



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“OBTENCIÓN DE QUITOSANO A PARTIR DEL MICELIO DE
Aspergillus niger Y SU APLICACIÓN COMO RECUBRIMIENTOS
COMESTIBLES PARA LA CONSERVACIÓN DE FRUTAS”**

Trabajo de Titulación

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO QUÍMICO

AUTOR: ADRIAN STEWART HIDALGO MINA

DIRECTORA: DRA. JENNY MARINA MORENO MORA

Riobamba – Ecuador

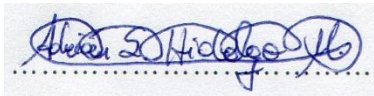
2019

©2019, Adrián Stewart Hidalgo Mina

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, Adrián Stewart Hidalgo Mina, declaro que el presente Trabajo de Titulación es de mi autoría, siendo los resultados del mismo auténticos y originales. La información del texto, que proviene de otras fuentes, se encuentra debidamente citada y referenciada, siguiendo la normativa establecida por la Institución.

Por la presente declaración, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos que se presentan en este Trabajo de Titulación.

A handwritten signature in blue ink, reading "Adrián Stewart Hidalgo Mina", written over a horizontal dotted line.

Adrián Stewart Hidalgo Mina

C.I: 080323813-8

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

El Tribunal del trabajo de titulación certifica que: El Proyecto de Investigación: “**Obtención de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su aplicación como recubrimientos comestibles para la conservación de frutas**”, de responsabilidad del señor ADRIAN STEWART HIDALGO MINA, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del trabajo de titulación, quedando autorizada su presentación.

	FIRMA	FECHA
Dra. Jenny Marina Moreno Mora DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN		2019-07-29
Ing. Cristina Gabriela Calderón Tapia MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2019-07-29

DEDICATORIA

Dedico el presente trabajo de titulación a mis padres: Teófilo Hidalgo y María Mina, por el apoyo y motivación incondicional que me han brindado durante toda mi formación académica; sin ellos, nada de lo que leerán en esta investigación habría sido posible.

A mis hermanos Paúl y Jonathan, con quienes tuve el privilegio de convivir gran parte del transcurso de mi vida universitaria; y que, aparte de ser mis modelos a seguir, siempre supieron darme los consejos que necesitaba escuchar para nunca rendirme y poder alcanzar la culminación de mis estudios universitarios.

Y a mi hermana Antonella, por también depositar su apoyo y confianza en mí; espero esto pueda motivarte a nunca rendirte y alcanzar todas las metas que te propongas.

Adrián Hidalgo

AGRADECIMIENTO

Mi profundo agradecimiento a Dios, Jesús y la Virgen María, por bendecirme cada día que he tenido el placer de estar vivo, por siempre guiar mis pasos en el camino correcto y por cada persona que ha estado presente en mi vida.

A mis padres, que siempre fueron mi pilar de apoyo, sin importar cuántos errores cometiera durante mi formación profesional y sé que lo seguirán siendo durante el resto de mi vida. A mis hermanos y demás familiares, sus palabras de apoyo siempre las llevaré en mi corazón.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en donde tuve la oportunidad de aprender los conocimientos necesarios para mi vida profesional; y a cada uno de sus docentes, por los conocimientos brindados durante mis años de formación académica. En especial, a la Dra. Jenny Moreno y a la Ing. Cristina Calderón, quienes me asesoran en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Y, por último, a todos los amigos que llegué a conocer durante mis años de estudio en la universidad; algunos más que amigos, los considero hermanos. ¡Gracias por todo muchachos!

Adrián Hidalgo

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xviii
ABSTRACT	xix

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Identificación del Problema	1
1.2. Justificación del Proyecto	2
1.3. Objetivos	3
<i>1.3.1. General</i>	3
<i>1.3.2. Específicos</i>	3

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes de la Investigación	4
2.2. Marco Conceptual	5
<i>2.2.1. Biopolímeros</i>	5
<i>2.2.2. Quitina</i>	5
<i>2.2.3. Quitosano</i>	6
<i>2.2.4. Caracterización del quitosano</i>	8
<i>2.2.4.1. Peso molecular</i>	8
<i>2.2.4.2. Grado de desacetilación</i>	8
<i>2.2.4.3. Solubilidad</i>	9
<i>2.2.4.4. Viscosidad de soluciones</i>	9
<i>2.2.4.5. Cenizas</i>	9
<i>2.2.4.6. Porcentaje de Nitrógeno</i>	10
<i>2.2.5. Aplicaciones del quitosano</i>	10
<i>2.2.5.1. Recubrimientos y películas comestibles</i>	10
<i>2.2.5.2. Tratamiento de aguas residuales</i>	10
<i>2.2.5.3. Aditivo</i>	10
<i>2.2.5.4. Cosméticos</i>	10
<i>2.2.5.5. Salud</i>	11
<i>2.2.5.6. Industria farmacéutica</i>	11
<i>2.2.5.7. Medicina</i>	11
<i>2.2.5.8. Biotecnología</i>	11

2.2.5.9. Agricultura.....	11
2.2.6. Recomendaciones generales para el uso de quitosano según su aplicación	11
2.2.7. Aspergillus niger	12
2.2.8. Micelio	13
2.2.9. Recubrimiento comestible	14
2.2.10. Técnicas de aplicación de recubrimientos	15
2.2.10.1. Inmersión	15
2.2.10.2. Atomización	16
2.2.10.3. Casteo	16
2.2.10.4. Prensado	16
2.2.10.5. Laminado	16
2.2.10.6. Aspersión	16
2.2.10.7. Frotación	16
2.2.10.8. Preformación	16
2.2.10.9. Otros	17
2.2.11. Ventajas y desventajas de los recubrimientos en frutas	17
2.2.11.1. Ventajas	17
2.2.11.2. Desventajas	17
2.2.12. Glicerina	17
2.2.13. Almidón	17
2.2.14. Frutas perecibles	18

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA	19
3.1. Hipótesis y Especificación de las Variables	19
3.1.1. Hipótesis General	19
3.1.2. Hipótesis Específicas	19
3.1.3. Identificación de Variables	19
3.1.3.1. Variables Independientes	19
3.1.3.2. Variables Dependientes	19
3.1.3.3. Variables Cualitativas	19
3.1.4. Operacionalización de Variables	20
3.1.5. Matriz de Consistencia	21
3.2. Tipo y Diseño de Investigación	23
3.2.1. Tipo de Investigación	23
3.2.2. Diseño de Investigación	23
3.3. Unidad de Análisis	23

3.4.	Población de Estudio	23
3.5.	Tamaño de la Muestra	24
3.6.	Selección de Muestra	24
3.7.	Técnicas de Recolección de Datos	24
3.7.1.	<i>Técnicas</i>	24
3.7.2.	<i>Lugar de la Investigación</i>	24

CAPÍTULO IV

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
4.1.	Análisis de Resultados	25
4.1.1.	<i>Extracción del Quitosano</i>	25
4.1.2.	<i>Caracterización del Quitosano</i>	26
4.1.2.1.	<i>Caracterización por Espectroscopía Infrarrojo</i>	26
4.1.2.2.	<i>Grado de N-Acetilación y Grado de Desacetilación</i>	29
4.1.2.3.	<i>Solubilidad</i>	30
4.1.2.4.	<i>Humedad</i>	31
4.1.2.5.	<i>Cenizas Totales</i>	31
4.1.2.6.	<i>Densidad de las Soluciones</i>	32
4.1.2.7.	<i>Viscosidad Dinámica</i>	33
4.1.2.8.	<i>Viscosidad Cinemática</i>	34
4.1.2.9.	<i>Viscosidad Relativa</i>	34
4.1.2.10.	<i>Viscosidad Específica</i>	35
4.1.2.11.	<i>Viscosidad Reducida</i>	36
4.1.2.12.	<i>Viscosidad Intrínseca</i>	37
4.1.2.13.	<i>Peso Molecular</i>	38
4.1.3.	<i>Caracterización de los Recubrimientos Comestibles</i>	38
4.1.3.1.	<i>Caracterización Física</i>	38
4.1.3.2.	<i>Densidad de los Recubrimientos Comestibles</i>	39
4.1.3.3.	<i>pH</i>	40
4.1.3.4.	<i>Análisis Microbiológico</i>	40
4.1.3.5.	<i>Caracterización por Espectroscopía Infrarrojo</i>	40
4.1.4.	<i>Funcionalidad de los Recubrimientos Comestibles</i>	42
4.1.4.1.	<i>Evaluación Sensorial de las Frutas</i>	42
4.1.4.2.	<i>Peso Promedio de las Frutas</i>	42
4.1.4.3.	<i>Pérdida de Peso de las Frutas</i>	44
4.2.	Prueba de Hipótesis	47
4.2.1.	<i>Hipótesis Específicas</i>	47

4.2.1.1. <i>Hipótesis 1</i>	47
4.2.1.2. <i>Hipótesis 2</i>	48
4.2.1.3. <i>Hipótesis 3</i>	49
4.2.1.4. <i>Hipótesis 4</i>	49
4.2.2. <i>Hipótesis General</i>	50
4.3. Discusión de Resultados	50
CONCLUSIONES	58
RECOMENDACIONES	59
BIBLIOGRAFÍA	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-4: Cantidad de Quitosano Extraído en Pruebas.....	25
Tabla 2-4: Grupos Funcionales de la muestra de Quitosano (M1).....	27
Tabla 3-4: Grupos Funcionales de la muestra de Quitosano (M2).....	28
Tabla 4-4: Grupos Funcionales de la muestra de Quitosano (M3).....	29
Tabla 5-4: Grado de N-Acetilación y Desacetilación de las Muestras.....	30
Tabla 6-4: Pruebas de Solubilidad del Quitosano.....	30
Tabla 7-4: Porcentaje de Humedad de la Muestra de Quitosano.....	31
Tabla 8-4: Porcentaje de Cenizas Totales en la Muestra de Quitosano.....	32
Tabla 9-4: Densidad de las Soluciones.....	33
Tabla 10-4: Viscosidad Dinámica de las Soluciones.....	33
Tabla 11-4: Viscosidad Cinemática de las Soluciones.....	34
Tabla 12-4: Viscosidad Relativa de las Soluciones de Quitosano.....	35
Tabla 13-4: Viscosidad Específica de las Soluciones de Quitosano.....	36
Tabla 14-4: Viscosidad Reducida de las Soluciones de Quitosano.....	36
Tabla 15-4: Viscosidad Intrínseca.....	37
Tabla 16-4: Peso Molecular del Quitosano.....	38
Tabla 17-4: Características Físicas de los Recubrimientos Comestibles.....	39
Tabla 18-4: Densidad de las Soluciones de Recubrimientos Comestibles.....	40
Tabla 19-4: pH de las Soluciones de Recubrimientos Comestibles.....	40
Tabla 20-4: Resultados del Análisis Microbiológico del Recubrimiento Comestible.....	40
Tabla 21-4: Grupos Funcionales en Muestra del Recubrimiento Comestible.....	41
Tabla 22-4: Evaluación Sensorial en Fresas.....	42
Tabla 23-4: Evaluación Sensorial en Moras.....	42
Tabla 24-4: Peso Promedio de las Fresas.....	43
Tabla 25-4: Peso Promedio de las Moras.....	44
Tabla 26-4: Pérdida de Peso de las Fresas.....	45
Tabla 27-4: Pérdida de Peso de las Moras.....	46
Tabla 28-4: Características Físico-químicas del Quitosano Experimental.....	48
Tabla 29-4: Características Físico-químicas del Recubrimiento Comestible.....	49
Tabla 30-4: Resultados del Análisis Microbiológico.....	49
Tabla 31-4: Tiempo de Conservación de las Frutas con Recubrimientos Comestibles.....	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2: Estructura de la Quitina.....	6
Figura 2-2: Estructura del Quitosano.....	7
Figura 3-2: Relación Estructural entre Quitina, Quitosano y Quitano.....	8
Figura 4-2: <i>Aspergillus niger</i>	12
Figura 5-2: Micelio del hongo <i>Aspergillus niger</i>	12
Figura 6-2: Cambio de coloración de las colonias de <i>Aspergillus niger</i>	13
Figura 7-2: Estructura del <i>Aspergillus niger</i>	13
Figura 8-2: Micelio.....	14

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-4: Espectro Infrarrojo de muestra de Quitosano (M1).....	26
Gráfico 2-4: Espectro Infrarrojo de muestra de Quitosano (M2).....	27
Gráfico 3-4: Espectro Infrarrojo de muestra de Quitosano (M3).....	28
Gráfico 4-4: Viscosidad reducida vs Concentración de las soluciones.....	37
Gráfico 5-4: Espectro Infrarrojo del Recubrimiento Comestible.....	41
Gráfico 6-4: Pérdida de Peso de las Fresas a Temperatura Ambiente.....	45
Gráfico 7-4: Pérdida de Peso de las Fresas a Temperatura de Refrigeración.....	46
Gráfico 8-4: Pérdida de Peso de las Moras a Temperatura Ambiente.....	47
Gráfica 9-4: Pérdida de Peso de las Moras a Temperatura de Refrigeración.....	47
Gráfico 10-4: Cantidad de Quitosano Extraído.....	48

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Especificaciones del micelio seco de *Aspergillus niger*.

Anexo B: Espectro Infrarrojo de muestra de quitosano comercial de cáscaras de cangrejo, >75% de grado de desacetilación.

Anexo C: Examen microbiológico de la solución formadora de recubrimientos comestibles (Solución C).

Anexo D: Extracción de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*.

Anexo E: Caracterización por Espectroscopía Infrarrojo de las muestras de quitosano.

Anexo F: Pruebas de solubilidad del quitosano.

Anexo G: Determinación del porcentaje de humedad en la muestra de quitosano.

Anexo H: Determinación del porcentaje de cenizas totales en la muestra de quitosano.

Anexo I: Determinación del peso molecular del quitosano.

Anexo J: Elaboración de los recubrimientos comestibles.

Anexo K: Caracterización de los recubrimientos comestibles.

Anexo L: Aplicación y evaluación de funcionalidad de los recubrimientos comestibles.

RESUMEN

La presente investigación planteó la obtención del biopolímero quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*, para utilizarlo en la elaboración de recubrimientos comestibles que permitan conservar frutas. Para el proceso de extracción, se realizaron 9 ensayos que consistieron en un tratamiento químico de muestras de 20 g de micelio del hongo con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico a diferentes concentraciones. De las muestras de quitosano extraído, sólo se reportaron los valores más altos para cada concentración; y las características físico-químicas de estas muestras se determinaron mediante análisis por espectroscopía infrarroja, pruebas de solubilidad, pruebas de viscosidad, secado y calcinación. Con estas muestras, se prepararon 3 soluciones (A, B, C) compuestas por disoluciones de quitosano y almidón en distintas concentraciones, y glicerina. Las características físico-químicas de estas soluciones se determinaron por: secado y formación de películas, medición de densidad, medición de pH y análisis por espectroscopía infrarrojo. La Solución C fue seleccionada porque presentó las características apropiadas para la formación de recubrimientos, y se determinó que cumple con los parámetros de inocuidad necesarios para ser considerada apta para el consumo humano. Con la finalidad de evaluar la funcionalidad de los recubrimientos comestibles en la conservación de frutas, se aplicaron por inmersión en fresas y moras, a las cuales se les realizó una evaluación sensorial y un pesaje diario; los resultados de estas pruebas se compararon con los presentados por frutas que no tenían recubrimiento. Al finalizar la presente investigación, se pudo comprobar la funcionalidad de estos recubrimientos comestibles en la conservación de frutas, debido a que permitieron que el tiempo de vida útil de las fresas y moras sea de 7 días a temperatura ambiente, y de 16 y 12 días a temperatura de refrigeración; lo que indica un aumento en su tiempo de conservación de aproximadamente 5 días.

Palabras clave: <INGENIERÍA QUÍMICA>, <BIOPOLÍMERO> <QUITOSANO>, <HONGO (*Aspergillus niger*)>, <RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES>, <CONSERVACIÓN>



ABSTRACT

This investigation raised the obtaining of the chitosan from the mycelium of *Aspergillus niger*, to use in the preparation of edible coatings that allow preserving fruits. For the extraction process, nine tests were carried out that consisted of chemical treatment of 20 g fungus mycelium samples with sodium hydroxide and hydrochloric acid at different concentrations. Between the chitosan samples extracted, only the highest values for each density were reported. And the physicochemical characteristics of these samples were determined by infrared spectroscopy analysis, solubility tests, viscosity tests, drying, and calcination. With these samples, three solutions (A, B, and C) composed of chitosan and starch solutions in different concentrations and glycerin were prepared. The physicochemical characteristics of these solutions were determined by drying and film formation, density measurement, pH measurement, and infrared spectroscopy analysis. Solution C was selected because it presented the appropriate characteristics for the creation of coatings. It was determined that it meets the safety parameters necessary to be considered fit for human consumption. In order to evaluate the functionality of the edible coating in fruit preservation, samples were applied by immersion, in strawberries and blackberries, to which- a sensory evaluation and a daily weighing-, were performed. These test results were compared with those presented by fruits having no coating. At the end of this investigation, it was possible to verify the functionality of these edible coatings in fruit preservation. As They allowed the useful life of strawberries and blackberries to be 7 days at room temperature, and 16 and 12 days at cooling temperature. It indicates an increase in tis conservation time of approximately 5 days.

Keywords: <CHEMICAL ENGINEERING>, <BIOPOLYMER> <CHITOSAN>, <FUNGUS (*Aspergillus niger*)>, <EDIBLE COATINGS>, <CONSERVATION>



CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Identificación del Problema

En Ecuador, se generan aproximadamente 355516.1 toneladas de residuos plásticos al año (MAE, 2017, p. 5). La utilización del plástico en diferentes procesos industriales y el uso de diversos envases plásticos en la industria (principalmente en la industria de alimentos y bebidas), presenta el serio problema de la disposición final de los residuos que las mismas generan (Domingo, 2011, p. 2). Cuando estos residuos se depositan en vertederos y se los quema, contaminan el ambiente debido a que generan gases tóxicos como monóxido de carbono, dióxido de carbono, cianuro de hidrógeno, dioxina, furanos, entre otros (Riquelme, 2015).

Además, los plásticos dificultan la compactación de los residuos y perjudican la descomposición de los materiales biológicamente degradables, al formar capas impenetrables que impiden la eliminación de los gases y líquidos generados en el proceso de biodegradación de la materia orgánica (Domingo, 2011, p. 3). Debido a esta problemática, existen diversos estudios que buscan un sustituto natural y sostenible para los polímeros de origen petroquímico.

El quitosano es el segundo polímero natural más abundante del planeta. Fue descubierto en 1859 por C. Rouget, el cual logró determinar que al sumergir la quitina en un álcali caliente se puede obtener un material que presenta solubilidad en ácidos orgánicos (Giraldo, 2015, p. 1) y lo llamó “quitina modificada”. Más tarde, en 1894, fue estudiado por Hoppe-Seyler quien lo bautizó “chitosan” (Luna, 2012, p. 9).

La importancia de este biopolímero radica en su gran potencial para ser utilizado en diferentes campos, debido a sus propiedades fisicoquímicas, tales como: biodegradabilidad, actividad bactericida, fungicida, nematocida, antiviral, biocida, biocompatibilidad y atoxicidad (Giraldo, 2015, p. 2).

Entre sus aplicaciones más destacadas tenemos: clarificación de jugos, liberación de agroquímicos de forma controlada, fabricación de suturas absorbibles, apósito para heridas y piel artificial, elaboración de nutrimentos, cosméticos, textiles, floculante y coagulante en el

tratamiento de aguas; y en la elaboración de recubrimientos para semillas, hojas, vegetales y frutos frescos (Giraldo, 2015, pp. 2-13).

Tradicionalmente, la fuente primaria de quitosano ha sido la quitina proveniente del caparazón de crustáceos, sin embargo, existen ocasiones en que la extracción de este biopolímero se ve limitada debido a la escasez de crustáceos en ciertas temporadas del año. Motivo por el cual, existe la necesidad de buscar otras fuentes naturales de quitina, en donde los hongos se muestran como la mejor opción, debido a su facilidad de obtención como materia prima (Becerra, et al, 2011, p. 26).

El quitosano obtenido a partir de hongos, a diferencia de los obtenidos de otras fuentes, tiene como principal ventaja su producción a gran escala y de manera controlada, durante el tiempo deseado (Alzate, et al, 2015, p. 113).

Por medio del presente trabajo de investigación, se busca determinar la efectividad de los recubrimientos comestibles elaborados a partir de quitosano de origen fúngico, para alargar el tiempo de vida útil de frutas perecibles almacenadas a temperatura ambiente y de refrigeración; de esta forma, presentarlo como una alternativa práctica y amigable para reemplazar a los polímeros sintéticos de baja degradabilidad (Fernández, et al, 2015, pp. 54-55).

1.2. Justificación del Proyecto

En las últimas décadas, los polímeros se han convertido en materiales que han revolucionado la vida de las personas, pero por su origen a base de petróleo, se consideran materiales no sostenibles que provocan serios inconvenientes ambientales.

La gran cantidad de desechos generados en el sector industrial ha despertado el interés por atenuar la contaminación, mediante la aplicación de técnicas y procedimientos que permiten elaborar nuevos productos con un bajo costo de inversión y que sean amigables con el ambiente.

Por esta razón, el desarrollo de tecnologías para la producción de biopolímeros permite que se consideren como una parcial sustitución de los materiales plásticos tradicionales en varias aplicaciones industriales (Lara, 2016, p.1).

El quitosano es un hetero polisacárido que se encuentra en casi un tercio del total de la pared celular de algunos hongos. Es insoluble en agua y tiene la propiedad de formar películas a partir de soluciones diluidas en ácidos orgánicos, mediante variadas metodologías. Posee propiedades únicas que lo hacen un ingrediente ideal para el desarrollo de películas comestibles y su aplicación en sistemas alimentarios como agente antimicrobiano (Valenzuela & Arias, 2012, p. 34).

El hongo *Aspergillus niger*, así como otros tipos de hongos, contiene en su pared celular varios tipos de biopolímeros como glucano, manano, glicoproteínas y quitina, de la cual se puede obtener quitosano mediante el proceso de desacetilación (Pontón, 2008, p. 79).

