquez, O. (2009). Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

Casp-Vanaclocha, A. y Abril-Requena J. (2003). Procesos de conservación de alimentos. Capítulo 4: Películas comestibles, Mundi-Prensa, segunda edición.

Escorcia, D., Hernández, D., Sánchez, M. y Benavente, M. (2009). Diseño y montaje de una planta piloto para la extracción de quitina y proteínas. *Revista Nexo*, 22(2), 45-55.

Gaffrey, M.C. (2014). Mayonesa con quitosano. (Trabajo de grado), Universidad FASTA, Facultad de Ciencias Médicas, Mar de Plata, Argentina.

García, E.F. (2015). La Quitina. Recuperado el 30 de enero de 2015, de <https://es.scribd.com/doc/56117754/La-Quitina>

Guilbert, S. (1986). Technology and applications of edible protective films. En "Food packaging and preservation theory and practice". Editado por Mathlouthi, M. Ed. Elsevier Applied Science Publishers, Estados Unidos.

Giraldo-Pedraza, J.D. (2015). Generalidades de la Quitina y el Quitosano. Recuperado el 30 de enero de 2015, de <https://es.scribd.com/doc/119796704/2-Generalidades-de-La-Quitina-y-El-Quitosano>

Hardenburg, R.E. (1967). Wax and related coatings for horticultural products. U.S. Dept. Agr. Bul. ARS-51-15. p. 1-15.

Hernández Beltrán, Y. (2004). La quitina y la quitosana, polisacáridos animales de gran importancia. Recuperado el 30 de enero de 2015, de <http://www.monografias.com/trabajos53/quitina-quitosana/quitina-quitosana2.shtml#ixzz3fzXtrXwO>

Comisión para la Investigación y Defensa de las Hortalizas (CIDH-Mexico) (2016). El cultivo del tomate, de <http://www.bolsamza.com.ar/mercados/horticola/tomatetriturado/ficha.pdf>

Hernández-Ochoa, L., Gonzales-Gonzales, A., Gutiérrez-Méndez, N., Muñoz-Castellanos, L.N. y Quintero-Ramos, A. (2011). Estudios de la actividad antibacteriana de películas elaboradas con quitosano a diferentes pesos moleculares incorporando aceites esenciales y extractos de especias como agentes antimicrobianos. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 10(3), 455-463.

Jianglian, D. y Shaoying, Z. (2013). Application of chitosan based coating in fruit and vegetable preservation: A review. *J Food Process Technol*, 4(5), 1-4.

Kester, J.J y Fennema, O.R. (1986). Edible films and coatings: a review. *Food Technology*. 47:59.

Krochta, J.M., Baldwin, E.A. and Nisperos-Carriedo M.O. (1994). *Edible Coating and Films to Improve Food Quality*. Technomic Pub Co., Lancaster, USA.

Labuza, T y Contreras- Medellín (1981). Prediction of moisture protection requirements for food. *Cereal Foods World*. 26: 335.

Lárez-Velázquez, C. (2008). Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura en Latinoamérica. *Revista UDO Agrícola* 8(1): 1-22.

Láñez, E. (2005). *Microbiología General: Agentes Físicos*. Departamento de Microbiología, Universidad de Granada. Recuperado el 30 de enero de 2015, de http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/13agfisicos.htm#_Toc59451623.

López-Mata, M.A., Ruiz-Cruz, S., Navarro-Preciado, C., Ornelas-Paz, J., Estrada-Alvarado, M.I., Gassos-Ortega, L.E. y Rodrigo-García, J. (2012). Efecto de recubrimientos comestibles de quitosano en la reducción microbiana y conservación de la calidad de fresas. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud*, XIV (1), 33-43.

Marcia, E., Malespín, J., Sánchez, M. y Benavente, M. (2011). Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. *Revista Nexa*, 24(1), 33-42.

Moliner Merino, Laura. (2012). Producción de monoglicéridos por esterificación de glicerina con ácidos cinámico y p-metoxicinámico. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Ingeniería Química Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España.

Morey-Rodríguez, A. S., Quinde-Bravo, A. L., y Romo-Leroux Pazmiño, M. (2012). Obtención de quitosano y su aplicación en recubrimientos comestibles en mezcla con almidón. (Trabajo de grado), Universidad de Guayaquil. Facultad Ingeniería Química.

Okhamafe, A.O y York (1984). Effects of solids-polymer interactions on the properties of some aqueous-base tablet film and coating formulations. *Inter. J. Pharm.* 22: 265.

Pereda, M., Moreira, M.R., Roura, S.I., Marcovich, N. y Aranguren, M.I. (2014). Bio-películas para el envasado de alimentos: proteínas y carbohidratos. *Ciencia e Investigación*. Tomo 64, No. 2, 35-50.

Prado Barragán, A., Rodríguez Serrano, G., Figueroa González, I. y Shirai Matsumoto, K. (2013). Manual de Prácticas de Laboratorio. Microbiología de los Alimentos. Universidad Autónoma Metropolitana, Impreso en México.

Rondón-Millán, J. (2013). Estudios con películas de quitosano y ácidos carboxílicos obtenidos de fuentes naturales. (Trabajo de grado), Departamento de Química: Universidad de los Andes, Mérida.

Vásquez, C., de Cos A. I. y López-Nomdedu C. (2005). Alimentación y nutrición: manual teórico-práctico. Segunda Edición, Ediciones Díaz de Santos, España, 117 – 118.

Yu-Hernández, P. A. (2004). Efecto de la mezcla de plastificantes en las propiedades físicas, mecánicas y de transporte de películas de quitosano. Capítulo 4: 4.1 Películas Comestibles. Tesis Profesional, Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, Universidad de las Américas Puebla, Cholula, Puebla México. Recuperado el 30 de enero 2015 de: http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/yu_h_pa/capitulo4.pdf.

Zamora-Mora, V., Sibaja, M. y Vega-Baudrit J. (2010). Diseño de un biofilm a partir de colágeno de pieles de tilapia y de quitosano de camarón como soporte para aplicación en ingeniería de tejidos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 11(7), 607-6

Cultivo del tomate INTA(2014), de
<http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/guias/GUIA%20MIP%20tomate%202014.pdf>