La presente investigación comprende la obtención del quitosano proveniente del micelio de *Aspergillus niger*, y su aplicación como un material que permita conservar la integridad de frutas perecibles, logrando así, reducir las pérdidas post cosecha que sufren los agricultores por la pronta maduración de sus productos y contribuyendo de una manera importante a la disminución de residuos plásticos que deterioran gravemente el ambiente.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Obtener quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* para su aplicación en la elaboración de recubrimientos comestibles que permitan conservar frutas.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Establecer el proceso adecuado para la extracción de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*.
- Determinar las características físico-químicas del quitosano obtenido a partir del micelio de *Aspergillus niger*.
- Obtener recubrimientos comestibles a partir de quitosano y analizar sus características físico-químicas.
- Comprobar la funcionalidad de los recubrimientos comestibles obtenidos a partir de quitosano como conservantes de frutas y determinar su tiempo de vida útil a temperatura ambiente y de refrigeración.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la Investigación

A nivel mundial, la producción total de polímeros bordea los 381 millones de toneladas anuales (Cáceres, 2017), de los cuales 235 millones son materias primas destinadas a la elaboración de botellas, empaques y bolsas de todo tipo y tamaño (Loreto, 2013).

El uso constante de estos materiales aumenta los niveles de basura y desperdicios que contaminan el planeta, debido a que son elaborados a partir de recursos naturales no renovables y no biodegradables, que al ser desechados se van acumulando en el ambiente durante cientos o miles de años (Cáceres, 2017).

Por tal motivo, los biopolímeros se presentan como una buena opción para reducir el daño ambiental provocado por los polímeros sintéticos a base de petróleo, debido a que al ser desechados se los puede tratar como desechos orgánicos y su degradación se puede realizar en cortos períodos de tiempo, lo que significa que el polímero al estar en contacto con microorganismos del ambiente va a ser degradado en su totalidad (López, 2014, p. 1).

Entre los polímeros biodegradables más utilizados en la industria se encuentran el colágeno, el almidón y el quitosano. Este último, proviene principalmente de la quitina, la cual se puede extraer de diversas fuentes naturales como exoesqueletos de crustáceos e insectos, y en paredes celulares de algunos tipos de hongos, entre los que destacan: *Mucor sp*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus orizae* y *Penicillium sp*.

El quitosano obtenido a partir de micelio fúngico se puede conseguir por procesos de fermentación sin ningún tipo de limitación geográfica o de temporada y contiene niveles menores de materiales inorgánicos, en comparación con los residuos de crustáceos, y por lo tanto no requieren un tratamiento de desmineralización durante su extracción (Guerrón, 2016, p. 1).

Existen dos métodos para la extracción y desacetilación de la quitina a partir de hongos, el primero consiste en una hidrólisis básica del micelio, para provocar la ruptura celular y la desacetilación de la quitina, seguido de la solubilización del quitosano en un medio ligeramente

ácido y una re-precipitación en medio básico. El segundo método se basa en un tratamiento enzimático, con las mismas etapas del método anterior (Romero, 2011, pp. 6-7).

Un enfoque importante que se le ha dado al quitosano, es su uso en procesos de conservación de alimentos, ya sea como recubrimiento comestible, como envase contenedor o como empaque biodegradable (Morey & Quinde, 2012, p. 1). El interés por el quitosano para la elaboración de recubrimientos alimenticios se atribuye a sus excelentes propiedades de barrera al O₂ y al CO₂ (Alvarado, et al, 2007, p. 606), y su efecto antimicrobiano de alto espectro (Valenzuela & Arias, 2012, p. 35).

A nivel mundial, se estima que las pérdidas post cosecha de los productos frutícolas en países en vías de desarrollo varían entre el 25 y 50 % de la producción, debido a deterioros microbiológicos y fisiológicos, significando una pérdida económica considerable para los agricultores (Carvajal, 2012, p. 1).

Por estos antecedentes, actualmente existen diversas investigaciones destinadas a la elaboración de recubrimientos comestibles a base de biopolímeros que permitan conservar la calidad nutricional de las frutas, actuando como una barrera que permita disminuir la tasa de respiración y la pérdida de peso por deshidratación, además de inhibir el pardeamiento enzimático y las reacciones metabólicas asociadas con la maduración (Vázquez & Guerrero, 2013, p. 6).

2.2. Marco Conceptual

2.2.1. Biopolímeros

Los biopolímeros son macromoléculas que se sintetizan mediante procesos biológicos (López, et al, 2004, p. 423). Son homogéneos, impermeables, biodegradables, resistentes a agentes químicos y poseen características específicas que les permiten tener diversas aplicaciones, en la elaboración de materiales o en el diseño y desarrollo de procesos industriales (Melero, 1993, p. 103).

Los biopolímeros están clasificados según su fuente en tres subgrupos importantes: polímeros elaborados a partir de recursos renovables (celulosa y almidón), polímeros biodegradables elaborados a partir de monómeros bioderivados (ácido láctico y aceites vegetales) y biopolímeros sintetizados por microorganismos (polihidroxialcanoatos) (Valero, 2013, p. 172).

2.2.2. Quitina

La quitina es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza, solo superada por la celulosa. Es un homopolisacárido lineal formado por residuos de N-acetil-D-glucosamina ligados por enlaces β (1→4) (Melo & Cuamatzi, 2007, p. 68). Lo cual le da una estructura plana, similar a la de la celulosa y adecuada para tejidos fuertes de sostén (Primo, 2007, p. 910).

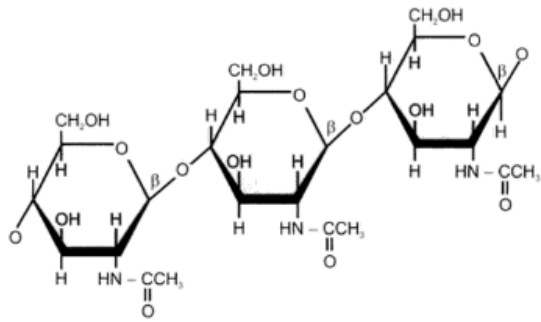


Figura 1-2: Estructura de la Quitina

Fuente: Melo & Cuamatzi, 2007, p.68

Tiene una elevada tasa de regeneración natural, pues se estima que al menos 1×10^9 toneladas de quitina se sintetizan y degradan cada año en la biosfera. Esta sustancia forma parte de las estructuras celulares de hongos ascomicetos, basidiomicetos, zigomicetos y deuteromicetos, algas, insectos, arácnidos, bacterias, nemátodos, crustáceos y de organismos invertebrados, como anélidos, cefalópodos, moluscos, hemicordados, entre otros (Ramírez, et al, 2010, pp. 262-263).

La quitina pura es un sólido blanco, parcialmente cristalino, inodoro, insípido, rígido, no es tóxico y no posee elasticidad. Es altamente insoluble en agua, pero se disuelve rápidamente en ácidos concentrados, en algunos fluoro alcoholes y soluciones al 5% de cloruro de litio, y presenta una baja reactividad (Mármol, et al, 2011, p. 54). Tiene una elevada masa molecular y una estructura porosa que le permite absorber mucha agua (Ramírez, et al, 2010, p. 263).

Es un polisacárido que en su estructura contiene grupos funcionales acetamidas, cuando se le eliminan esos grupos mediante el proceso denominado “desacetilación” se obtiene el quitosano, el cual sigue siendo un biopolímero con una distribución regular de grupos amino (Hernández, et al, 2008, p. 659).

2.2.3. Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal que en estado natural se encuentra en casi un tercio del total de la pared celular de algunos tipos de hongos; sin embargo, se obtiene principalmente como producto del proceso de desacetilación de la quitina (Riveros, 2010, p. 130).

La pérdida del grupo acetilo del grupo amida del carbono 2, da lugar a un grupo amino en esa posición, y cuando la desacetilación del material de partida es incompleta, se obtiene una mezcla de cadenas que contienen residuos de unidades N-Acetilglucosamina (GlcNAc) y 2-amino-2-desoxi- β -Dglucopiranososa (GlcN) unidos por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4), cuya relación dependerá de las condiciones de la reacción de desacetilación (Valenzuela & Arias, 2012, p. 34).

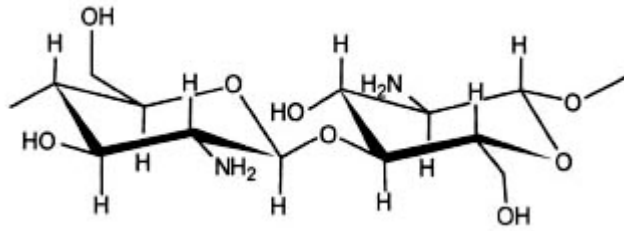


Figura 2-2: Estructura del Quitosano

Fuente: Rodríguez, et al, 2010, p. 341

Una vez que la quitina se transforma en quitosano, se modifica sustancialmente sus propiedades, lo que permite que el nuevo polímero sea soluble en soluciones acuosas de la mayoría de ácidos inorgánicos y orgánicos, e insoluble en ácidos concentrados, agua, solventes orgánicos comunes y bases. También presenta una mayor reactividad que la quitina, debido a que sus grupos amino pueden ser alcoholados y acilados, y pueden reaccionar con las bases de Schiff (Luna, 2012, p. 10).

La presencia de grupos amino en la cadena polimérica permite que el quitosano sea uno de los materiales más versátiles que existe, debido a la posibilidad de realizar una amplia variedad de modificaciones con él, tales como: reacciones de injerto, reacciones de anclaje de enzimas, obtención de películas entrecruzadas, etc.; de las cuales se pueden obtener diversos materiales con propiedades adecuadas para aplicarse en biomedicina, biotecnología, agricultura, etc. (Lárez, 2003, pp. 93-94).

El quitosano presenta propiedades filmogénicas, antifúngicas y antibacterianas. Es biodegradable, biocompatible, semipermeable y no tóxico. Además, permite ligar lípidos y metales como zinc, cobre, hierro, vanadio y plomo; y puede extender la vida útil de productos alimenticios frescos como carnes, verduras y frutas (Vuarant, 2010, pp. 58-59). Está exceptuado de regulación por la Food and Drug Administration (FDA) y se permite su uso como aditivo alimentario (Valenzuela & Arias, 2012, p. 41).

Las fuentes de quitina y los diferentes procesos de desacetilación que se utilizan para obtenerlo, son los principales factores que afectan a las propiedades finales de este biopolímero. Se han desarrollado diversos métodos físico-químicos para su obtención y caracterización, sin embargo, su aplicación se encuentra limitada por: la variación en su grado de desacetilación, su composición química, el tamaño de la cadena polimérica y su grado de purificación (Hernández, et al, 2009, p. 57).

2.2.4. Caracterización del quitosano

Las dimensiones de las cadenas de quitosano y su composición varían de acuerdo del material del que se obtiene y de la rigurosidad del método de extracción. Es por este motivo, que se debe caracterizar una muestra del polímero obtenido para determinar sus propiedades (Luna, 2012, p.15).

2.2.4.1. Peso molecular

La distribución del peso molecular del quitosano, depende de las condiciones empleadas en su proceso de extracción, tales como: concentración, temperatura, naturaleza del material utilizado como materia prima y las condiciones atmosféricas (Morey & Quinde, 2012, p. 10).

Debido a que diversos estudios indican que la mayor parte de las propiedades funcionales del quitosano dependen de su peso molecular, es necesario caracterizar adecuadamente esta propiedad. El peso molecular de este polímero puede ser determinado por varios métodos: cromatografía de permeación en gel, espectrometría por dispersión de luz y viscosimetría (Morey & Quinde, 2012, p. 10).

2.2.4.2. Grado de desacetilación

El grado de desacetilación representa el contenido de los grupos aminos presentes en la cadena polimérica. Su valor depende de diferentes factores como: el tamaño de la partícula, la concentración del álcali y la densidad de la quitina presente en la muestra utilizada (Morey & Quinde, 2012, p. 11).

En la reacción de desacetilación, se produce la salida de varios grupos acetilo ($C=O-CH_3$) de la cadena de la quitina, permitiendo la formación de grupos NH_2 reactivos, lo que produce una sustitución parcial o total de los grupos acetilo (Luna, 2012, p. 16).

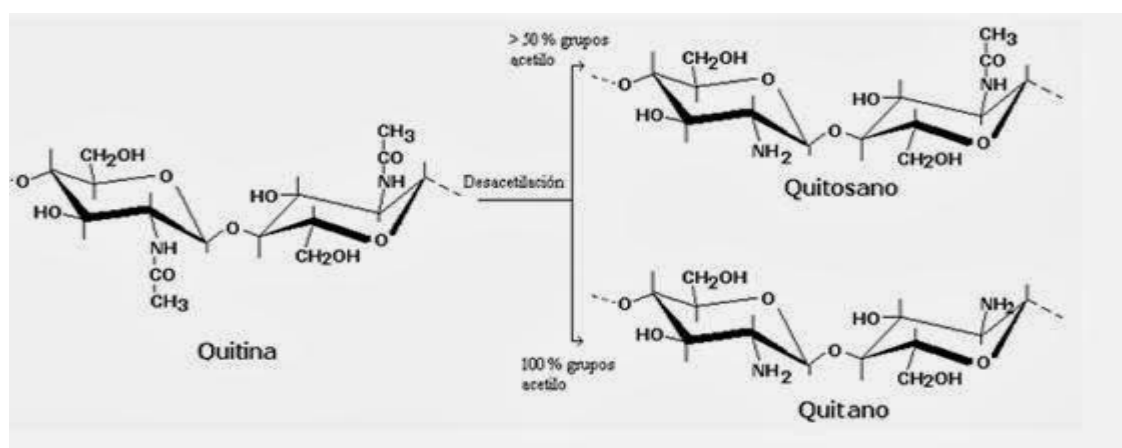


Figura 3-2: Relación Estructural entre Quitina, Quitosano y Quitano

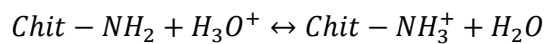
Fuente: Luna, 2012, p. 16

El contenido de grupos acetilo ($C=O-CH_3$) residuales en la estructura, se puede determinar por varios métodos: la espectroscopía de UV, la espectroscopía de infrarrojo (IR), la conductimetría, la espectroscopía de RMN y la potenciometría (Morey & Quinde, 2012, p. 11).

El más utilizado es la espectrofotometría de infrarrojos, en el cual se considera la variación de absorbancia en la banda que corresponde al grupo carbonilo ($-C=O$) a 1655cm^{-1} , característica de la quitina, como una medida de la disminución de los acetilos en la cadena. (Luna, 2012, p. 16).

2.2.4.3. Solubilidad

El quitosano se encuentra cargado de forma positiva en soluciones ácidas, debido a la presencia de aminas primarias en su estructura, la cual es protonada de acuerdo a la siguiente ecuación:



Al tener carga positiva la amina, el quitosano se vuelve soluble en soluciones ácidas diluidas, al aumentar su capacidad hidrofílica, y provocando la formación de sales. El quitosano es soluble cuando más del 50% de sus grupos aminos se encuentran protonados. Su solubilidad depende del grado de desacetilación de su estructura y se encuentra controlada por las interacciones moleculares del grupo N-acetil y por las propiedades hidrofílicas de la glucosamina libre (Luna, 2012, pp. 15-16).

2.2.4.4. Viscosidad de soluciones de quitosano

En general, las soluciones de polímeros son muy viscosas, aún en soluciones diluidas (Luna, 2012, p. 17), lo que permite que puedan ser utilizadas como agentes de suspensión o como espesantes estabilizantes (Morey & Quinde, 2012, p. 12).

Las soluciones de quitosano presentan propiedades viscoelásticas y pseudoplásticas (Morey & Quinde, 2012, p. 12). Su viscosidad depende de su grado de desacetilación, el tamaño y la forma del polímero, de su peso molecular y de su concentración (Luna, 2012, p. 17).

2.2.4.5. Cenizas

Las cenizas de un polímero se encuentran constituidas por el residuo de materia inorgánica que queda después de que la materia orgánica se ha quemado completamente. Estas cenizas no tienen necesariamente la misma composición de la materia mineral en el polímero original, debido a que pueden existir pérdidas por volatilización o por interacciones entre los constituyentes (Luna, 2012, p. 19).

2.2.4.6. Porcentaje de Nitrógeno

Para determinar el Nitrógeno orgánico, generalmente se utiliza el método Kjeldahl, el cual consiste en la digestión del compuesto nitrogenado con ácido sulfúrico, de esta forma se

produce la formación de una sal de amonio. Esta sal se descompone en amoníaco, por acción de una base fuerte (Luna, 2012, p. 19).

2.2.5. Aplicaciones del quitosano

2.2.5.1. Recubrimientos y películas comestibles

El quitosano se puede utilizar en la elaboración de recubrimientos y películas comestibles, debido a sus propiedades bioquímicas. Estos recubrimientos y películas son duraderos, resistentes y flexibles. Presentan una moderada permeabilidad al vapor de agua, disminuyen la tasa de respiración, actúan como barreras para la penetración del oxígeno, retrasan la maduración de frutas y vegetales, además de que inhiben el desarrollo microbiano (Andrade, 2015, p. 6).

2.2.5.2. Tratamiento de aguas residuales

En el tratamiento de aguas residuales, el quitosano es utilizado para eliminar restos de colorantes y trazas de metales (Andrade, 2015, p. 6), tales como: Pb (II), Cu (II), U (VI), Ni (II), Cr (II), Cr (VI), Zn (II), Cd (II), Co (II), Pd (II), Fe (II) y Hg (II) (Romero, 2011, p. 8).

Esto se debe a que está cargado de forma positiva, lo que le permite combinarse con biomoléculas que posean carga negativa o formar complejos con metales, los cuales floculan y pueden ser separados por procesos de filtración, centrifugación o prensado (Morey & Quinde, 2012, pp. 16-17).

2.2.5.3. Aditivo

Debido a sus propiedades gelificantes, espesantes y emulsificantes, el quitosano se puede emplear para mejorar la textura de diversos alimentos, ya que permite fijar grasa y agua. Además, se utiliza como agente floculante o estabilizante de color, en la clarificación de bebidas como los zumos, el vino, etc. (Andrade, 2015, p. 7).

2.2.5.4. Cosméticos

Se lo puede añadir en productos cosméticos como un agente emulsificante, hidratante, espesante, emoliente y formador de películas (Andrade, 2015, p. 7).

2.2.5.5. Salud

Se lo puede utilizar para el control del colesterol, en las prótesis dentales, en biomateriales, suturas, como producto antibacterial, en vendas para los ojos y como anticongelante (Andrade, 2015, p. 7).

2.2.5.6. Industria farmacéutica

En esta industria se lo utiliza como excipiente para la elaboración de tabletas (Andrade, 2015, p. 7).

2.2.5.7. Medicina

En medicina, actúa como antiácido, permite cicatrizar heridas, reduce la placa dental, y es utilizado en la recuperación de lesiones cutáneas crónicas y en la curación de úlceras (Andrade, 2015, p. 8). Por su histocompatibilidad, se puede utilizar como componente de suturas quirúrgicas reabsorbibles y en implantes artificiales de piel para regeneración de tejidos (Romero, 2011, p. 8).

2.2.5.8. Biotecnología

Se lo puede utilizar para inmovilizar enzimas, para encapsular e inmovilizar células y para la reutilización de proteínas (Andrade, 2015, p. 8).

2.2.5.9. Agricultura

Es beneficioso para las plantas, porque induce mecanismos de defensa en las mismas y debido a su actividad antifúngica, las protege de hongos fitopatógenos. Si se lo aplica en las semillas, permite un incremento en la germinación y por ende un mayor rendimiento en los cultivos (Romero, 2011, p. 8).

2.2.6. Recomendaciones generales para el uso de quitosano según su aplicación

- Como conservante de alimentos: Bajo o medio peso molecular y alto grado de desacetilación.
- Como ingrediente dietético: Alta viscosidad, alto peso molecular y partículas finas.
- Como agente emulsificante: Bajo grado de desacetilación y alta viscosidad.
- En el tratamiento de aguas residuales: Baja cristalinidad y alto grado de desacetilación. Puede variar dependiendo de las condiciones del agua a tratar.
- Para la reducción de metales: Bajo peso molecular y alto grado de desacetilación.
- Para productos cosméticos y de salud: Bajo peso molecular y alto grado de desacetilación.
- Para inmovilizar células: Alto grado de desacetilación.
- Para inmovilizar enzimas: Bajo contenido de cenizas, pero dependerá de la enzima y el método de inmovilización.
- En la ingeniería de tejidos: Alto peso molecular y un grado de desacetilación del 85% (Domínguez, 2012, p. 57).

2.2.7. *Aspergillus niger*

El *Aspergillus niger* se encuentra en el grupo de los *aspergilos* negros, el cual se clasifica dentro de la familia *moniliaceae*, orden *moniliales*, clase *hyphomycetes*, *filum deuteromycota* (Sáez, et al, 2002, p. 34).

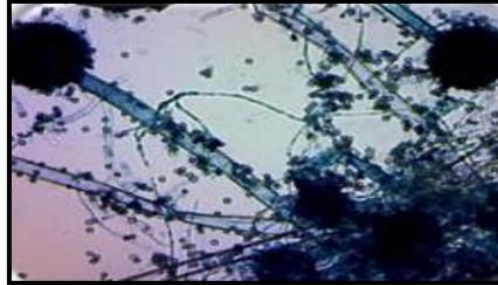


Figura 4-2: *Aspergillus niger*

Fuente: López, 2017, p. 17

Es un hongo filamentoso, es decir, forma hifas que presentan un recubrimiento denominado “micelio” (López, 2017, p. 17). Su micelio presenta una variación de color desde el blanco al amarillo; es macrosifonado, hialino, septado, presenta cabezas aspergilaes subesféricas de 25 a 100 μm , con dos series de fiálides, en un ángulo de 360°, con conidios redondos equinulados y negros (Rodríguez, 2016).



Figura 5-2: Micelio del hongo *Aspergillus niger*

Fuente: Hidalgo, 2018

Tiene colonias de crecimiento rápido que maduran en 3 días, al principio son de color blanco-amarillento y al pasar los días las cabezas conoidales toman un color negro grisáceo o negro carbón, con apariencia algodonosa (Rodríguez, 2016).



Figura 6-2: Cambio de coloración de las colonias de *Aspergillus niger*

Fuente: Hidalgo, 2018

El *Aspergillus niger* se puede reproducir de forma sexual, por ascosporas, y de forma asexual, por conidios (Cueva, 2017, p. 36). Los conidióforos presentan una pared lisa, pigmentada y hialina, miden entre 1.5-3 mm de longitud, tienen una vesícula de forma globosa y producen fiálides alrededor de los brotes de conidios. Estos conidios son globosos y rugosos, con un color que va desde el marrón al negro (Loayza, 2017, p. 17).

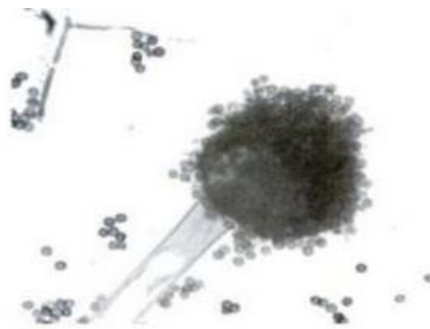


Figura 7-2: Estructura del *Aspergillus niger*

Fuente: Loayza, 2017, p. 18

Este hongo se diferencia del resto de especies de *Aspergillus* por: su mayor tamaño, mayor rapidez de crecimiento, el color negro de sus cabezas conidiales y en el micelio. Se desarrolla en diversos tipos de sustratos, principalmente en materia orgánica en descomposición, puede crecer en un rango de temperatura de 12 a 57 °C en la naturaleza y produce micotoxinas durante el proceso de degradación del sustrato (Cueva, 2017, p. 36).

2.2.8. Micelio

Es un conjunto de hifas y constituye el aparato vegetativo de los hongos, surge de la germinación y posterior crecimiento de una espora y su tamaño dependerá de la cantidad de nutrientes disponibles. El micelio está compuesto por una masa de citoplasma multinucleado que se encuentra encerrado dentro de un sistema de tubos rígidos y ramificados, estos tubos

representan una estructura protectora homóloga a la pared celular de un organismo unicelular (Stanier, et al, 1992, p. 574).

El micelio de los hongos se lo puede encontrar en dos fases distintas: La primera fase es el micelio vegetativo, el cual se puede ver como filamentos blancos en forma de hilos, con una apariencia que asemeja a una tela de araña. Tiene la función de captar alimento mediante la colonización del sustrato y aumentar el área que se encuentra cubierta por él (López, 2016, p.12).

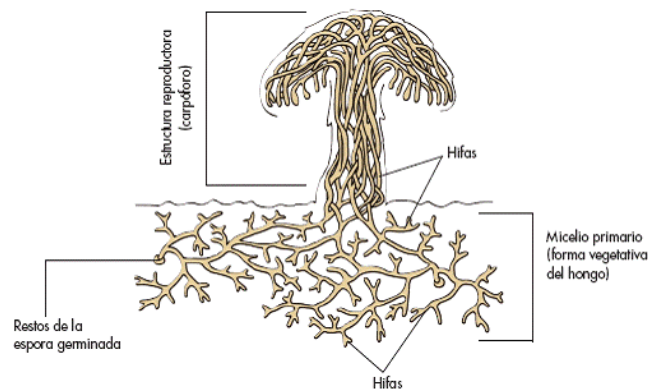


Figura 8-2: Micelio

Fuente: Merino, 2017

La segunda fase depende de la primera y es el arreglo del micelio vegetativo para formar cuerpos sólidos sobre el sustrato (cuerpos fructíferos). Este micelio se denomina “micelio reproductivo” y tiene como función la producción de hongos (López, 2016, p.12).

2.2.9. Recubrimiento comestible

Es una matriz continua y delgada que se forma alrededor del alimento, generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento. Está conformada por un polisacárido, un compuesto de naturaleza proteica, lipídica o una mezcla de los mismos (Quintero, et al, 2010, p. 94).

Los recubrimientos comestibles que se elaboran a partir de polisacáridos son hidrofílicos y permiten la formación de enlaces con hidrógeno, lo cual se puede utilizar para la unión con aditivos (Fernández, et al, 2017, p. 136). Dentro de los polisacáridos que se utilizan para la elaboración de estos recubrimientos se encuentran las dextrinas, el almidón, el quitosano y los derivados de la celulosa (Ulloa, 2007, p. 55).

Los recubrimientos de proteínas tienen como componentes la gelatina, el colágeno, el gluten de trigo, la zeína de maíz, las proteínas del suero lácteo, las proteínas de la quinua, entre otros. Presentan buenas propiedades de barrera a los gases, sin embargo, tienen poca resistencia al vapor de agua debido a su naturaleza hidrofílica (Ramos, 2010, p. 1).

Mientras que los recubrimientos comestibles que se obtienen con lípidos se obtienen con la aplicación de surfactantes y ceras naturales, como materia prima (Ulloa, 2007, p. 55), y son sustancias hidrofóbicas (Fernández, et al, 2017, p. 137). Son muy eficientes al disminuir la deshidratación de los productos, debido a su baja polaridad presentan una escasa permeabilidad al vapor de agua (Ramos, 2010, p. 1).

En los recubrimientos mixtos también se utilizan plastificantes como la glicerina, el glicol de polietileno, el sorbitol y los monoglicéridos, que se utilizan para aumentar la elasticidad y flexibilidad del recubrimiento, presentando diversas ventajas al permitir complementar las deficiencias que se pueden presentar utilizando un sólo recubrimiento, de tal manera que permite reducir la pérdida de peso del alimento y conserva sus propiedades fisicoquímicas por más tiempo (Fernández, et al, 2017, p. 137).

El uso de un recubrimiento comestible en productos altamente perecederos, se basa en las ventajas que presenta para su aplicación como: disponibilidad, costo, propiedades mecánicas (tensión y flexibilidad), atributos funcionales, propiedades ópticas (brillo y opacidad), resistencia estructural al agua, su efecto de barrera frente al flujo de gases, al ataque de microorganismos y su aceptabilidad sensorial (Quintero, et al, 2010, p. 95).

Al aplicarse sobre frutos, actúa como un sistema protector creando una atmosfera modificada que retrasa la senescencia en las frutas, ayuda a conservar la apariencia, disminuye la pérdida de aromas, la transpiración y mejora la textura (Restrepo & Aristizábal, 2010, p. 1).

2.2.10. Técnicas de aplicación de recubrimientos

2.2.10.1. Inmersión

Es la técnica más utilizada para aplicar recubrimientos comestibles en vegetales, frutas y productos cárnicos (Morey & Quinde, 2012, p. 31). Se utiliza especialmente en aquellos productos que requieren una capa uniforme y gruesa en una superficie irregular (Parzanese, 2010, p. 9).

En el caso de frutas y verduras, esta inmersión se realiza en tanques o envases que contengan las soluciones formadoras de películas durante un determinado tiempo. Luego se deja escurrir y se somete al alimento a un proceso de secado, permitiendo que se forme sobre la superficie del producto una película delgada y flexible (Morey & Quinde, 2012, p. 31).

2.2.10.2. Atomización

Es adecuado para productos que necesiten ser recubiertos sólo en una de sus caras o en uno de sus lados, se puede lograr obtener un recubrimiento con un espesor más delgado y uniforme (Miramont, 2012, p. 15).

2.2.10.3. Casteo

Es simple y permite controlar el espesor del film, debido a que se utilizan superficies planas. Para aplicarlo se puede emplear esparcidores de la solución de origen o se puede colocar la porción del sistema de origen en el molde. Se debe dejar secando para eliminar el exceso del solvente (Miramont, 2012, p. 15).

2.2.10.4. Prensado

La suspensión se coloca entre dos placas y utilizando una prensa se aplica presión en caliente. Luego se deja enfriar y secar, retirando la placa superior (Miramont, 2012, p. 15).

2.2.10.5. Laminado

Se elabora una película en forma de lámina en una calandra, para su posterior uso (Miramont, 2012, p. 15).

2.2.10.6. Aspersión

Este método es utilizado en muchos casos para reducir el gasto de la solución formadora de películas, la misma que se aplica a una alta presión (60-80 psi) y permite obtener recubrimientos uniformes (Morey & Quinde, 2012, pp. 31-32).

2.2.10.7. Frotación

Para este método se emplea aire comprimido (menos de 5 psi), el cual se aplica en líneas de empaque que poseen rodillo en movimiento, para así lograr una dispersión uniforme. El exceso es removido por los cepillos que se encuentran debajo de los rodillos. Debido a que la cubierta espumosa contiene un poco de agua, el proceso de secado es rápido (Morey & Quinde, 2012, p. 32).

2.2.10.8. Preformación

Este tipo de películas se fabrican a nivel industrial, utilizando técnicas empleadas para ciertos tipos de materiales y para películas no comestibles, tales como la extrusión, el laminado o el moldeado (Morey & Quinde, 2012, p. 32).

2.2.10.9. Otros

Las coberturas en forma líquida se pueden aplicar utilizando pinceles, rodillos, cepillos o mediante un vertido directo sobre la superficie del alimento. En todos los casos se debe tener los aplicadores adecuados (Miramont, 2012, p. 15).

2.2.11. Ventajas y desventajas de los recubrimientos en frutas

2.2.11.1. Ventajas

- Crean una atmósfera modificada entre el recubrimiento y la superficie de las frutas.
- Permiten conservar la pigmentación natural de la fruta por mayor tiempo, evitando de que presente colores indeseables.
- Disminuyen la tasa de respiración de la fruta, lo que permite prolongar la vida postcosecha del producto.
- Son biodegradables.
- No son tóxicos, por lo que pueden ser consumidos junto con la fruta.
- Proporcionan mayor estabilidad a la fruta durante su transporte y posterior almacenamiento.
- Pueden ser elaborados mezclándolos con diferentes aditivos.
- Evitan el desarrollo microbiano (Vázquez & Guerrero, 2013, p. 11).

2.2.11.2. Desventajas

- Si tienen un espesor demasiado grueso, puede llevar al desarrollo de sabores desagradables en la fruta.
- Al modificar la atmósfera interna de la fruta, puede existir el incremento de desórdenes asociados a una alta concentración de CO₂ o una baja de O₂, afectando a los parámetros sensoriales del producto.
- Al retrasar la maduración de la fruta, puede provocar cambios en su sabor (Vázquez & Guerrero, 2013, p. 11).

2.2.12. Glicerina

Es un producto apto para el consumo humano, motivo por el cual es utilizado como aditivo de distintos tipos de alimentos (Lafuente, 2017, p. 6). Se lo utiliza como plastificante en la elaboración de recubrimientos comestibles, permitiendo obtener películas con mayor flexibilidad y elongación (Domínguez & Jiménez, 2012, p. 112).

2.2.13. Almidón

Es un carbohidrato de reserva de los vegetales que está compuesto por dos polisacáridos químicamente distinguibles: la amilosa y la amilopectina, que representan cerca del 98-99% del peso en seco del almidón (Espinosa, 2008, p. 1).

La relación que existe entre la amilosa y la amilopectina, permite que el almidón pueda ser utilizado en la elaboración de películas comestibles, y tiene influencia en las propiedades físicas y mecánicas que éstas presentan (Domínguez & Jiménez, 2012, p. 115).

2.2.14. Frutas perecibles

Las frutas perecibles son aquellas que tienen un corto período de vida postcosecha, en comparación a otras frutas, debido a que son más susceptibles a sufrir ataques por parte de varios tipos de microorganismos, tales como: levaduras, bacterias y mohos; lo que limita su tiempo de comercialización (Luna, 2012, p. 30).

CAPÍTULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. Hipótesis y Especificación de las Variables

3.1.1. Hipótesis General

Con el presente trabajo de investigación, se logrará elaborar recubrimientos comestibles con el quitosano obtenido a partir del micelio de *Aspergillus niger*, los cuales permitirán alargar el tiempo de vida útil de las frutas en al menos 5 días.

3.1.2. Hipótesis Específicas

- El proceso utilizado para la extracción de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*, será el adecuado para obtener de forma eficiente las cantidades necesarias de este biopolímero para su posterior aplicación.
- El quitosano obtenido a partir del micelio de *Aspergillus niger* presentará características físico-químicas óptimas para ser utilizado en el proceso de elaboración de recubrimientos comestibles.
- Se obtendrán recubrimientos comestibles a partir de quitosano, los cuales presentarán las características físico-químicas adecuadas para ser aplicados en la conservación de frutas.
- Los recubrimientos comestibles elaborados a partir de quitosano permitirán alargar la vida útil de las frutas, a temperatura ambiente y de refrigeración.

3.1.3. Identificación de Variables

3.1.3.1. Variables Independientes

- Concentración de almidón
- Concentración de glicerina
- pH
- Temperatura

3.1.3.2. Variables Dependientes

- Cantidad del biopolímero

3.1.3.3. Variables Cualitativas

- Apariencia física de las frutas

3.1.4. Operacionalización de Variables

CATEGORÍA	CONCEPTO	DIMENSIONES	DEFINICIÓN	VARIABLES	INDICADORES	UNIDADES
Obtención de quitosano a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i>	La quitina es el segundo polisacárido más abundante de la naturaleza. Al someterse a una hidrólisis alcalina se produce su desacetilación y se obtiene el quitosano, el cual es un biopolímero que posee excelentes propiedades mecánicas que le permiten formar fibras y películas, y puede ser extraído directamente del micelio del hongo <i>Aspergillus niger</i> .	1. Obtención y purificación del quitosano.	Se establecerá un proceso adecuado para extraer y purificar el quitosano a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i> .	- Temperatura - pH	- Cambio de coloración del micelio	
		2. Caracterización físico-química del quitosano.	Permitirá determinar las características físico-químicas del quitosano extraído.	- Cantidad del biopolímero	- Peso del biopolímero - Solubilidad - Humedad - Cenizas Totales - Viscosidad dinámica	g % % cps
Elaboración de recubrimientos comestibles con quitosano.	Los recubrimientos comestibles son capas que pueden ser consumidas por los seres vivos y que funcionan como barrera a la transferencia de agua, gases y solutos alimenticios.	3. Elaboración de los recubrimientos comestibles.	El quitosano que se obtendrá, se utilizará en conjunto con almidón y glicerina, la cual actuará como plastificante, para elaborar soluciones formadoras de recubrimientos comestibles.	- Concentración de quitosano - Concentración de almidón - Concentración de glicerina		
		4. Caracterización físico-química de los recubrimientos comestibles.	Permitirá analizar las propiedades físico-químicas de los recubrimientos obtenidos.	- Calidad de los recubrimientos comestibles	- Caracterización física - Densidad - pH	g/ml

Observación de la funcionalidad de los recubrimientos comestibles con quitosano como conservantes de frutas	Los recubrimientos comestibles con quitosano prolongan el estado de frescura de diversos tipos de frutas perecibles, permitiendo conservar su calidad nutricional.	5. Caracterización de la conservación de las frutas.	Permitirá conocer el tiempo de vida útil de los recubrimientos a temperatura ambiente y de refrigeración.	- Color - Apariencia física de las frutas	- Tiempo de conservación	días
---	--	--	---	--	--------------------------	------

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

3.1.5. Matriz de Consistencia

PROBLEMA GENERAL		OBJETIVO GENERAL		HIPÓTESIS GENERAL	
¿El quitosano extraído a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i> , se podrá aplicar para la elaboración de recubrimientos comestibles que permitan alargar la vida útil de las frutas?		Obtener quitosano a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i> para su aplicación en la elaboración de recubrimientos comestibles que permitan conservar frutas.		Con el presente trabajo de investigación, se lograrán elaborar recubrimientos comestibles con el quitosano obtenido a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i> , los cuales permitirán alargar el tiempo de vida útil de las frutas en al menos 5 días.	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLES ESPECÍFICAS	MÉTODOS DE ANÁLISIS	
<ul style="list-style-type: none"> ¿Cuál será el proceso adecuado para extraer de forma eficiente quitosano a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i>? 	<ul style="list-style-type: none"> Establecer el proceso adecuado para la extracción de quitosano a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> El proceso utilizado para la extracción de quitosano a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i>, será el adecuado para obtener de forma eficiente las cantidades necesarias de este biopolímero para su posterior aplicación. 	<ul style="list-style-type: none"> Cantidad del biopolímero Solubilidad Humedad 	<ul style="list-style-type: none"> Pesaje del biopolímero Prueba de solubilidad en ácidos diluidos Secado y pesaje de la muestra 	

<ul style="list-style-type: none"> • ¿Qué características físico-químicas presenta el quitosano obtenido a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i>? • ¿Se podrán obtener recubrimientos comestibles a partir de quitosano, y qué características físico-químicas presentarán? • ¿Podrán los recubrimientos comestibles obtenidos a partir de quitosano, alargar la vida útil de las frutas a temperatura ambiente y de refrigeración? 	<ul style="list-style-type: none"> • Determinar las características físico-químicas del quitosano obtenido a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i>. • Obtener recubrimientos comestibles a partir de quitosano y analizar sus características físico-químicas. • Comprobar la funcionalidad de los recubrimientos comestibles obtenidos a partir de quitosano como conservantes de frutas y determinar su tiempo de vida útil a temperatura ambiente y de refrigeración. 	<ul style="list-style-type: none"> • El quitosano obtenido a partir del micelio de <i>Aspergillus niger</i> presentará características físico-químicas óptimas para ser utilizado en el proceso de elaboración de recubrimientos comestibles. • Se obtendrán recubrimientos comestibles a partir de quitosano, los cuales presentarán las características físico-químicas adecuadas para ser aplicados en la conservación de frutas. • Los recubrimientos comestibles elaborados a partir de quitosano permitirán alargar la vida útil de las frutas, a temperatura ambiente y de refrigeración. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ceniza • Densidad • Viscosidad • pH • Color de las frutas • Apariencia de las frutas • Tiempo de conservación 	<ul style="list-style-type: none"> • Calcinación y pesaje de la muestra • Medición con picnómetro • Medición en viscosímetro • Medición con pH-metro • Observación • Observación • Medición del tiempo
---	--	---	---	---

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

3.2. Tipo y Diseño de Investigación

3.2.1. Tipo de Investigación

El tipo de investigación a realizar será descriptiva, debido a que se van a registrar y analizar los datos obtenidos de los estudios de caracterización del quitosano extraído y de los recubrimientos comestibles elaborados a partir de éste, todo esto en base a las hipótesis planteadas en la investigación.

3.2.2. Diseño de Investigación

Esta investigación tendrá un diseño experimental y se basará en la obtención de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger* y su aplicación en la elaboración de recubrimientos comestibles que permitan conservar frutas.

Para realizar la parte experimental de la investigación, primero se buscará establecer un proceso adecuado y eficiente para extraer el quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*, para posteriormente analizar sus características físico-químicas.

Una vez obtenido el quitosano, se elaborarán soluciones formadoras de recubrimientos comestibles, al mezclar el quitosano con almidón y glicerina, y luego se procederá a caracterizar estos recubrimientos para determinar sus propiedades físico-químicas. Se seleccionarán las frutas con mejores características organolépticas y se les aplicarán los recubrimientos por inmersión.

Finalmente, se observará la funcionalidad de estos recubrimientos como conservantes de frutas a temperatura ambiental y de refrigeración, lo que permitirá conocer el tiempo de vida útil que poseen en ambas condiciones de almacenamiento.

3.3. Unidad de Análisis

Las unidades del análisis experimental de esta investigación fueron: el quitosano que se logró extraer a partir del micelio de *Aspergillus niger*, los recubrimientos comestibles elaborados con el quitosano en mezcla con almidón y glicerina, y las frutas que se utilizaron para evaluar la funcionalidad de estos recubrimientos como conservantes.

3.4. Población de Estudio

La población de estudio fueron los micelios de *Aspergillus niger* utilizados como materia prima en el proceso de extracción y el quitosano que se obtuvo a partir de éstos, y que se emplearon en la elaboración de recubrimientos comestibles para la conservación de frutas.

3.5. Tamaño de la Muestra

Para la extracción del quitosano se utilizaron 9 muestras de micelio seco de *Aspergillus niger* de 20 g cada una.

En la elaboración de los recubrimientos comestibles se trabajó con muestras de 2.5 g del quitosano obtenido.

3.6. Selección de Muestra

Para la extracción de quitosano se realizó una inspección visual del micelio de *Aspergillus niger* y se tomaron 9 muestras de 20 g cada una.

En la elaboración de los recubrimientos comestibles se utilizaron las muestras de quitosano que presentaban las mejores características de calidad.

3.7. Técnicas de Recolección de Datos

3.7.1. Técnicas

Se utilizó como técnica de recolección de datos la observación del tipo experimental, método por el cual se logró registrar la información generada en cada análisis realizado durante la investigación.

Una técnica complementaria fue el análisis documental, mediante el cual se pudo recolectar datos de diferentes fuentes bibliográficas, que sirvieron para comprobar que los datos obtenidos en cada análisis son los correctos.

3.7.2. Lugar de la Investigación

La recolección de datos del presente trabajo de titulación se realizó en los Laboratorios de: Química Analítica, Química Instrumental y Procesos Industriales, de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH; en donde se utilizaron diferentes equipos y materiales para medir y controlar las variables más importantes del estudio. Y al final, los datos obtenidos en esta investigación se registraron en tablas.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de Resultados

4.1.1. Extracción del Quitosano

Partiendo de los métodos de extracción de quitosano expuestos por (Romero, 2011, pp. 16-19) y (Alzate, et al, 2015, p. 114), se desarrolló un procedimiento (Anexo D) que consistía en tratar al micelio de *Aspergillus niger* con hidróxido de sodio (20, 35, 50%) y ácido clorhídrico (5, 10, 15%). El rendimiento del polímero obtenido se determinó utilizando la Ecuación I:

$$\% R = \frac{m_{\text{quitosano}}}{m_{\text{micelio}}} * 100$$

$$\% R = \frac{7.355}{20} * 100$$

$$\% R = 36.78 \%$$

Donde:

$m_{\text{quitosano}}$ = masa del quitosano extraído, en gramos.

m_{micelio} = masa de la muestra de micelio, en gramos.

$\% R$ = porcentaje de rendimiento del quitosano.

Los resultados del proceso de extracción de quitosano a partir de muestras del micelio de *Aspergillus niger*, a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico:

Tabla 1-4: Cantidad de Quitosano Extraído en Pruebas

Muestras	Concentración de Reactivos	Temperatura (°C)	m_{micelio} (g)	m_{quitosano} (g)	% R
M 1	NaOH 20 %	90 - 95	20	6.03	30.15
	HCl 5 %				
M 2	NaOH 35 %	90 - 95	20	6.94	34.68
	HCl 10 %				
M 3	NaOH 50 %	90 - 95	20	7.36	36.78
	HCl 15 %				

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

$m_{\text{quitosano}}$ = masa del quitosano extraído, en gramos.

m_{micelio} = masa de la muestra de micelio, en gramos.

% R = porcentaje de rendimiento del quitosano.

4.1.2. Caracterización del Quitosano

4.1.2.1. Caracterización por Espectroscopía Infrarrojo

La caracterización por espectroscopía infrarrojo se realizó siguiendo el procedimiento detallado en el Anexo E. Las gráficas generadas por el espectrofotómetro infrarrojo para las muestras de quitosano, a diferentes concentraciones de hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, son las siguientes:

• **Muestra de Quitosano (M1) [NaOH 20 % - HCl 5 %]**

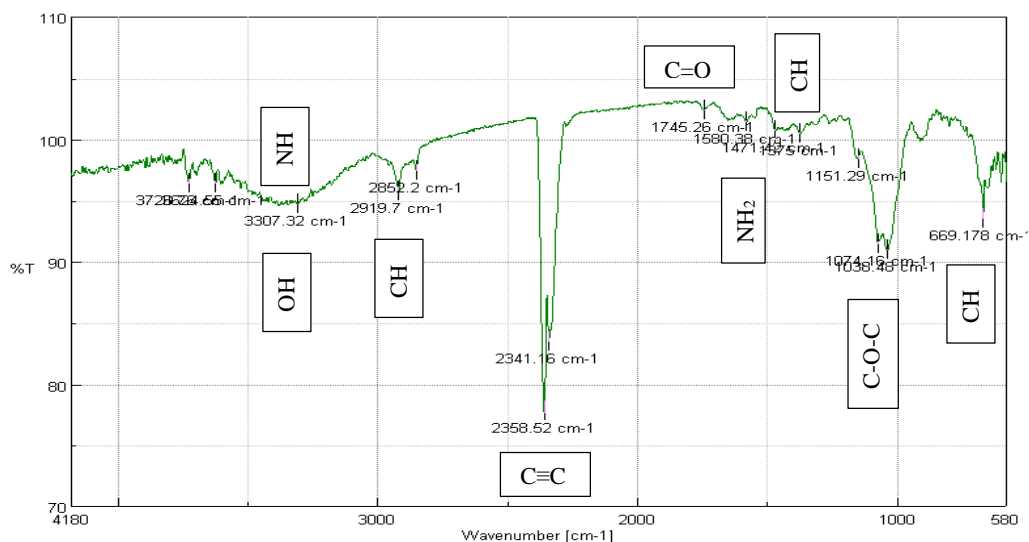


Gráfico 1-4: Espectro Infrarrojo de muestra de Quitosano (M1)

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Tabla 2-4: Grupos Funcionales de la muestra de Quitosano (M1)

Grupos Funcionales	Compuestos	Banda de absorción (cm ⁻¹)	% T
CH	Alquenos	669.18	94.85
	Alcanos	1375	100.48
		2919.7	95.79
C-O-C	Éteres, ésteres, ácidos carboxílicos y alcoholes	1074.16	91.47
NH ₂	Aminas primarias y amidas	1580.38	101.44
C=O	Aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos	1745.26	102.39
C≡C	Alquinos	2358.52	77.85
OH	Alcoholes y ácidos carboxílicos	3307.32	94.77
NH	Aminas primarias y secundarias	3307.32	94.77

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

% T = porcentaje de transmitancia.

En el Gráfico 1-4 se puede observar que el espectro de la Muestra 1 presenta los picos de absorción que identifican a los grupos funcionales característicos del quitosano, pero la longitud de éstos es menor al que presentan los espectros de las otras muestras.

- **Muestra de Quitosano (M2) [NaOH 35 % - HCl 10 %]**

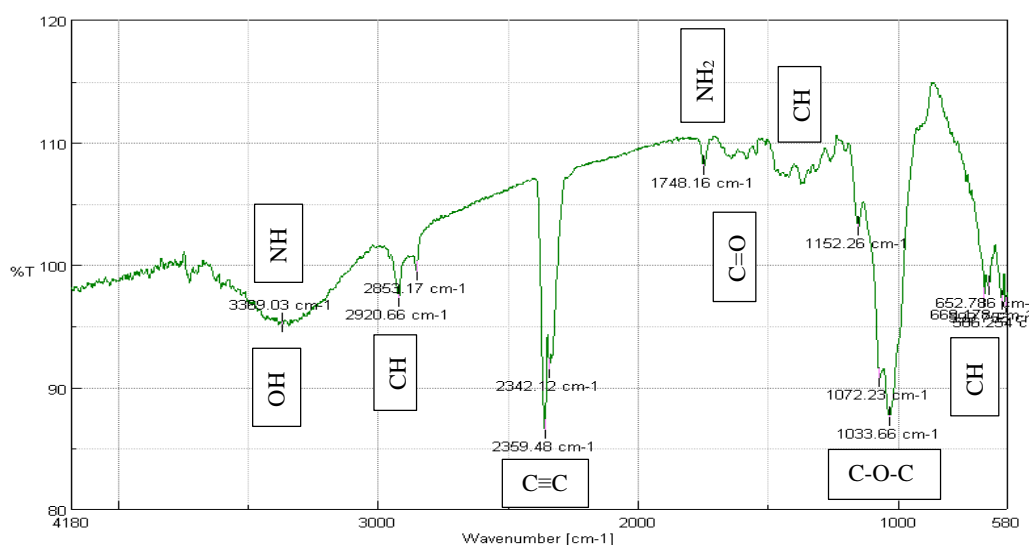


Gráfico 2-4: Espectro Infrarrojo de muestra de Quitosano (M2)

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Tabla 3-4: Grupos Funcionales de la muestra de Quitosano (M2)

Grupos Funcionales	Compuestos	Banda de absorción (cm ⁻¹)	% T
CH	Alquenos	668.18	98.03
	Alcanos	1353	106.92
		2920.66	97.34
C-O-C	Éteres, ésteres, ácidos carboxílicos y alcoholes	1072.23	90.77
NH ₂	Aminas primarias y amidas	1600	109
C=O	Aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos	1748.16	108.08
C≡C	Alquinos	2359.48	86.52
OH	Alcoholes y ácidos carboxílicos	3369.03	95.28
NH	Aminas primarias y secundarias	3369.03	95.28

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

% T = porcentaje de transmitancia.

El espectro de la Muestra 2 también presenta picos de absorción correspondientes a los grupos funcionales característicos del quitosano, pero la longitud de éstos es un poco mayor a los representados en el espectro de la Muestra 1.

- **Muestra de Quitosano (M3) [NaOH 50 % - HCl 15 %]**

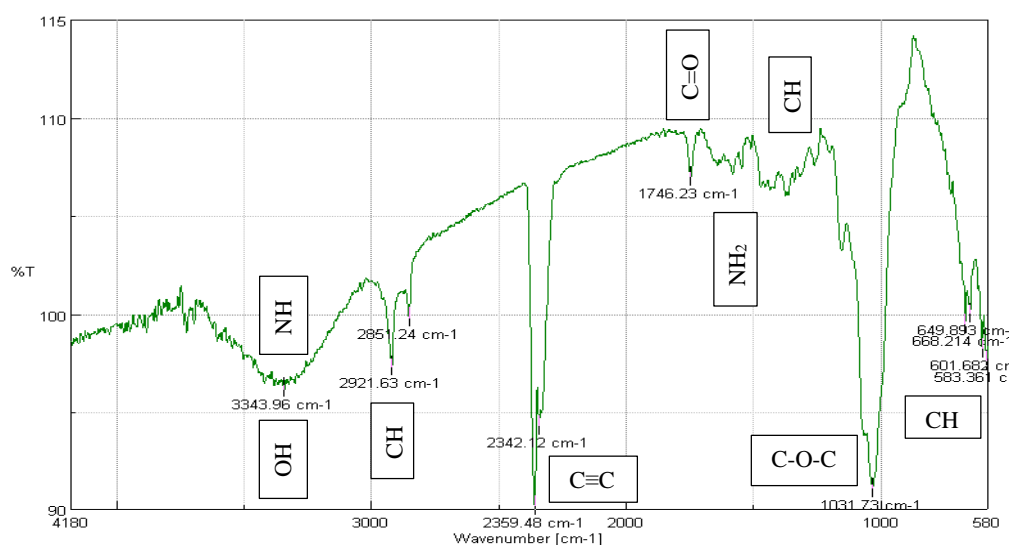


Gráfico 3-4: Espectro Infrarrojo de muestra de Quitosano (M3)

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Tabla 4-4: Grupos Funcionales de la muestra de Quitosano (M3)

Grupos Funcionales	Compuestos	Banda de absorción (cm ⁻¹)	% T
CH	Alquenos	601.68	98.22
	Alcanos	1383.72	95.45
		2921.63	97.35
C-O-C	Éteres, ésteres, ácidos carboxílicos y alcoholes	1139.53	103
NH ₂	Aminas primarias y amidas	1581.40	107.05
C=O	Aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos	1746.23	107.01
C=C	Alquinos	2359.48	90.18
OH	Alcoholes y ácidos carboxílicos	3343.96	96.23
NH	Aminas primarias y secundarias	3343.96	96.23

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

% T = porcentaje de transmitancia.

Mientras que, en el espectro infrarrojo de la Muestra 3, se puede observar que los picos de absorción de los grupos funcionales tienen una mayor longitud que los que se presentan en los espectros de las otras muestras.

Comparando los espectros IR de las muestras obtenidas, con el espectro de una muestra de quitosano comercial encontrada en fuentes bibliográficas (Anexo B), se observa que tienen una gran similitud; lo que confirma la extracción del biopolímero.

4.1.2.2. Grado de N-Acetilación y Grado de Desacetilación

Para determinar el grado de N-Acetilación del quitosano se utilizó la Ecuación II (Anexo E), propuesta por (Peniche, 2006, p. 15), la cual toma en cuenta la correlación existente entre la banda correspondiente a la amida III (A_{1320}) y la banda de los grupos metilo (A_{1420})

$$\text{Grado de N-Acetilación} = 31.92 * \left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 12.2$$

$$\text{Grado de N-Acetilación} = 31.92 * \left(\frac{107.09}{106.45} \right) - 12.2$$

$$\text{Grado de N-Acetilación} = 19.91$$

El grado de desacetilación de las muestras se calculó con la Ecuación III (Anexo E):

$$\text{Grado de Desacetilación} = 100 - \text{Grado de N-Acetilación}$$

$$\text{Grado de Desacetilación} = 100 - 19.91$$

$$\text{Grado de Desacetilación} = 80.09$$

Tabla 5-4: Grado de N-Acetilación y Desacetilación de las Muestras

Muestras de Quitosano		Grado de N-Acetilación	Grado de Desacetilación
M 1	NaOH 20 % (p/v)	20.03	79.97
	HCl 5 % (v/v)		
M 2	NaOH 35 % (p/v)	19.99	80.01
	HCl 10 % (v/v)		
M 3	NaOH 50 % (p/v)	19.91	80.09
	HCl 15 % (v/v)		

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

4.1.2.3. Solubilidad

Las pruebas de solubilidad del quitosano extraído se realizaron siguiendo los procedimientos explicados por (Luna, 2012, p. 49) y (López, 2014, p. 26).

Tabla 6-4: Pruebas de Solubilidad del Quitosano

Solventes	Muestras		
	M 1	M 2	M 3
Ácido acético 10 % (v/v)	Soluble	Soluble	Soluble
Ácido clorhídrico 1 % (v/v)	Soluble	Soluble	Soluble
Ácido clorhídrico 10 % (v/v)	Insoluble	Insoluble	Insoluble
Ácido cítrico 10 % (p/v)	Soluble	Soluble	Soluble
Ácido sulfúrico 1 % (v/v)	Insoluble	Insoluble	Insoluble

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

M1 = primera muestra de quitosano

M2 = segunda muestra de quitosano

M3 = tercera muestra de quitosano

4.1.2.4. Humedad

Para determinar el porcentaje de humedad de la muestra de quitosano se realizó el procedimiento explicado en el Anexo G, el cual se desarrolló a partir del método expuesto por (Luna, 2012, p. 48); y con los datos obtenidos se utilizó la Ecuación IV:

$$\% H = \frac{m_{\text{muestra}} - (m_{\text{crisol}} + \text{muestra seca} - m_{\text{crisol}})}{m_{\text{muestra}}} * 100$$

$$\% H = \frac{5 - (39.4170 - 34.9882)}{5} * 100$$

$$\% H = 11.42 \%$$

Donde:

m_{muestra} = masa de la muestra de quitosano, en gramos.

m_{crisol} = masa del crisol seco, en gramos.

$m_{\text{crisol}} + \text{muestra seca}$ = sumatoria de la masa del crisol y de la muestra seca de quitosano, en gramos.

% H = porcentaje de humedad de la muestra de quitosano.

Tabla 7-4: Porcentaje de Humedad de la Muestra de Quitosano

Muestra	m_{muestra} (g)	m_{muestra seca} (g)	m_{crisol} (g)	m_{crisol + muestra seca} (g)	% H
M 3	5	4.43	34.99	39.42 g	11.42

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

$m_{muestra}$ = masa de la muestra de quitosano, en gramos.

m_{crisol} = masa del crisol seco, en gramos.

$m_{crisol + muestra seca}$ = sumatoria de la masa del crisol y de la muestra seca de quitosano, en gramos.

% H = porcentaje de humedad de la muestra de quitosano.

4.1.2.5. Cenizas Totales

Para determinar el porcentaje de las cenizas totales de la muestra de quitosano, se realizó el procedimiento explicado en el Anexo H, el cual se desarrolló a partir del método expuesto por (Luna, 2012, p. 48); y con los datos obtenidos se utilizó la Ecuación V:

$$\% CT = \frac{m_{crisol + cenizas} - m_{crisol}}{m_{crisol + muestra} - m_{crisol}} * 100$$

$$\% CT = \frac{37.2552 - 37.1929}{41.6195 - 37.1929} * 100$$

$$\% CT = 1.41 \%$$

Donde:

m_{crisol} = masa del crisol seco, en gramos.

$m_{crisol + muestra seca}$ = sumatoria de la masa del crisol y de la muestra seca de quitosano, en gramos.

$m_{crisol + cenizas}$ = sumatoria de la masa del crisol y de las cenizas de la muestra, en gramos.

% CT = porcentaje de cenizas totales de la muestra de quitosano.

Tabla 8-4: Porcentaje de Cenizas Totales en la Muestra de Quitosano

Muestra	m_{muestra seca} (g)	m_{crisol} (g)	m_{crisol + muestra seca} (g)	m_{crisol + cenizas} (g)	m_{cenizas} (g)	% CT
M 3	4.43	37.19	41.62	37.26	0.07	1.41

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

$m_{\text{muestra seca}}$ = masa de la muestra de quitosano, en gramos.

m_{crisol} = masa del crisol seco, en gramos.

$m_{\text{crisol} + \text{muestra seca}}$ = sumatoria de la masa del crisol y de la muestra seca de quitosano, en gramos.

$m_{\text{crisol} + \text{cenizas}}$ = sumatoria de la masa del crisol y de las cenizas de la muestra, en gramos.

% CT = porcentaje de cenizas totales de la muestra de quitosano.

4.1.2.6. Densidad de las Soluciones

Para determinar la densidad de las soluciones de ácido acético y quitosano a diferentes concentraciones, se realizó el pesaje del picnómetro seco y con las muestras. Con los datos obtenidos se utilizó la Ecuación VI (Anexo I):

$$\rho = \frac{m_{\text{picnómetro} + \text{muestra}} - m_{\text{picnómetro}}}{V_{\text{picnómetro}}}$$

$$\rho = \frac{22.1694 - 11.4094}{10}$$

$$\rho = 1.076 \text{ g/mL}$$

Donde:

$m_{\text{picnómetro}}$ = masa del picnómetro seco, en gramos.

$m_{\text{picnómetro} + \text{muestra}}$ = masa del picnómetro con la muestra, en gramos.

$V_{\text{picnómetro}}$ = volumen del picnómetro, en mililitros.

ρ = densidad de la solución, en gramos/mililitros.

Tabla 9-4: Densidad de las Soluciones

Soluciones	Concentraciones (g/mL)	ρ (g/mL)
Ácido Acético 1% (v/v)	0	1.026
Ácido Acético + Quitosano	0.002	1.034
	0.004	1.049
	0.006	1.057
	0.008	1.065
	0.01	1.076

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

ρ = densidad de la solución, en gramos/mililitros.

4.1.2.7. Viscosidad Dinámica

Para determinar la viscosidad dinámica de las soluciones de quitosano a diferentes concentraciones, se realizó el procedimiento explicado en el Anexo I, el cual se desarrolló tomando como referencia el método expuesto por (Luna, 2012, p. 50).

Tabla 10-4: Viscosidad Dinámica de las Soluciones

Soluciones	Concentraciones (g/mL)	η (cps)
Ácido Acético 1% (v/v)	0	1171.5
Ácido Acético + Quitosano	0.002	1466.1
	0.004	1770.9
	0.006	2071.3
	0.008	2382.6
	0.01	2700.9

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

η = viscosidad dinámica de la solución, en centipoise (cps).

4.1.2.8. Viscosidad Cinemática

La viscosidad cinemática de las soluciones de ácido acético y quitosano, se determinaron mediante la Ecuación VII (Anexo I):

$$v = \frac{\eta}{\rho}$$

$$v = \frac{2700.9}{1.076}$$

$$v = 2510.13 \text{ cst}$$

Donde:

η = viscosidad dinámica de la solución, en centipoise (cps).

ρ = densidad de la solución, en gramos/mililitros.

v = viscosidad cinemática de la solución, en centistokes (cst).

Tabla 11-4: Viscosidad Cinemática de las Soluciones

Soluciones	Concentraciones (g/mL)	v (cst)
Ácido Acético 1% (v/v)	0	1141.81
Ácido Acético + Quitosano	0.002	1417.89
	0.004	1688.18
	0.006	1959.60
	0.008	2237.18
	0.01	2510.13

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

v = viscosidad cinemática de la solución, en centistokes (cst).

4.1.2.9. Viscosidad Relativa

La viscosidad relativa de las soluciones, se determinó con la Ecuación VIII (Anexo I):

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta'}$$

$$\eta_r = \frac{2700.9}{1171.5}$$

$$\eta_r = 2.31$$

Donde:

η = viscosidad dinámica de la solución de quitosano, en centipoise (cps).

η' = viscosidad dinámica de la solución del solvente puro, en centipoise (cps).

η_r = viscosidad relativa de la solución de quitosano.

Tabla 12-4: Viscosidad Relativa de las Soluciones de Quitosano

Solución	Concentraciones (g/mL)	η_r
Ácido Acético + Quitosano	0.002	1.25
	0.004	1.51
	0.006	1.77
	0.008	2.03
	0.01	2.31

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

η_r = viscosidad relativa de la solución de quitosano.

4.1.2.10. Viscosidad Específica

Los valores viscosidad específica de las soluciones de quitosano se obtuvieron, al aplicar la Ecuación IX (Anexo I):

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$

$$\eta_{sp} = 2.3055 - 1$$

$$\eta_{sp} = 1.31$$

Donde:

η_r = viscosidad relativa de la solución de quitosano.

η_{sp} = viscosidad específica de la solución de quitosano.

Tabla 13-4: Viscosidad Específica de las Soluciones de Quitosano

Solución	Concentraciones (g/mL)	η_{sp}
Ácido Acético + Quitosano	0.002	0.25
	0.004	0.51
	0.006	0.77
	0.008	1.03
	0.01	1.31

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

η_{sp} = viscosidad específica de la solución de quitosano.

4.1.2.11. Viscosidad Reducida

La viscosidad reducida de cada solución de quitosano, se calculó con la Ecuación X (Anexo I):

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C}$$

$$\eta_{\text{red}} = \frac{1.3055}{0.01}$$

$$\eta_{\text{red}} = 130.55 \text{ mL/g}$$

Donde:

η_{sp} = viscosidad específica de la solución de quitosano.

C = concentración de la solución de quitosano, en g/mL.

η_{red} = viscosidad reducida de la solución de quitosano, en mL/g.

Tabla 14-4: Viscosidad Reducida de las Soluciones de Quitosano

Solución	Concentraciones (g/mL)	η_{red} (mL/g)
Ácido Acético + Quitosano	0.002	125.75
	0.004	127.93
	0.006	128.02
	0.008	129.23
	0.01	130.55

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

η_{red} = viscosidad reducida de la solución de quitosano, en mL/g.

Gráfico de Viscosidad Reducida vs Concentración:

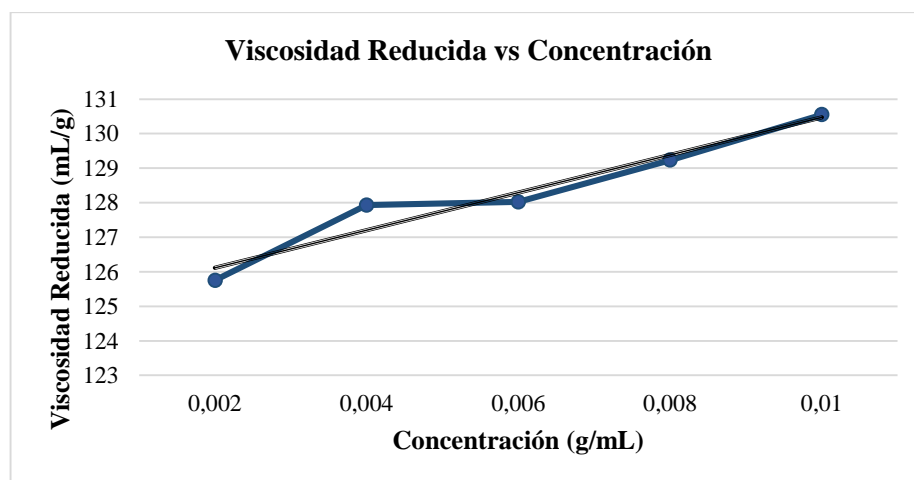


Gráfico 4-4: Viscosidad reducida vs Concentración de las soluciones

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

4.1.2.12. Viscosidad Intrínseca

Los datos de viscosidad reducida y concentración representados en el Gráfico 5-4, se utilizaron para determinar la viscosidad intrínseca por el método de regresión lineal simple:

$$Y = a + bX$$

$$Y = 125.03 + 545X$$

Donde:

a = viscosidad intrínseca del quitosano.

b = pendiente de la recta.

X = concentración de las soluciones, en g/mL

Y = viscosidad reducida de las soluciones, en mL/g

Tabla 15-4: Viscosidad Intrínseca

a - $[\eta]$ (ml/g)	b	R ²
125.03	3317	0.97

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

a - $[\eta]$ = viscosidad intrínseca del quitosano.

b = pendiente de la recta.

R = coeficiente de correlación múltiple.

4.1.2.13. Peso Molecular

El peso molecular aproximado del quitosano extraído, se calculó utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = k * MV^\alpha$$

$$125.026 = 1.81 \times 10^{-3} * MV^{0.93}$$

$$MV = 159798.16 \text{ g/mol}$$

Donde:

$[\eta]$ = viscosidad intrínseca del quitosano, en mililitros/gramos.

k = constante empírica del polímero, el solvente y la temperatura.

α = constante empírica del polímero, el solvente y la temperatura.

MV = peso molecular del quitosano, en gramos/mol.

Tabla 16-4: Peso Molecular del Quitosano

Muestra	MV (g/mol)
M 3	1.60×10^5

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

MV = peso molecular del quitosano, en gramos/mol.

4.1.3. Caracterización de los Recubrimientos Comestibles

4.1.3.1. Caracterización Física

Características físicas de los recubrimientos comestibles elaborados:

Tabla 17-4: Características Físicas de los Recubrimientos Comestibles

Soluciones		Volumen	Descripción
A	20% Quitosano	25 mL	Se formó una película fina y quebradiza, la cual se deshizo al ser despegada de la superficie de moldeo.
	80% Almidón		
	2% Glicerina		
B	50% Quitosano	25 mL	La película que se formó era casi tan fina como la del recubrimiento anterior, se deshizo al ser retirada de la superficie en que fue moldeada.
	50% Almidón		
	2% Glicerina		
C	80% Quitosano	25 mL	La película formada tenía una buena consistencia, pudo ser retirada de la superficie de moldeo. Presentaba resistencia a la manipulación.
	20% Almidón		
	2% Glicerina		

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

4.1.3.2. Densidad de los Recubrimientos Comestibles

Para determinar la densidad de las soluciones formadoras de recubrimientos, se realizó el pesaje del picnómetro seco y con las muestras. Con los datos obtenidos se utilizó la Ecuación VI (Anexo I):

$$\rho = \frac{m_{\text{picnómetro + muestra}} - m_{\text{picnómetro}}}{V_{\text{picnómetro}}}$$

$$\rho = \frac{22.4331 - 11.4094}{10}$$

$$\rho = 1.302 \text{ g/ml}$$

Donde:

$m_{\text{picnómetro}}$ = masa del picnómetro seco, en gramos.

$m_{\text{picnómetro + muestra}}$ = masa del picnómetro con la muestra, en gramos.

$V_{\text{picnómetro}}$ = volumen del picnómetro, en mililitros.

ρ = densidad de la solución, en gramos/mililitros.

Tabla 18-4: Densidad de las Soluciones de Recubrimientos Comestibles

Soluciones	ρ (g/mL)
A	1.255
B	1.273
C	1.302

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

4.1.3.3. pH

Valores de pH de las soluciones formadoras de recubrimientos:

Tabla 19-4: pH de las Soluciones de Recubrimientos Comestibles

Soluciones	pH
A	3.98
B	3.82
C	3.75

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

4.1.3.4. Análisis Microbiológico

Tabla 20-4: Resultados del Análisis Microbiológico del Recubrimiento Comestible

Solución	Parámetros	Método	Resultado
C	Coliformes totales UFC/mL	Siembra en masa	Ausencia
	<i>Escherichia coli</i> UFC/mL	Siembra en masa	Ausencia
	Aerobios mesófilos UFC/mL	Siembra en masa	10
	Mohos y levaduras UFC/mL	Siembra en masa	Ausencia

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

4.1.3.5. Caracterización por Espectroscopía Infrarrojo

Para el análisis por espectro infrarrojo se seleccionó una muestra del recubrimiento comestible formado a partir de la solución C, y el espectro obtenido fue el siguiente:

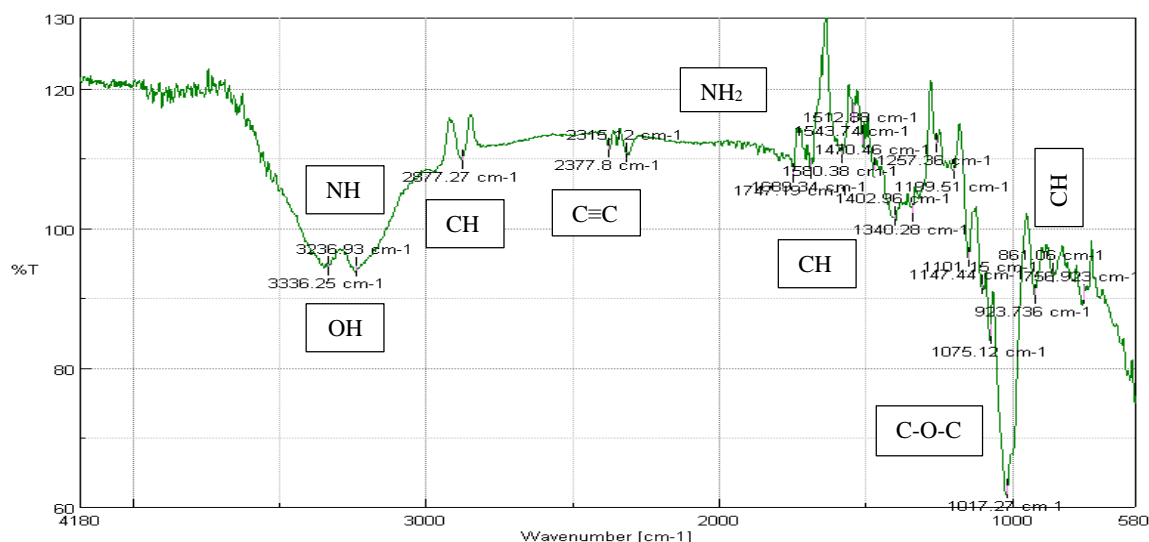


Gráfico 5-4: Espectro Infrarrojo del Recubrimiento Comestible

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Tabla 21-4: Grupos Funcionales en Muestra del Recubrimiento Comestible

Grupos Funcionales	Compuestos	Banda de absorción (cm ⁻¹)	% T
CH	Alquenos	756.92	90.41
	Alquenos	923.74	90.46
	Alcanos	1340.28	102.23
		2877.27	109.80
C-O-C	Éteres, ésteres, ácidos carboxílicos y alcoholes	1017.27	62.63

NH ₂	Aminas primarias y amidas	1580.38	110.51
C=O	Amidas, aldehídos y cetonas	1689.34	108.35
	Aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos	1747.19	107.78
C≡C	Alquinos	2315.12	110.68
OH	Alcoholes y ácidos carboxílicos	3236.93	94.44
NH	Aminas primarias y secundarias	3336.25	94.50

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

% T = porcentaje de transmitancia.

4.1.4. Funcionalidad de los Recubrimientos Comestibles

4.1.4.1. Evaluación Sensorial de las Frutas

Para la aplicación de los recubrimientos comestibles se utilizaron fresas y moras, las cuales fueron observadas a diario para determinar la eficiencia de los recubrimientos como conservantes. De acuerdo a su aspecto físico, a las frutas se les asignó una calificación del 1 al 6, como se encuentra explicado en la Tabla XII (Anexo L).

Tabla 22-4: Evaluación Sensorial en Fresas

Solución	Temperatura	Días de Conservación								
		0	2	4	6	8	10	12	14	16
SR	Ambiente 20 °C	6	3	-	-	-	-	-	-	-
C		6	5	4	3	-	-	-	-	-
SR	Refrigeración 4 °C	6	5	5	4	3	3	-	-	-
C		6	6	5	5	4	4	3	3	3

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

SR = sin recubrimiento.

Tabla 23-4: Evaluación Sensorial en Moras

Solución	Temperatura	Días de Conservación						
		0	2	4	6	8	10	12
SR	Ambiente 20 °C	6	3	-	-	-	-	-
C		6	5	4	3	-	-	-
SR	Refrigeración 4 °C	6	5	4	3	2	-	-
C		6	6	5	5	4	4	3

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

SR = sin recubrimiento.

4.1.4.2. Peso Promedio de las Frutas

Para determinar la pérdida de peso de las frutas con el recubrimiento, se trabajó con muestras de 5 frutas, las cuales fueron pesadas a diario. Y se calculó el peso promedio utilizando la Ecuación XII (Anexo L):

$$\bar{x} = \frac{(P1 + P2 + P3 + P4 + P5)}{n}$$

$$\bar{x} = \frac{(42.1810 + 42.1490 + 42.1419 + 42.1160 + 42.1171)}{5}$$

$$\bar{x} = 42.14 \text{ g}$$

Donde:

P_n = peso de cada fruta, en gramos.

n = número de frutas pesadas.

\bar{x} = peso promedio diario de las frutas, en gramos.

Tabla 24-4: Peso Promedio de las Fresas

Temperatura	Ambiente 20 °C		Refrigeración 4 °C	
	SR	C	SR	C
Días	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0	40.92 g	36.39 g	45.28 g	49.33 g
1	38.17 g	34.45 g	43.68 g	48.48 g
2	35.72 g	32.66 g	42.18 g	47.69 g
3	33.59 g	31.03 g	40.80 g	46.94 g
4	-	29.55 g	39.52 g	46.25 g
5	-	28.22 g	38.35 g	45.62 g
6	-	27.05 g	37.29 g	45.03 g
7	-	26.02 g	36.34 g	44.50 g
8	-	-	35.49 g	44.03 g
9	-	-	34.75 g	43.60 g
10	-	-	34.12 g	43.24 g
11	-	-	-	42.92 g
12	-	-	-	42.66 g
13	-	-	-	42.45 g

14	-	-	-	42.29 g
15	-	-	-	42.19 g
16	-	-	-	42.14 g

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

SR = sin recubrimiento.

\bar{x} = peso promedio diario de las frutas, en gramos.

Tabla 25-4: Peso Promedio de las Moras

Temperatura	Ambiente 20 °C		Refrigeración 4 °C		
	Soluciones	SR	C	SR	C
Días	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}	\bar{x}
0	10.11 g	12.13 g	8.10 g	11.12 g	
1	9.55 g	11.64 g	7.81 g	10.93 g	
2	9.05 g	11.39 g	7.61 g	10.75 g	
3	-	11.16 g	7.49 g	10.68 g	
4	-	10.95 g	7.36 g	10.52 g	
5	-	10.76 g	7.25 g	10.37 g	
6	-	10.59 g	7.16 g	10.23 g	
7	-	10.44 g	7.09 g	10.10 g	
8	-	-	-	9.98 g	
9	-	-	-	9.87 g	
10	-	-	-	9.77 g	
11	-	-	-	9.68 g	
12	-	-	-	9.60 g	

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

SR = sin recubrimiento.

\bar{x} = peso promedio diario de las frutas, en gramos.

4.1.2.3. Pérdida de Peso de las Frutas

Utilizando el peso promedio diario de las frutas, se calculó su porcentaje de pérdida de peso mediante la Ecuación XIII (Anexo L):

$$\% Pp = \frac{(P_{\text{día 0}} - P_{\text{día n}})}{P_{\text{día 0}}} * 100$$

$$\% Pp = \frac{(49.3314 - 42.1410)}{49.3314} * 100$$

$$\% Pp = 14.58 \%$$

Donde:

$P_{\text{día 0}}$ = peso promedio de las frutas el primer día de evaluación, en gramos.

$P_{\text{día n}}$ = peso promedio de las frutas en “n” día de evaluación, en gramos.

$\% Pp$ = porcentaje de pérdida de peso de las frutas.

Tabla 26-4: Pérdida de Peso de las Fresas

Temperatura	Ambiente 20 °C		Refrigeración 4 °C		
	Soluciones	SR	C	SR	C
Días	%Pp	%Pp	%Pp	%Pp	%Pp
0	-	-	-	-	-
1	6.72	5.33	3.54	1.72	
2	12.69	10.24	6.84	3.34	
3	17.90	14.72	9.90	4.84	
4	-	18.79	12.72	6.24	
5	-	22.44	15.30	7.53	
6	-	25.67	17.64	8.71	
7	-	28.47	19.75	9.79	
8	-	-	21.62	10.76	
9	-	-	23.25	11.61	
10	-	-	24.64	12.36	
11	-	-	-	13.00	
12	-	-	-	13.53	
13	-	-	-	13.95	
14	-	-	-	14.27	
15	-	-	-	14.48	
16	-	-	-	14.58	

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

SR = sin recubrimiento.

$\% Pp$ = porcentaje de pérdida de peso de las frutas.

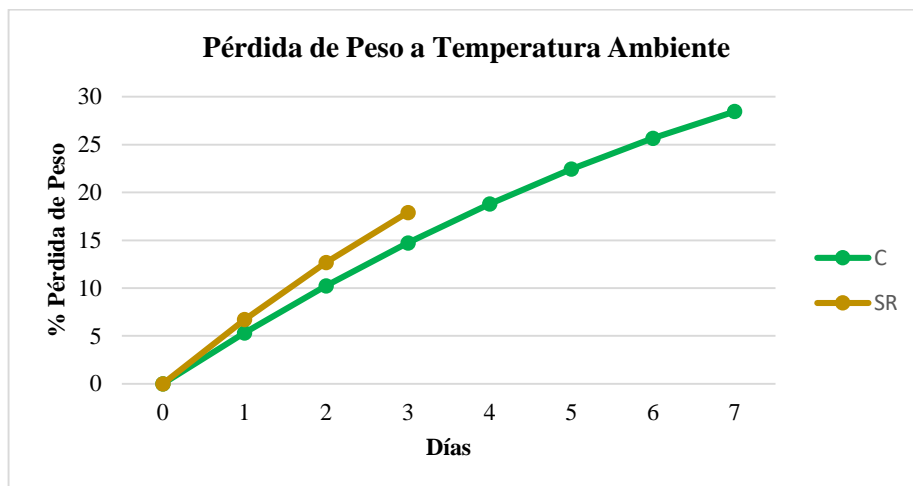


Gráfico 6-4: Pérdida de Peso de las Fresas a Temperatura Ambiente

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

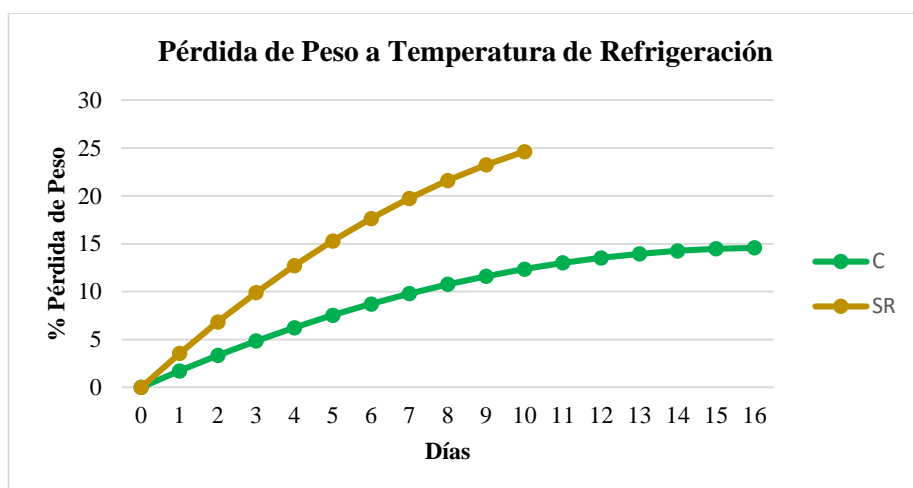


Gráfico 7-4: Pérdida de Peso de las Fresas a Temperatura de Refrigeración

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Tabla 27-4: Pérdida de Peso de las Moras

Temperatura	Ambiente 20 °C		Refrigeración 4 °C		
	Soluciones	SR	C	SR	C
Días	%Pp	%Pp	%Pp	%Pp	%Pp
0	-	-	-	-	-
1	5.54	4.04	3.58	1.71	1.71
2	10.48	6.10	6.05	3.33	3.33
3	-	8.00	7.53	3.96	3.96
4	-	9.73	9.14	5.40	5.40
5	-	11.29	10.49	6.74	6.74
6	-	12.70	11.60	8.00	8.00
7	-	13.93	12.47	9.17	9.17
8	-	-	-	10.25	10.25
9	-	-	-	11.24	11.24
10	-	-	-	12.14	12.14
11	-	-	-	12.95	12.95
12	-	-	-	13.67	13.67

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Donde:

SR = sin recubrimiento.

% Pp = porcentaje de pérdida de peso de las frutas.

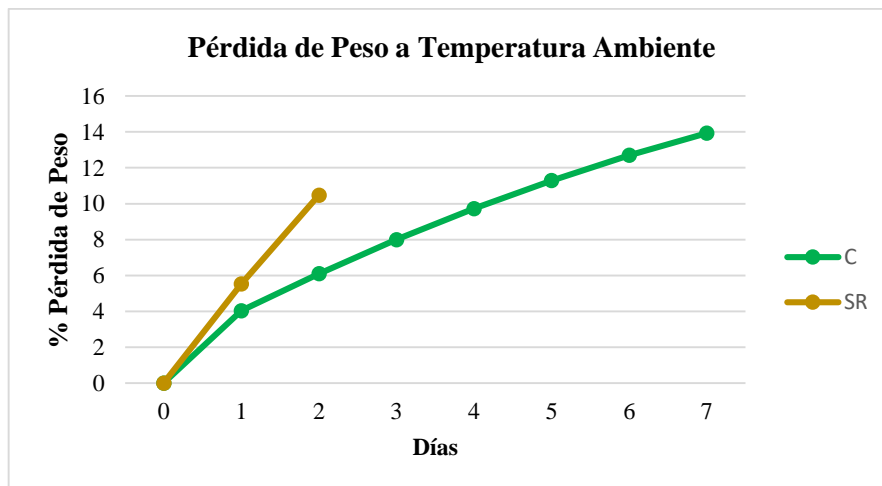


Gráfico 8-4: Pérdida de Peso de las Moras a Temperatura Ambiente

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

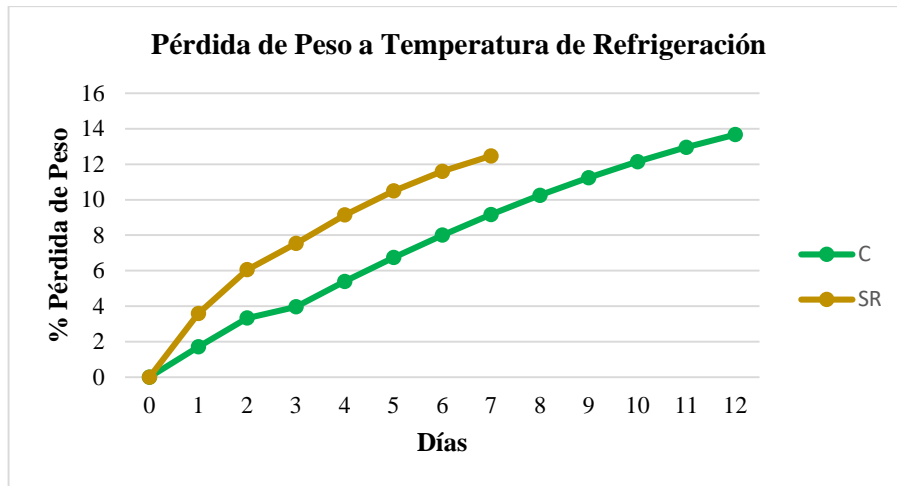


Gráfico 9-4: Pérdida de Peso de las Moras a Temperatura de Refrigeración

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

4.2. Prueba de Hipótesis

4.2.1. Hipótesis Específicas

4.2.1.1. Hipótesis 1

*“El proceso utilizado para la extracción de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*, será el adecuado para obtener de forma eficiente las cantidades necesarias de este biopolímero para su posterior aplicación”.*

El tratamiento del micelio de *Aspergillus niger* con hidróxido de sodio (20, 35, 50%) y ácido clorhídrico (5, 10, 15%), permitió obtener 3 muestras de quitosano, las cuales presentaron los siguientes valores de rendimiento:

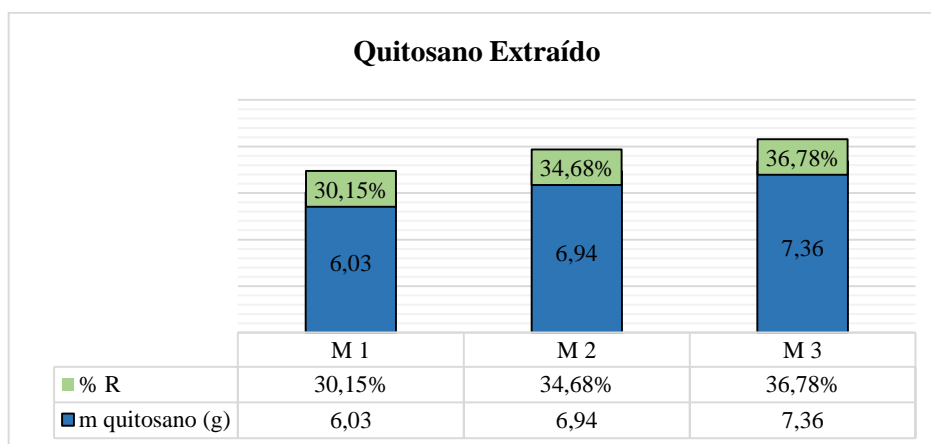


Gráfico 10-4: Cantidad de Quitosano Extraído

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Como se observa en el Gráfico 10-4, el mayor rendimiento se logró en la Muestra 3, en donde se utilizó una concentración del 50% de hidróxido de sodio y 15% de ácido clorhídrico. Con esto, se pudo obtener la cantidad necesaria de quitosano para las pruebas de caracterización del polímero y para su aplicación final como recubrimiento comestible, por lo tanto, la primera hipótesis de esta investigación se confirma.

4.2.1.2. Hipótesis 2

*“El quitosano obtenido a partir del micelio de *Aspergillus niger* presentará características físico-químicas óptimas para ser utilizado en el proceso de elaboración de recubrimientos comestibles”.*

El quitosano extraído en esta investigación, presenta las siguientes características físico-químicas:

Tabla 28-4: Características Físico-químicas del Quitosano Experimental

Muestra	Grado de Desacetilación	Solubilidad	Humedad	Cenizas Totales	Peso Molecular
Quitosano Experimental (M 3)	80.09 %	Ácidos diluidos, con excepción de HCl al 10% y H ₂ SO ₄ al 1%.	11.42%	1.41 %	160x10 ⁵ g/mol

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Los resultados de los análisis, demuestran que el quitosano obtenido a partir del micelio de *Aspergillus niger*, presenta las características físico-químicas necesarias para ser utilizado en la elaboración de películas biodegradables y comestibles. De modo que, la segunda hipótesis de esta investigación se confirma.

4.2.1.3. Hipótesis 3

“Se obtendrán recubrimientos comestibles a partir de quitosano, los cuales presentarán las características físico-químicas adecuadas para ser aplicados en la conservación de frutas”.

De los recubrimientos comestibles elaborados a partir de quitosano, se seleccionó para la conservación de frutas a la solución con las siguientes características físico-químicas:

Tabla 29-4: Características Físico-químicas del Recubrimiento Comestible

Solución	Características Físicas	Densidad	pH
C	Película de buena consistencia, resistente a la manipulación.	1.30 g/mol	3.75

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Para complementar los resultados de los análisis de caracterización, a la solución que presentó las características más idóneas para aplicarse como recubrimiento comestible, se le realizó un análisis microbiológico.

Tabla 30-4: Resultados del Análisis Microbiológico

Solución	Parámetros	Resultado
C	Coliformes totales UFC/mL	Ausencia
	<i>Escherichia coli</i> UFC/mL	Ausencia
	Aerobios mesófilos UFC/mL	10
	Mohos y levaduras UFC/mL	Ausencia

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Como se evidencia en las tablas anteriores, los recubrimientos elaborados presentan las características físico-químicas y microbiológicas adecuadas para aplicarse en la conservación de frutas, por lo tanto, la tercera hipótesis de esta investigación se confirma.

4.2.1.4. Hipótesis 4

“Los recubrimientos comestibles elaborados a partir de quitosano permitirán alargar la vida útil de las frutas, a temperatura ambiente y de refrigeración”.

Los recubrimientos comestibles elaborados en esta investigación, presentaron los siguientes resultados en las pruebas de conservación de fresas y moras:

Tabla 31-4: Tiempo de Conservación de las Frutas con Recubrimientos Comestibles

Solución	Frutas	Tiempo de Conservación	
		T. Ambiente 20 °C	T. Refrigeración 4 °C
C	Fresas	7 días	16 días
	Moras	7 días	12 días

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Como se puede ver en la Tabla 31-4, los recubrimientos comestibles permitieron prolongar el tiempo de conservación de las frutas en estudio, a temperatura ambiente y de refrigeración. Por este motivo, la cuarta hipótesis de esta investigación se confirma.

4.2.2. Hipótesis General

*“Con el presente trabajo de investigación, se logrará elaborar recubrimientos comestibles con el quitosano obtenido a partir del micelio de *Aspergillus niger*, los cuales permitirán alargar el tiempo de vida útil de las frutas en al menos 5 días”.*

De lo que se ha evidenciado en cada hipótesis específica de esta investigación, se puede confirmar que los recubrimientos comestibles elaborados con el quitosano extraído del micelio de *Aspergillus niger*, tienen las características físico-químicas y microbiológicas necesarias para alargar el tiempo de vida útil de las fresas y moras en estudio, en un período aproximado de 5 días.

4.3. Discusión de Resultados

Para conseguir la extracción de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*, se realizaron 9 ensayos que consistieron en un tratamiento químico del micelio del hongo con hidróxido de sodio y ácido clorhídrico a diferentes concentraciones, y de esta forma se logró establecer el método y las condiciones apropiadas para extraer las cantidades necesarias de este biopolímero para las pruebas de caracterización y su posterior aplicación.

Se determinó el rendimiento del quitosano extraído, relacionando la cantidad de polímero obtenido y la cantidad de materia prima utilizada, reportando sólo los valores más altos para cada concentración: 30.15% para la Muestra 1 (20% NaOH y 5% HCl), 34.68% para la Muestra 2 (35% NaOH y 10% HCl) y 36.78% para la Muestra 3 (50% NaOH y 15% HCl).

Estos porcentajes de rendimiento son mayores a los reportados por (Alzate, et al, 2015, p. 123) y (Arias, et al, 2015, p. 25), quienes utilizando un método de extracción similar y partiendo de la misma materia prima, obtuvieron rendimientos de quitosano de 8.5% y 2%, respectivamente; y son cercanos a lo expuesto por (Escobar, et al, 2013, p. 265), en cuyo trabajo lograron extraer quitosano a partir de cáscaras de varios crustáceos, logrando un rendimiento del 33.17%. Mientras que (Hernández, et al, 2009, p. 59), reportaron un rendimiento de 51.94% en la obtención de quitosano a partir de cáscaras de camarón, lo que supera a los resultados descritos en otros trabajos y en la presente investigación.

La diferencia en los porcentajes de rendimiento del polímero obtenido en esta investigación, en comparación con los otros trabajos, se puede atribuir a varios factores: la pureza y concentración de los reactivos utilizados; la materia prima utilizada para la extracción, lo que puede influenciar en el rendimiento final dependiendo de la cantidad de quitina presente en su estructura; la temperatura a la que se realizó el tratamiento térmico de las muestras, ya que según (Colina, et al, 2013, p. 23), trabajar con temperaturas muy elevadas en el tratamiento con hidróxido puede provocar rupturas en la cadena del quitosano; y la pureza del polímero final.

Con lo expuesto anteriormente, se puede inferir que el micelio del hongo *Aspergillus niger* es una buena fuente de quitosano, de la cual se puede obtener rendimientos de este biopolímero equiparables a las conseguidas de fuentes de origen animal, y que el método utilizado en el presente trabajo es efectivo para lograr la desacetilación de una mayor parte de la quitina presente en este hongo, en comparación a lo reportado en otros trabajos similares. Siendo el mayor de estos resultados el que se logró con una concentración del 40% de hidróxido de sodio, lo que indica una relación entre la concentración del álcali y la cantidad de polímero que se puede extraer.

No obstante, para optimizar este proceso es aconsejable utilizar equipos de calentamiento que permitan controlar de forma más efectiva la temperatura de la reacción; y de preferencia, realizar la extracción en una atmósfera inerte o en presencia de un agente reductor como el Sulfato de Sodio, para evitar pérdidas por despolimerización del quitosano.

Con la finalidad de comprobar que el quitosano obtenido en este estudio presentaba las características físico-químicas apropiadas para la elaboración de recubrimientos comestibles, se realizaron varias pruebas de caracterización. Las muestras del polímero fueron analizadas por espectroscopía infrarroja, lo que permitió verificar la presencia de los grupos funcionales NH_2 , C-O-C , C=O y OH , característicos de una muestra de quitosano.

Estos espectros son similares a lo reportado por (Rodríguez, et al, 2010, p. 340), quienes realizaron un análisis IR de una muestra de quitosano comercial. Y pese a que se diferencian un poco de los espectros presentados por (Alzate, et al, 2015, p. 115) y (Hernández, et al, 2009, p. 58), los picos de absorción de cada grupo funcional se encuentran dentro de su región correspondiente. Aquella disparidad existente entre la representación gráfica de las vibraciones de las muestras del quitosano obtenido en esta investigación, en comparación a los trabajos antes mencionados, se debe a diferencias en el grado de pureza de los polímeros y al tamaño de partícula de las muestras utilizadas para el análisis por IR, según lo explicado por (González & Macho, 2002, p. 78).

Partiendo de los espectros obtenidos, y utilizando la ecuación propuesta por (Peniche, 2006, p. 15), se determinó que las muestras de quitosano presentan grados de desacetilación de: 79.97%, 80.01% y 80.09%; siendo estos porcentajes cercanos a los obtenidos por (Balanta, et al, 2010, p. 304), 77.46% y 80.68%, y (Escobar, et al, 2013, p. 264), 80.67%. Y son superiores a lo reportado por (Hernández, et al, 2009, p. 59), quienes lograron una desacetilación del 64% en su muestra; esto se debe a que en el proceso de desacetilación, trabajaron con una temperatura menor a la utilizada en esta investigación.

Sin embargo, estos valores son menores si se comparan con lo reportado por (Alzate, et al, 2015, p. 123), los cuales obtuvieron una muestra de quitosano con un grado de desacetilación del 95%. Esto indica que existieron limitaciones en el proceso de desacetilación de la quitina presente en

el micelio, porque en el tratamiento con el álcali se evitó trabajar con temperaturas demasiado altas y por el tiempo de duración de dicho tratamiento. Pese a ello, al encontrarse dentro del rango de 70-95%, se puede considerar que las muestras extraídas tienen un alto grado de desacetilación.

Las muestras de quitosano presentan solubilidad en ácidos diluidos, lo que coincide con los resultados expuestos por (López, 2014, p. 41) y (Luna, 2012, p. 70), quienes afirman que la presencia de aminas primarias en la estructura de este biopolímero, provoca que se cargue positivamente y se vuelva hidrofílico, mejorando de esta forma su solubilidad en disoluciones de ácidos.

El contenido de humedad de la muestra de quitosano es de 11.42%, un valor cercano al obtenido por (Lara, 2016, p. 56), 11.25%; y mayor al reportado por (Luna, 2012, p. 72), 10.25%, y (Hernández, et al, 2009, p. 59), 10.45%; lo que puede atribuirse a que la muestra pudo absorber humedad del ambiente durante su almacenamiento. En el caso del contenido de cenizas, la muestra presenta un porcentaje de 1.41%, el cual es cercano a lo que obtuvieron (Hernández, et al, 2009, p. 59), 1.40%, y mayor al resultado que reportó (Luna, 2012, p. 72), 1%. Esto se debe a una mayor presencia de impurezas orgánicas en el quitosano de este estudio, debido a que, durante el proceso de extracción no se logró una mayor purificación en las muestras del polímero.

Las pruebas de viscosidad permitieron determinar que el quitosano experimental tiene un peso molecular aproximado de 1.60×10^5 g/mol. Este resultado es un poco mayor a lo que reportaron (Alvarado, et al, 2007, p. 607), quienes obtuvieron un valor de 1.12×10^5 g/mol, y es menor al reportado por (López, 2014, p. 40), quien obtuvo un peso molecular de 2.14×10^5 g/mol. Lo que indica que el polímero obtenido en este trabajo presenta cierta despolimerización en su cadena, pese a que se evitó exponer a las muestras a temperaturas muy altas. Aun así, se encuentra dentro del rango permitido para una muestra de quitosano comercial, cuyo valor puede variar entre 1×10^5 - 8×10^5 g/mol, según lo descrito por (Baxter, 2004, p. 4).

Las pruebas de caracterización permitieron demostrar que las muestras del quitosano experimental cumplen con los requisitos necesarios para ser utilizadas en la elaboración de los recubrimientos, entre los que destacan su alto grado de desacetilación, su solubilidad en ácidos diluidos y su peso molecular. Además, mediante la espectroscopía infrarroja se logró identificar la presencia de los grupos funcionales del polímero, confirmando la extracción del quitosano. Es importante tener un estricto control de las condiciones en las que se realiza esta extracción, para garantizar un alto grado de pureza del producto final; logrando así, la obtención un polímero de mejor calidad.

Para la elaboración de los recubrimientos comestibles se prepararon 3 soluciones compuestas por disoluciones de quitosano y almidón a diferentes concentraciones, empleando glicerina como agente plastificante. Posteriormente, las pruebas de caracterización de estas soluciones,

permitirán seleccionar a la que presente las características físico-químicas apropiadas para ser aplicada en la conservación de frutas.

Con el propósito de evaluar las características físicas de las películas formadas por cada solución, se colocó un volumen determinado de estas soluciones en cajas Petri y se dejaron en la estufa. Una vez terminado el tiempo de secado, se puede observar que sólo con la Solución C se pueden formar películas de buena consistencia, las cuales pueden ser retiradas fácilmente de la superficie de moldeo. Esto podría atribuirse a que fueron elaboradas con una mayor concentración de quitosano, ya que según indican (Chávez, et al, 2012, p. 46), al utilizar una mayor concentración de este polímero en la preparación de las películas, se puede lograr un mejor reordenamiento de sus moléculas durante el secado, de manera que, se podrán obtener recubrimientos de mejor calidad.

Las películas formadas con la Solución C, también presentan una alta resistencia a la manipulación, lo que físicamente las vuelve equiparables a las obtenidas en otros estudios, como el presentado por (Morey & Quinde, 2012, p. 66), quienes prepararon recubrimientos comestibles partiendo de los mismos componentes: quitosano, almidón y glicerina; (Méndez, et al, 2011, p. 5), que obtuvieron una película a base de gelatina y carboximetilcelulosa; y (Oregel, et al, 2016, p. 4), quienes lograron preparar películas comestibles a base de cera de candelilla. Esto se debe a la adición de glicerina a la solución, lo que permite mejorar las propiedades físicas de las películas formadas.

En lo que respecta a la densidad, la Solución C presenta un valor ligeramente más alto al de las demás soluciones, debido a que presenta una mayor concentración de quitosano en su composición. Dicho valor es cercano a lo obtenido por (Oregel, et al, 2016, p. 6) en su estudio con cera de candelilla, y mayor al que obtuvieron (Andrade, et al, 2014, p. 61) con sus películas comestibles elaboradas a partir de cera de laurel y almidón, lo que se debe a que utilizaron una menor concentración de coloide, y según (Parzanese, et al, 2010, p. 6), esto puede influenciar en la densidad del recubrimiento elaborado. Pero es menor al reportado por (Morey & Quinde, 2012, p. 90), cuyo resultado puede atribuirse a que utilizaron una mayor concentración de quitosano en la elaboración de sus recubrimientos. No obstante, teniendo en cuenta que con la Solución C se lograron formar varias películas, es factible considerar que la densidad registrada en esta solución es apropiada para la obtención de los recubrimientos comestibles.

En el análisis del pH de las soluciones preparadas, la Solución C registra un valor de 3.75, el cual es menor al de las otras soluciones. Esto es debido a que en su preparación se empleó un volumen mayor de la solución de quitosano y ácido acético. Además, el hecho de tener un pH bajo garantiza que será más efectiva para lograr la conservación de las frutas, ya que según (Chavarrías, 2013), si se logra que las frutas y vegetales tengan un pH bajo, se puede limitar y

ralentizar el crecimiento de todo tipo de microorganismos, en especial hongos y levaduras, que generalmente crecen en este tipo de alimentos.

El pH de esta solución es cercano a lo que reportaron (Morey & Quinde, 2012, p. 90), que obtuvieron un pH de 3.80 en su solución formadora de recubrimientos; y menor al descrito por (Rodríguez, et al, 2009, p. 10) en su estudio de caracterización de un recubrimiento comestible a base de aceite esencial de bergamota, donde obtuvieron un valor de 4.71, lo que se debe a que utilizaron una menor cantidad de soluciones ácidas en la elaboración de aquel recubrimiento.

El análisis microbiológico de la Solución C permitió comprobar que es apta para ser utilizada en la formación de recubrimientos que puedan ser comestibles, debido a que en sus resultados se pudo determinar la ausencia de Coliformes Totales, *Escherichia coli*, mohos y levaduras, y apenas una cantidad de 10 UFC/mL de Aerobios mesófilos, lo que cumple con los parámetros establecidos por la Norma ISO 7218: 2008 para alimentos destinados al consumo humano.

El espectro infrarrojo del recubrimiento comestible, muestra pocas diferencias en relación al espectro de la muestra de quitosano utilizado para su elaboración, entre las cuales se pueden destacar: la disminución de la banda 2315.12 cm^{-1} correspondiente a $\text{C}\equiv\text{C}$; y una notable división entre las bandas pertenecientes a los grupos OH y NH, en 3236.93 cm^{-1} y 3336.25 cm^{-1} , las cuales se encontraban superpuestas en la muestra de quitosano. (Blanquicet, et al, 2015, p. 61) afirman que estas diferencias entre los espectros de las muestras de quitosano y de los recubrimientos elaborados a partir de éste, ocurren cuando existe una interacción previa entre el ácido acético y el polímero, motivo por el cual se forma un acetato de quitosano. Y que producto de esta reacción, se puede dar un cambio en la representación de los picos de varios grupos funcionales propios del quitosano.

De los resultados obtenidos en cada prueba de caracterización, se puede inferir que los recubrimientos formados a partir de la Solución C presentan las propiedades físico-químicas adecuadas para prolongar la vida útil de las frutas, y cumplen con los parámetros de inocuidad necesarios para ser considerados comestibles. Para investigaciones posteriores, sería conveniente trabajar con mayores concentraciones de quitosano o con otros agentes plastificantes, para obtener recubrimientos comestibles de mejor calidad; y de ser posible, se deben evaluar otros parámetros físico-químicos de estos recubrimientos, que no pudieron ser abarcados en este estudio.

Con el objetivo de determinar la eficacia de los recubrimientos comestibles como conservantes de frutas, se observaron las características físicas que presentaban a diario las frutas recubiertas con estos recubrimientos y se compararon con las frutas sin recubrimientos. Primeramente, se realizó una evaluación sensorial a las frutas, asignándoles una calificación en función del aspecto físico que presentan durante el tiempo de observación.

Las fresas con recubrimiento mostraron una calidad física aceptable por un período de 7 días a temperatura ambiente, mientras que las que no tenían recubrimiento solo presentaron un buen aspecto físico por 3 días, al cuarto día empezaron a mostrar crecimiento de moho. A temperatura de refrigeración, las fresas con recubrimiento presentaron un buen aspecto durante 16 días, y las que no poseían el recubrimiento conservaron su calidad por solo 9 días, pasado ese tiempo empezaron a tomar una tonalidad oscura.

Las moras a las que se les aplicó el recubrimiento conservaron un buen aspecto por 7 días, en contraste con las moras sin recubrimiento, las cuales presentaron crecimiento de moho luego de 2 días de observación. En el caso de las moras con recubrimiento, que fueron almacenadas a temperatura de refrigeración, presentaron un buen aspecto durante 12 días; a diferencia de las moras sin recubrimiento que solo duraron 7 días, luego empezaron a mostrar crecimiento microbiano.

Estos resultados fueron cercanos a los reportados por (Luna, 2012, p. 76) en su estudio, en donde logró obtener un tiempo de conservación de 7 días en las fresas y de 5 días en las moras a temperatura ambiente; mientras que, al almacenarlas a temperatura de refrigeración, el tiempo de conservación fue de 15 días para las fresas y de 9 días para las moras. La ligera diferencia en el tiempo de conservación de las moras, se puede atribuir a las condiciones en que fueron almacenadas estas frutas antes de su obtención en el mercado, lo que pudo afectar su tiempo de vida útil al aplicarles los recubrimientos. De igual forma, (Morey & Quinde, 2012, p. 97) registraron un tiempo de conservación de 15 días en fresas almacenadas a temperatura ambiente.

Mientras que, (Andrade, et al, 2014, p. 61) lograron aumentar en 5 días el tiempo de conservación del tomate árbol con sus recubrimientos, en comparación a la fruta control (sin recubrimiento); lo que se asemeja a lo registrado en este trabajo, en donde las frutas con recubrimiento tuvieron un aumento en su tiempo de vida útil de entre 4-6 días.

Otro parámetro que fue evaluado en las frutas fue la pérdida de peso, la cual está relacionada con la pérdida de humedad que tienen las frutas durante su almacenamiento. Para determinar este valor, se realizó un pesaje diario de las frutas en estudio, y fue posible observar que las fresas y moras con recubrimiento presentan una menor pérdida de peso que las frutas sin recubrimiento, en ambas condiciones de almacenamiento. Esto demuestra que los recubrimientos elaborados en esta investigación, son capaces de conservar parte de la humedad que generalmente pierden estas frutas por transpiración.

Sin embargo, sólo se logra disminuir este parámetro en un 3.18%, en las fresas que están al ambiente, y en un 12.28% en las fresas en refrigeración; mientras tanto, en el caso de las moras estos valores son de 2.34% al ambiente y 3.01% en condiciones de refrigeración. Estos porcentajes son menores a los reportados por (López, et al, 2015, p. 330), quienes lograron disminuir

la pérdida de peso de tomatillos en un 36.20% en almacenamiento a temperatura ambiente y 41.50% en refrigeración; y lo que reportaron (Andrade, et al, 2014, p. 61), quienes disminuyeron esta pérdida en un 30%.

Esta diferencia se debe a que en estos trabajos se utilizaron recubrimientos elaborados a partir de ceras naturales, y según lo explicado por (Rojas, 2006, p. 45), este tipo de recubrimientos son más efectivos al actuar como barreras para evitar la transferencia de vapor de agua de la fruta al ambiente, a diferencia de los que son elaborados a partir de biopolímeros, los cuales muestran una baja resistencia al agua por su naturaleza hidrofílica.

Considerando estos resultados, es posible afirmar que los recubrimientos elaborados en la presente investigación, son efectivos para prolongar el tiempo de vida útil de las frutas; y son capaces de reducir la transferencia de vapor que se origina por la transpiración natural de las frutas, lo que permite que puedan conservar su firmeza por un mayor tiempo.

Para mejorar los efectos de barrera de estos recubrimientos al vapor de agua, es aconsejable incorporar lípidos al preparar la solución formadora de películas, y así poder incorporar a los recubrimientos la eficacia que tienen los componentes lipídicos para disminuir la transferencia de vapor de agua, por su naturaleza hidrofóbica.

CONCLUSIONES

- Se logró establecer un proceso adecuado para la extracción de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*.
- Las muestras de quitosano presentaron valores de rendimiento de 30.15% (M 1), 34.68% (M 2) y 36.78% (M 3), lo que denota un incremento del polímero extraído a mayores concentraciones de hidróxido de sodio.
- El quitosano presentó las siguientes características físico-químicas: 80.09% de grado de desacetilación; 11.42% de humedad; 1.41% de cenizas totales; 1.60×10^5 g/mol de peso molecular; solubilidad en ácidos diluidos; y la presencia de los grupos NH_2 , C-O-C, C=O y OH en los espectros IR.
- Se obtuvieron recubrimientos comestibles a partir de quitosano, que presentaron las siguientes características: 1.30 g/mL de densidad; 3.75 de pH; formación de una película consistente; cambios en las vibraciones de los grupos funcionales del quitosano en el espectro IR; y ausencia de microorganismos patógenos.
- Se comprobó la funcionalidad de los recubrimientos comestibles como conservantes de frutas, permitiendo que el tiempo de vida útil de las fresas y moras sea de 7 días a temperatura ambiente, y de 16 y 12 días a temperatura de refrigeración.

RECOMENDACIONES

- En el proceso de extracción del quitosano, es recomendable trabajar con temperaturas menores a los 100°C, en atmósfera inerte o utilizar un agente reductor, para evitar pérdidas del polímero.
- Realizar el tratamiento térmico con hidróxido de sodio en un equipo de reflujo, para lograr prevenir pérdidas por la evaporación del material.
- Efectuar nuevas investigaciones, que logren optimizar la funcionalidad de los recubrimientos elaborados a partir de quitosano, y de esta forma obtener mejores resultados en lo que respecta a sus propiedades mecánicas y al tiempo de conservación de las frutas.
- Es recomendable que se continúen desarrollando investigaciones sobre la elaboración de recubrimientos comestibles a partir de quitosano fúngico, para evaluar su funcionalidad como conservantes de otros tipos de alimentos.
- Realizar otros estudios, que permitan aprovechar las propiedades físico-químicas del quitosano en otras áreas de aplicación y de esta forma contribuir al desarrollo de productos amigables con el ambiente, que sean una alternativa viable al uso de polímeros sintéticos.

BIBLIOGRAFÍA

ALVARADO, J., et al. “Método directo para la obtención de quitosano de desperdicios de camarón para la elaboración de películas biodegradables”. *Revista de Química teórica y aplicada*, vol. 64, n° 531 (2007), (España) pp. 606-607.

ALZATE, L., CUERVO, R. & VALENCIA, M. “Extracción y caracterización de quitosano fúngico experimental y comercial, como potencial biomaterial para aplicaciones en ingeniería de tejidos”. *Revista Iberoamericana de polímeros*, vol. 16, n° 2 (2015), (Colombia) pp. 113-123.

ANDRADE, D. *Obtención de colorante rojo a partir del exoesqueleto de camarón (Penaeus vannamei)* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Universidad Técnica de Machala, Unidad Académica Ciencias Químicas y de la Salud. Machala, Ecuador. 2015. pp. 6-8. [Consulta: 12 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/bitstream/48000/1876/6/CD00072.pdf>

ANDRADE, J., et al. “Desarrollo de un Recubrimiento Comestible Compuesto para la Conservación del Tomate de Árbol (*Cyphomandra betacea* S.). *Información Tecnológica*, vol. 25, n° 6 (2014), (Colombia) p. 61.

ARIAS, Y., CASTRO A. & VELOZA, L. “Obtención y caracterización de un polímero a partir del quitosano proveniente del hongo *Aspergillus niger* y cáscara de huevo”. *Revista Informador Técnico*, vol. 79, n° 2 (2015), (Colombia) p. 25.

BADUI, S. *Química de los Alimentos*. México DF, México: Pearson Educación, 2006, p. 83.

BALANTA, D., GRANDE, C. & ZULUAGA, F. “extracción, identificación y caracterización de quitosano del micelio de *Aspergillus niger* y sus aplicaciones como material bioadsorbente en el tratamiento de aguas”. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 11, n° 5 (2010), (Colombia) p. 304.

BAXTER, S. *Molecular Weight and Degree of Acetylation of Ultrasonicated Chitosan* (Trabajo de Titulación) (Maestría) [En línea]. Universidad de Tennessee. Knoxville, Estados Unidos. 2004. p. 4. [Consulta: 12 de Junio del 2019]. Disponible en: https://pdfs.semanticscholar.org/e18d/afb13bb6d831d8861e111c56dccf1a93e613.pdf?_ga=2.140377654.481049471.1561961303-863999108.1561961303

BECERRA, J., et al. “Quitosán fúngico: fuentes y propiedades”. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*, vol. 3, n° 5 (2011), (México) p. 26.

BLANQUICET, R., et al. “Síntesis y propiedades de filmes basados en quitosano/lactosuero”. *Polímeros*, vol. 25, nº 1 (2015), (Colombia) p. 61.

CÁCERES, P. *¿Cuánto plástico hemos generado desde que se inventó y dónde ha ido a parar?*, 2017. [Consulta: 27 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.lavanguardia.com/natural/20170719/424210992121/balance-mundial-produccion-plasticos-residuos.html>

CARVAJAL, G. *Evaluación de las pérdidas poscosecha tanto físicas y de calidad en el sistema de producción agrícola del Cadet. Tumbaco, Pichincha* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ciencias Agrícolas, Escuela de Ingeniería Agronómica. Quito, Ecuador. 2012. p.1. [Consulta: 13 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/966/1/T-UCE-0004-4%20.pdf>

CHAVARRÍAS, M. *El pH de los alimentos y la seguridad alimentaria* [En línea]. 2013. [Consulta: 17 de Junio del 2019]. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/sociedad-y-consumo/2013/09/19/218017.php>

CHÁVEZ, A., et al. “Obtención y caracterización de papel de quitosano”. *Revista Iberoamericana de polímeros*, vol. 13, nº 2 (2012), (Venezuela), p. 46.

COLINA, M., et al. “Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial”. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 15, nº 1 (2013), (Venezuela), p. 23.

CUEVA, Y. *Producción de α amilasas mediante fermentación submersa de *Aspergillus Niger* para su empleo en procesos de panificación* (Trabajo de Titulación) [En línea]. UDLA, Facultad de Ingeniería y Ciencias Agropecuarias. Quito, Ecuador. 2017. p. 36. [Consulta: 14 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://dspace.udla.edu.ec/bitstream/33000/8044/1/UDLA-EC-TIB-2017-34.pdf>

DOMINGO, R. *Estudio del mercado de productos plásticos reciclados. Manufacturas de plástico* [en línea]. 2011. pp. 2-3. [Consulta: 5 de Febrero del 2018]. Disponible en: <http://www.unep.fr/scp/procurement/pilotcountries/files/uruguaymrplastic.pdf>

DOMÍNGUEZ, G. *Bioconversión de la cascarilla de cacao por *Aspergillus niger* para la obtención de Quitosano* (Trabajo de Titulación) (Maestría) [En línea]. Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias. Caracas, Venezuela. 2012. p. 57. [Consulta: 15 de Marzo del 2018]. Disponible en: http://190.169.94.51/cgi-win/be_alex.exe?Titulo==Bioconversi%F3n+de+la+cascarilla+de+cacao+por+Aspergillus+niger+para+la+obtenci%F3n+de+quitosano&Nombrebd=bfcucv&TipoDoc=T&Sesion=311033943

DOMÍNGUEZ, M. & JIMÉNEZ, M. “Películas comestibles formadas con polisacáridos: Propiedades y aplicaciones”. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, vol. 6, n° 2 (2012), (México) pp. 112-115.

ESCOBAR, D., et al. “Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos”. *Scientia et Technica Año XVIII*, vol. 18, n° 1 (2013), (Colombia), pp. 264-265.

ESPINOSA, V. *Estudios Estructurales de Almidón de Fuentes no Convencionales: Mango (Mangifera indica L.) y Plátano (Musa paradisiaca L.)* (Trabajo de Titulación) (Maestría) [En línea]. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Desarrollo de Productos Bióticos. Yautepec, México. 2008. pp. 1-6. [Consulta: 22 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/3598/ESTUDIOSESTRUCTURALES.pdf?sequence=1>

FERNÁNDEZ, D., et al. “Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas”. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias*, vol. 24, n° 3 (2015), (Cuba) p. 54-55.

FERNÁNDEZ, N., et al. “Estado actual del uso de recubrimientos comestibles en frutas y hortalizas”. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, vol. 15, n° 2 (2017), (Colombia) pp. 136-137.

GIRALDO, J. “Un futuro para la quitina y el quitosano”. *Revista Universidad de Concepción* (2015), (Chile) pp. 1-13.

GONZÁLEZ, A. & MACHO, I. *Obtención de quitosano a partir de la quitina de conchas de camarón* (Trabajo Especial de Grado) [En línea]. Universidad de Zulia, Facultad de Ingeniería. Maracaibo, Venezuela. 2002. p. 78. [Consulta: 16 de Junio del 2019]. Disponible en: <http://200.35.84.131/portal/bases/marc/texto/2101-05-00608.pdf>

GUERRÓN, M. *Evaluación del procedimiento de obtención de un biopolímero a partir del hongo Ganoderma Australe* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química. Quito, Ecuador. 2016. p. 1. [Consulta: 16 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6860/1/T-UCE-0017-0017-2016.pdf>

HERNÁNDEZ, C., et al. “Utilización de residuos de cáscara de camarón para la obtención de quitina blanqueada: Propuesta de una metodología a base de tratamiento alcalino-ácido y ozono”. *Revista Nacional de Investigación Científica*, vol. 19, n° 1 (2008), (Cuba) p. 659.

HERNÁNDEZ, H., et al. “Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón”. *Revista Sociedad Mexicana de Ciencia y Tecnología de Superficies y Materiales*, vol. 22, n° 3 (2009), (México) pp. 57-59.

LAFUENTE, G. *Glicerol: Síntesis y aplicaciones* (Trabajo de Titulación) (Maestría) [En línea]. Universidad Nacional de Educación a Distancia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química Orgánica y Bio-orgánica. Madrid, España. 2017. p. 6. [Consulta: 22 de Marzo del 2018]. Disponible en: http://e-spacio.uned.es/fez/eserv/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Glafuente/Lafuente_Aranda_Gustavo_TFM.pdf

LARA, M. *Obtención y caracterización de quitosano procedente del hongo Ganoderma Australe para aplicación en biopolímeros* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química. Quito, Ecuador. 2016. pp. 1-56. [Consulta: 17 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/6850/1/T-UCE-0017-0010-2016.pdf>

LÁREZ, C. “Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos”. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, vol. 4, n° 2 (2003), (Venezuela) pp. 93-94.

LOAYZA, M. *Eficiencia degradativa de tres especies de hongos benéficos Aspergillus Niger, Thichoderma Harzianum y Paecilomyces Lilacinus sobre suelos contaminados con petróleo en la parroquia San Carlos del cantón Joya de los Sachas* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba, Ecuador. 2017. pp. 17-18. [Consulta: 18 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7012/1/236T0272.PDF>

LÓPEZ, K. *Evaluación comparativa en la biodegradación de aceites vegetales generados en el proceso de frituras mediante el hongo Aspergillus niger y la levadura Saccharomyces cerevisiae* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias. Riobamba, Ecuador. 2017. pp. 17-18. [Consulta: 19 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/7852/1/236T0286.pdf>

LÓPEZ, M. *Manual de Producción de Micelio de Hongos Comestibles*. Veracruz-México: 2016, p. 12.

LÓPEZ, P. *Obtención de quitosano a partir de desechos del exoesqueleto de camarón Tití (Xiphopenaeus Riveti) para el desarrollo de películas poliméricas plastificadas con glicerina* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Universidad de San Buenaventura, Facultad de Ingeniería, Programa Ingeniería de Materiales. Santiago de Cali, Colombia. 2014. pp. 1-41. [Consulta: 5 de Febrero del 2018]. Disponible en:

http://bibliotecadigital.usb.edu.co/bitstream/10819/3127/1/Obtencion_quitosano_desechos_lopez_2014.pdf

LÓPEZ, A., BRITO DE LA FUENTE, E. & GALINDO, E. *Biotecnología alimentaria*. México DF, México: Editorial Limusa. 2004. p. 423.

LÓPEZ, D., et al. “Evaluación de un recubrimiento comestible a base de proteínas de lactosuero y cera de abeja sobre la calidad fisicoquímica de uchuva (*Physalis peruviana L.*)”. *Acta Agronómica Journal*, vol. 65, n° 4 (2016), (Colombia) p. 330.

LORETO, M. *La versatilidad de los plásticos augura futuro crecimiento sectorial* [En línea]. 2013. [Consulta: 27 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.emb.cl/negociosglobales/articulo.mvc?xid=1762>

LUNA, Y. *Obtención de quitosano a partir de quitina para su empleo en conservación de frutillas y moras* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Universidad Central del Ecuador, Facultad de Ingeniería Química. Quito, Ecuador. 2012. pp. 9-76. [Consulta: 20 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/427/1/T-UCE-0017-5.pdf>

MAE-PNGIDS. *Diagnóstico de la Cadena de Gestión Integral de Desechos Sólidos-Reciclaje*. 2017. p. 5.

MÁRMOL, Z., et al. “Quitina y Quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones”. *Revista Tecnocientífica URU*, vol. 1, n° 1 (2011), (Venezuela) p. 54.

MELERO, J. *Materiales y procesos avanzados. Materiales de alta tecnología*. Madrid, España: T.G.I., C.S.I.C. 1993. p. 103.

MELO, V. & CUAMATZI, O. *Bioquímica de los procesos metabólicos*. México DF, México: Reverté Ediciones, S.A. de C.V. 2007. p. 68.

MERINO, L. *Características generales de los hongos* [blog]. [Consulta: 10 de Agosto del 2018]. Disponible en: <http://microfungi4b.blogspot.com/2017/06/caracteristicas-generales.html>

MIRAMONT, S. *Recubrimientos elaborados a partir de biopolímeros para el soporte de sustancias con actividad antimicrobiana: carvacrol y sorbatos* (Trabajo de Titulación) (Maestría) [En línea]. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 2012. p. 15. [Consulta: 20 de Agosto del 2018]. Disponible en: <http://posgrado.frba.utn.edu.ar/investigacion/tesis/MTA-2012-Sofia%20Miramont.pdf>

MOREY, A. & QUINDE, A. *Obtención de quitosano y su aplicación en recubrimientos comestibles en mezcla con almidón* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Universidad de Guayaquil, Facultad de Ingeniería Química, Escuela de Ingeniería Química. Guayaquil,

Ecuador. 2012. pp.1-97. [Consulta: 21 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/2371/1/1089.pdf>

NORMA ISO 7218: 2008. *Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico.*

OREGEL, E., et al. “Caracterización fisicoquímica de películas comestibles a base de cera de candelilla”. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, vol. 17, n° 1 (2016), (México) pp. 4-6.

PARZANESE, M. “Películas y recubrimientos comestibles”. *Tecnologías para la Industria Alimentaria*. 2010. pp. 6-9.

PENICHE, C. *Estudio sobre la quitina y quitosana* (Trabajo de Titulación) (Doctoral) [En línea]. Universidad de La Habana, Facultad de Química. La Habana, Cuba. 2006. p. 15. [Consulta: 15 de Abril del 2018] Disponible en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/handle/10482/34254/24001880.pdf;jsessionid=1CB6460C3FD2222B6C77E0D5F01D8A9?sequence=1>

PONTÓN, J. “La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina”. *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. 25, n° 2 (2008), (España) p. 79.

POSADA, J. & CARDONA, C. “Análisis de la refinación de glicerina obtenida como coproducto en la producción de biodiésel”. *Ingeniería Universidad Bogotá*, vol. 14, no 1 (2010), (Colombia) pp. 1-15.

PRIMO, E. *Química orgánica básica y aplicada. De la molécula a la industria*. Valencia, España: Editorial Reverté S.A. 2007. p. 910.

QUINTERO, J., FALGUERA, V. & MUÑOZ, A. “Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola”. *Revista Tumbaga*, vol. 5, n° 1 (2010), (Colombia) pp. 54-55.

QUIROGA, C. “Los almidones resistentes y la salud”. *UPB – Investigación & Desarrollo*, vol. 1, n° 8 (2009), (Colombia) pp. 131-132.

RESTREPO, J. & ARSITIZÁBAL, I. “Conservación de fresa (*Fragaria x ananassa Duch cv. Camarosa*) mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de gel mucilaginoso de Penca Sábila (*Aloe barbadensis Miller*) y cera de carnaúba”. *Revista Vitae*, vol. 17, n° 3 (2010), (Colombia) p. 1.

RIVEROS, A. *Inducción de resistencia en plantas. Interacción: Planta-Patógeno*. Tolima, Colombia: MUSALAC. 2010. p. 130.

RIQUELME, C. *Consecuencias de la quema de plásticos* [En línea]. 2015. [Consulta: 26 de Marzo del 2018]. Disponible en: <http://www.abc.com.py/edicion-impresa/suplementos/escolar/consecuencias-de-la-quema-de-plasticos-1396912.html>

RODRÍGUEZ, B. *Aspergillus spp* [En línea]. 2016. [Consulta: 29 de Marzo del 2018]. Disponible en: <https://atlasdemicrobiologia.wordpress.com/2016/06/22/aspergillus-spp/>

RODRÍGUEZ, A., et al. “Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos”. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, vol. 15, nº 3 (2009), (México) p. 311.

RODRÍGUEZ, N., et al. “Preparación de partículas de quitosano reticuladas con tripolifosfato y modificadas con polietilenglicol”. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, vol. 76, nº 4 (2010), (Perú) pp. 340-341.

RODRÍGUEZ, M., et al. *Caracterización de recubrimientos comestibles a base de HPMC con aceite esencial de bergamota* (Trabajo de Titulación) (Maestría) [En línea]. Universidad Politécnica de Valencia, Tecnología de Alimentos. Valencia, España. 2009. p. 10. [Consulta: 15 de Junio del 2019] Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13628/TesinaMaster_MarleneRodriguez.pdf?sequence=1

ROJAS, M. *Recubrimientos comestibles y sustancias de origen natural en manzana fresca cortada: Una nueva estrategia de conservación* (Trabajo de Titulación) (Doctorado) [En línea]. Universidad de Lérida, Escuela Técnica Superior de Tecnología Agraria, Departamento de Tecnología de Alimentos. Lérida, España. 2006. p. 45. [Consulta: 15 de Junio del 2019] Disponible en: <https://www.tesisenred.net/bitstream/handle/10803/8377/Trgmj1de4.pdf?sequence=1>

ROMERO, E. *Obtención de hidrogeles de quitosano a partir del micelio de Aspergillus niger y su estudio en la liberación controlada de cefalexina* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Universidad del Valle, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Programa Académico de Química. Santiago de Cali, Colombia. 2011. pp. 6-8. [Consulta: 5 de Febrero del 2018]. Disponible en: <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co:8080/bitstream/10893/3922/4/CB-0439240.pdf>

TOFIÑO, A., et al. “Regulación de la biosíntesis del almidón en plantas terrestres: perspectivas de modificación”. *Acta Agronómica*, vol. 55, nº 1 (2006), (Colombia) p. 2.

TOVAR, T. *Caracterización morfológica y térmica del almidón de maíz (Zea mays L) obtenido por diferentes métodos de aislamiento* (Trabajo de Titulación) [En línea]. Universidad

Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería. Pachuca de Soto, México. 2008. pp. 2-18. [Consulta: 3 de Septiembre del 2018]. Disponible en: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/handle/231104/508/Caracterizacion%20morfolo%20gica%20y%20termica%20almidon%20de%20maiz.pdf;jsessionid=21D0E4890B3523B54BF9F67472360D53?sequence=1>

ULLOA, J. *Frutas auto estabilizadas en el envase por la tecnología de obstáculos*. Tepic, México: Universidad Autónoma de Nayarit. 2007. p. 55.

VALENZUELA, C. & ARIAS, J. “Potenciales aplicaciones de películas de quitosano en alimentos de origen animal: una revisión”. *Revista Avances en Ciencias Veterinarias*, vol. 27, n° 1 (2012), (Chile) pp. 34-41.

VALERO, M., ORTEGÓN, Y. & USCATEGUI, Y. “Biopolímeros: Avances y perspectivas”. *Revista Dyna*, vol. 80, n° 181 (2013), (Colombia) p. 172.

VÁZQUEZ, M. & GUERRERO, J. “Recubrimientos de frutas con biopelículas”. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, vol. 7, no 2 (2013), (México) pp. 6-11.

VUARANT, C. *Arándanos: Avances científicos y tecnológicos en la región de Salto Grande*. Entre Ríos, Argentina: I.S.B.N. 2010. pp. 58-59.

ANEXOS

Anexo A: Especificaciones del micelio seco de *Aspergillus niger*.

COPIA CONTROLADA		
SISTEMA INTEGRADO		TC-ESP-009
PRODUCTO TERMINADO. ESPECIFICACIÓN MICELIO		Versión: 004

1. PRODUCTO

NOMBRE COMERCIAL:

Micelio

NOMBRE QUÍMICO:

Biomasa de *Aspergillus Niger*

2. DESCRIPCIÓN

El Micelio es un coproducto de la fabricación industrial del ácido cítrico. El micelio es obtenido a partir del hongo *Aspergillus niger*, utilizado en la fermentación aeróbica del jarabe de azúcar para la producción de ácido cítrico. El *Aspergillus niger* o biomasa obtenida al final del ciclo de fermentación es denominada micelio Húmedo.

3. USOS

Se utiliza como materia prima para productos nutracéuticos, farmacéuticos, suplemento alimenticio para animales y uso industrial.

4. ESPECIFICACIONES

4.1. MICELIO SECO - USO NUTRACEUTICO- FARMACEUTICO

El Micelio seco para uso nutraceutico o farmaceutico debe cumplir con los requisitos indicados en la Tabla 1, cuando se somete a los métodos analíticos indicados.

TABLA 1. Micelio Seco para uso nutraceutico o farmaceutico.

Proteína (N x 4,15)	% m/m	10 máx
Humedad (115° C)	% m/m	10 máx
Cenizas Totales	% m/m	1 máx
Cobre (Cu)	mg/kg	25 máx
Bacterias Mesófilas Aerobias	UFC/g	< 100000
Hongos y Levaduras	UFC/g	< 1000
E-Coli	UFC/g	Ausente
Salmonella	UFC/g	Ausente

4.2. MICELIO SECO - ALIMENTACIÓN ANIMAL

El Micelio seco para uso animal debe cumplir con los requisitos indicados en la Tabla 2, cuando se somete a los métodos analíticos indicados.

TABLA 2. Micelio Seco para uso animal.

Proteína Total	% m/m	12 mín
Humedad (115°C)	% m/m	10 máx
Cenizas Totales	% m/m	2,0 máx
Grasa	% m/m	2,0 Min

4.3. MICELIO SECO - USO INDUSTRIAL

El Micelio seco para uso industrial debe cumplir con los requisitos indicados en la Tabla 3, cuando se somete a los métodos analíticos indicados.

TABLA 3. Micelio Seco para uso industrial.

Proteína Total	% m/m	15 máx
Humedad (115°C)	% m/m	10 máx
Ceniza total	%m/m	1,0 máx

4.4. DENSIDAD APARENTE TÍPICA

El valor típico para la densidad aparente del Micelio que se lista a continuación, es de carácter informativo y no como especificación.

Densidad aparente típica - Micelio	
lb/ft ³	kg/cm ³
47,44	760

4.5. PLAN DE INSPECCIÓN Y ENSAYO

Se siguen los procedimientos indicados en la norma [TC-PRO-001 PRODUCTO TERMINADO. PLAN DE INSPECCIÓN Y ENSAYO.](#)

4.6. CRITERIO DE ACEPTACIÓN O RECHAZO

El producto debe cumplir de acuerdo a las especificaciones de la tabla 1-2-3 según su uso.

5. EMPAQUE Y ROTULADO

5.1 EMPAQUE

Sólido granulado empaquetado en sacos de polipropileno con capacidad de 45 kg y en supersacos de 600 kg rotulados con el correspondiente lote.

6. ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE

6.1 ALMACENAMIENTO

- Evite la exposición prolongada y directa del producto a los rayos solares, temperaturas extremas o en ambientes contaminantes.
- Evite el almacenamiento y transporte del producto en ambientes húmedos o con humedad relativa mayores de 70%

6.2 TRANSPORTE

- Evite la exposición del Micelio de Sucroal a temperaturas extremas o rayos solares directos, durante el transporte
- No someter el Micelio de Sucroal a Humedad relativa alta, intemperie o lluvia, durante el transporte.
- No se debe transportar Micelio Sucroal en vehículos que no ofrezcan garantía de conservación física (carpas, pisos, carrocerías, en mal estado o deficientes) y química (solventes, plaguicidas, detergentes, derivados del petróleo) del producto.
- Los vehículos o contenedores que transporten Micelio de Sucroal deben estar exentos de todo residuo u olores que puedan alterar el empaque o el producto.

7. ASPECTOS DE SEGURIDAD

7.1 MANEJO Y CUIDADOS

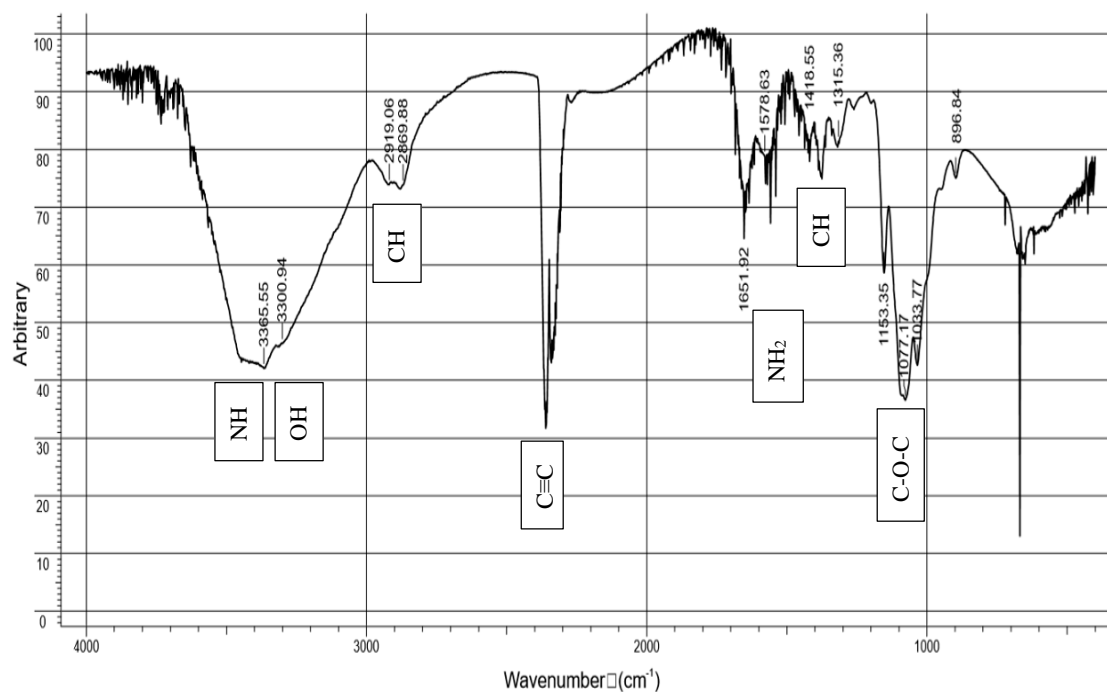
El Micelio no representa riesgo alguno para la salud, se recomienda durante su manejo observar buenas prácticas de manufactura. Para su manejo en plantas industriales, se recomienda el uso de protección respiratoria, gafas protectoras, cofia para la protección del cabello.

7.2 FECHA DE VENCIMIENTO

El Micelio debe ser almacenado según el numeral 6.1 y transportado según el numeral 6.2 presenta una vida útil de 6 meses.

Elaborado por:	Sandra Miema Rubiano Analista I Laboratorio Cítrico	Fecha de Vigencia: 2017-07-21
Aprobado por:	Anthony Toro Profesional de Calidad	Fecha Última Revisión: 2017-07-21

Anexo B: Espectro Infrarrojo de muestra de quitosano comercial de cáscaras de cangrejo, >75% de grado de desacetilación.



Fuente: Rodríguez, et al, 2010.

Tabla I: Grupos Funcionales de la Muestra de Quitosano Comercial

Grupos Funcionales	Compuestos	Banda de absorción (cm ⁻¹)
C-O-C	Éteres, ésteres, ácidos carboxílicos y alcoholes	1077.17
CH	Alcanos	1418.55
		2869.88
NH ₂	Aminas primarias y amidas	1578.63
C≡C	Alquinos	2350.88
OH	Alcoholes y ácidos carboxílicos	3365.55
NH	Aminas primarias y secundarias	3365.55

Fuente: Rodríguez, et al, 2010.

Anexo C: Examen microbiológico de la solución formadora de recubrimientos comestibles (Solución C).



Servicios Analíticos Químicos y Microbiológicos
en Aguas y Alimentos

EXAMEN MICROBIOLÓGICO

CÓDIGO 030-19

CLIENTE: Sr. Adrián Hidalgo		
DIRECCIÓN: Ciudadela de los Ingenieros Civiles		TELÉFONO:
TIPO DE MUESTRA: Alimento de almidón y quitosano		
FECHA DE RECEPCIÓN: 11 de enero del 2019		
FECHA DE MUESTREO: 11 de enero del 2019		
EXAMEN FÍSICO		
COLOR: Verdoso		
OLOR: Característico		
ASPECTO: Normal, libre de material extraño		
PARAMETROS	MÉTODO	RESULTADO
<i>Coliformes totales UFC/ ml</i>	Siembra en masa	Ausencia
<i>Escherichia Coli UFC/ ml</i>	Siembra en masa	Ausencia
<i>Aerobios mesófilos UFC/ ml</i>	Siembra en masa	10
<i>Mohos y levaduras UFC/ ml</i>	Siembra en masa	Ausencia
FECHA DE ANÁLISIS: 11 de enero del 2019		
FECHA DE ENTREGA: 18 de enero del 2019		
RESPONSABLE:		
		
Dra. Gina Álvarez R.		
El informe sólo afecta a la muestra solicitada a ensayo, el informe no deberá reproducirse sino en su totalidad previo autorización de los responsables.		

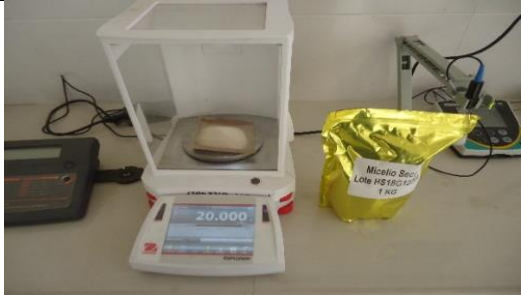





Anexo D: Extracción de quitosano a partir del micelio de *Aspergillus niger*.

Tabla II: Descripción del Diseño Experimental

Cantidad de Micelio <i>Aspergillus niger</i> (g)	Concentración de NaOH (p/v)	Concentración de HCl (v/v)	Número de Repeticiones
20	20 %	5 %	3
20	35 %	10 %	3
20	50 %	15 %	3

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Tabla III: Descripción del Procedimiento




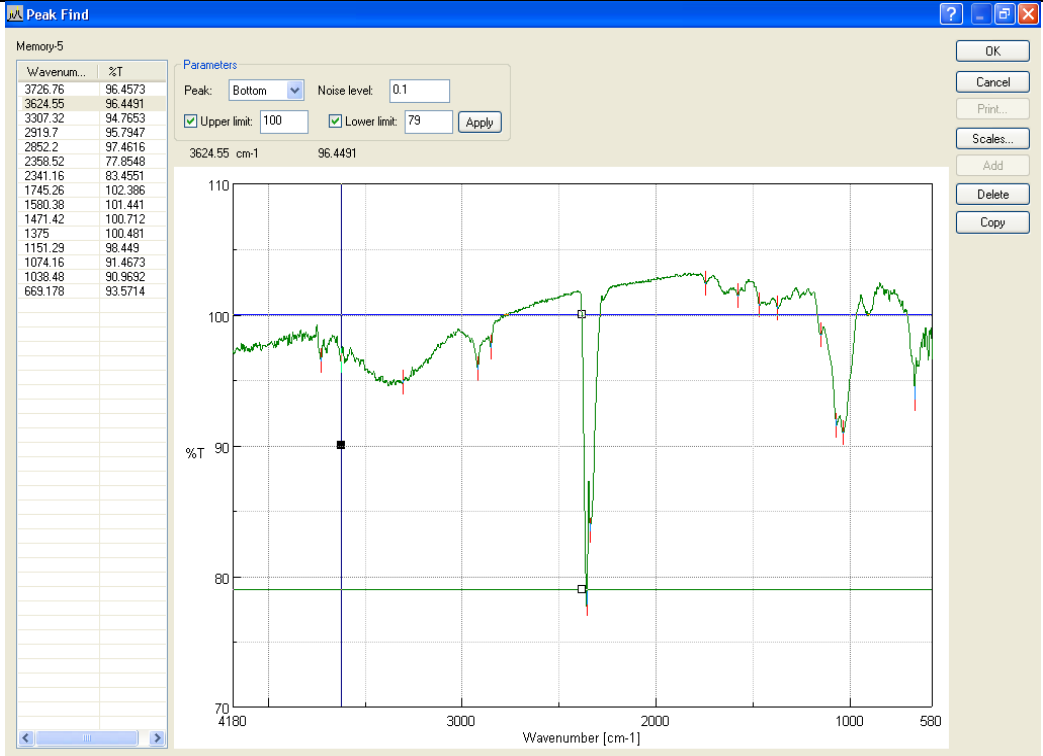
Extracción del Quitosano	
1. Pesar 20 g para cada muestra de micelio seco de <i>Aspergillus niger</i> .	2. Lavar las muestras de micelio con agua destilada., hasta desaparecer coloración.
	
3. Secar las muestras de micelio en la estufa a 90°C.	4. Realizar el tratamiento del micelio con NaOH al 20, 35 y 50%; y calentar las mezclas a 90-95°C.
	
5. Dejar en reposo la mezcla por 12 horas.	6. Filtrar las muestras tratadas con agua destilada.
	

<p>7. Lavar la masa resultante de color crema con agua y etanol.</p>	<p>8. Realizar el tratamiento de las muestras con HCl al 5, 10 y 15%, y agitar de forma constante.</p>
	
<p>9. Centrifugar las mezclas a 5000 rpm, durante 30 minutos.</p>	<p>10. Adicionar NaOH al 20, 35 y 50%, al polímero extraído, y dejar que se sedimente por 12 horas.</p>
	
<p>11. Volver a centrifugar las mezclas a 5000 rpm, durante 30 minutos.</p>	<p>12. Filtrar y lavar las muestras de quitosano con agua y etanol.</p>
	
<p>13. Secar las muestras obtenidas en la estufa.</p>	<p>14. Muestra de quitosano final.</p>
	
<p>15. Determinar el rendimiento de quitosano en cada prueba experimental, utilizando la siguiente ecuación:</p>	
$\% R = \frac{m_{\text{quitosano}}}{m_{\text{micelio}}} * 100$ <p>Ecuación I</p> <p>Donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> - $m_{\text{quitosano}}$ = masa del quitosano extraído, en gramos. - m_{micelio} = masa de la muestra de micelio, en gramos. - %R = porcentaje de rendimiento del quitosano. 	

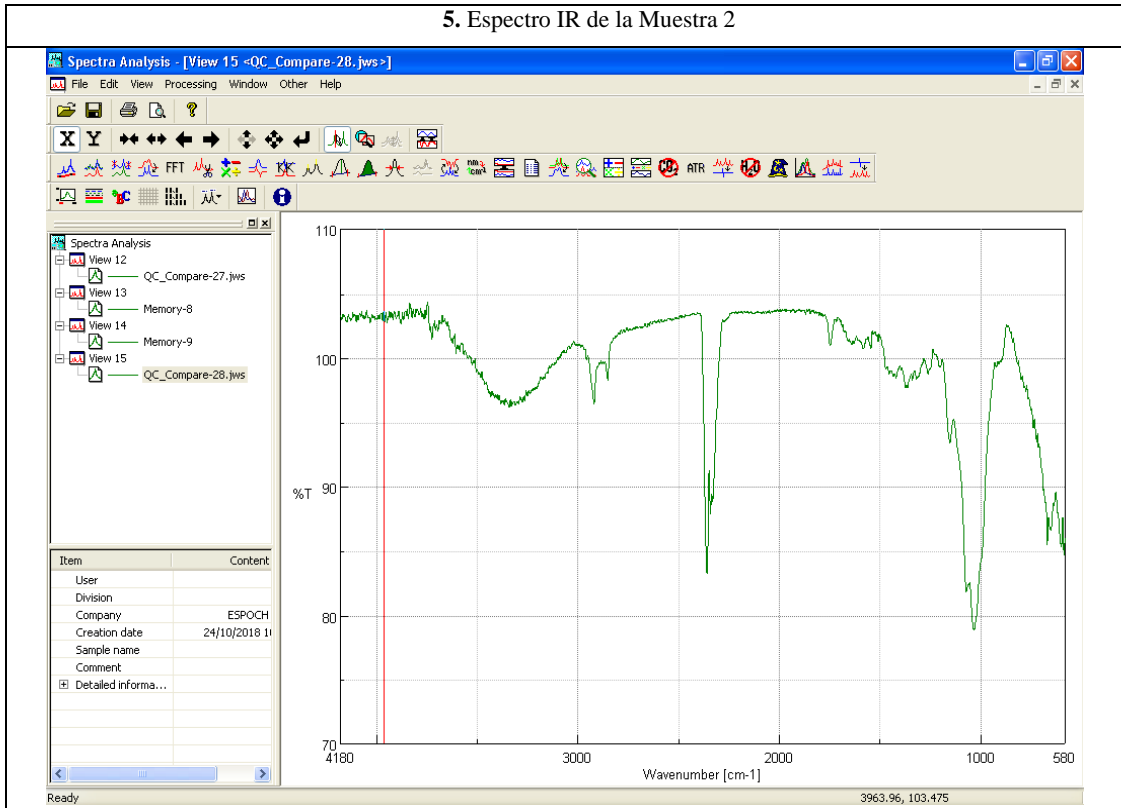
Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Anexo E: Caracterización por Espectroscopia Infrarrojo de las muestras de quitosano.

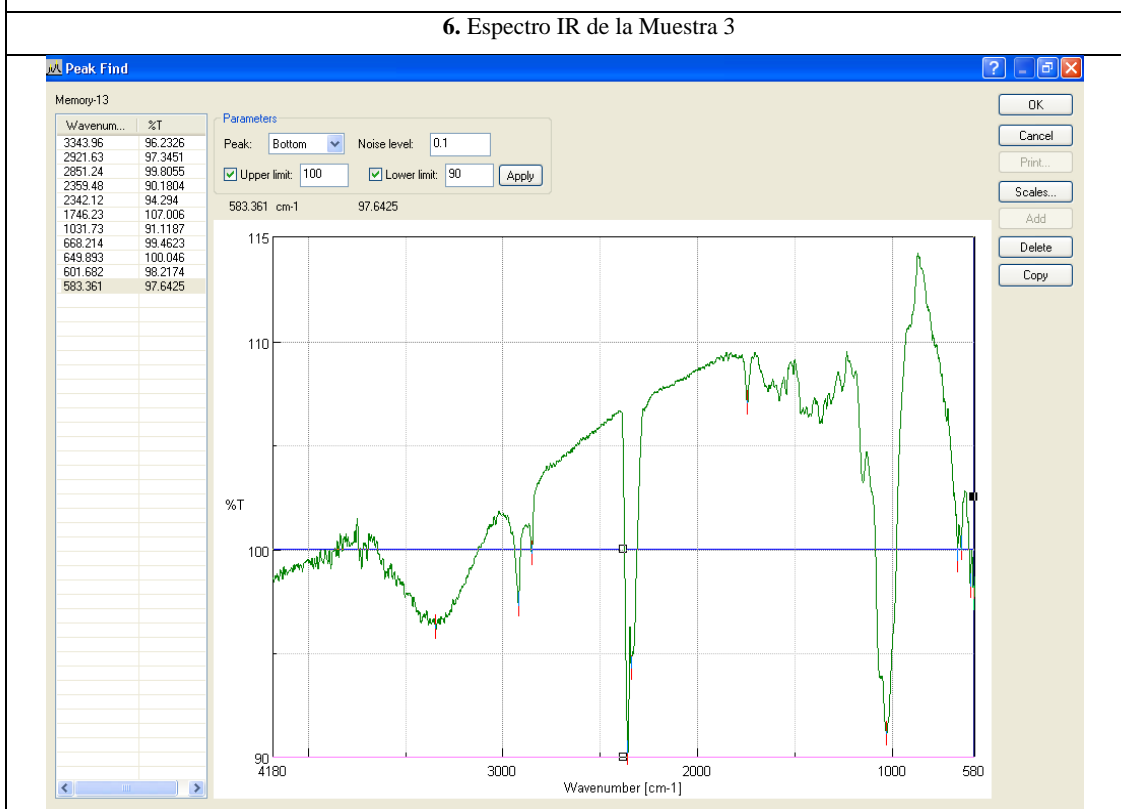
Tabla IV: Descripción del Procedimiento

Caracterización por Espectroscopia Infrarrojo	
1. Triturar las muestras de quitosano.	2. Preparar 3 muestras de cada tratamiento.
	
3. Realizar el análisis en el espectrofotómetro infrarrojo y seleccionar los 3 mejores resultados a cada concentración de reactivos.	
	
4. Espectro IR de la Muestra 1	
	

5. Espectro IR de la Muestra 2



6. Espectro IR de la Muestra 3



7. Se determinó el grado de N-Acetilación de cada muestra, utilizando la siguiente ecuación:




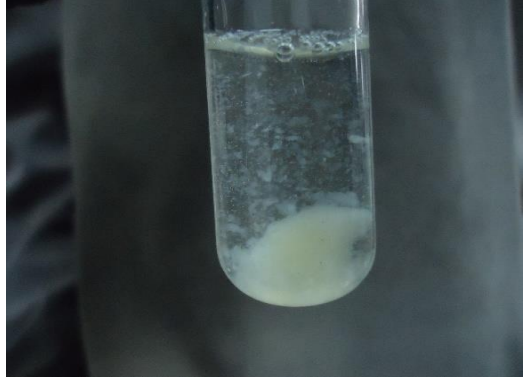

$$\text{Grado de N-Acetilación} = 31.92 * \left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}} \right) - 12.2 \quad \text{Ecuación II}$$

8. Se determinó el grado de Desacetilación con la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de Desacetilación} = 100 - \text{Grado de N-Acetilación} \quad \text{Ecuación III}$$

Anexo F: Pruebas de solubilidad del quitosano.






Tabla V: Solubilidad del Quitosano

Pruebas de Solubilidad	
Tomar 5 muestras pequeñas de quitosano y realizar las pruebas de solubilidad en ácidos diluidos.	
1. Ácido acético 10%.	2. Ácido clorhídrico 1%.
	
3. Ácido clorhídrico 10%.	4. Ácido cítrico 10%.
	
5. Ácido sulfúrico 1%.	
	

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Anexo G: Determinación del porcentaje de humedad en la muestra de quitosano.


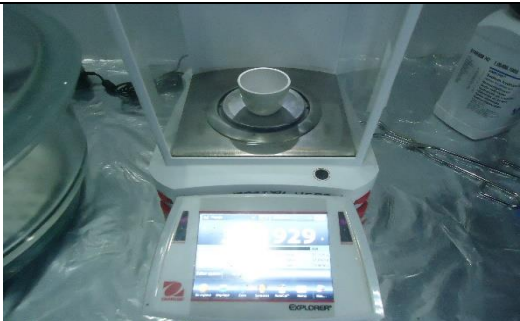
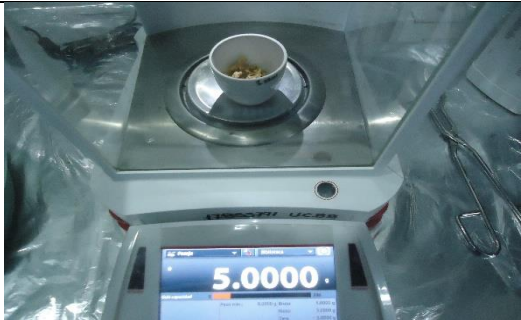



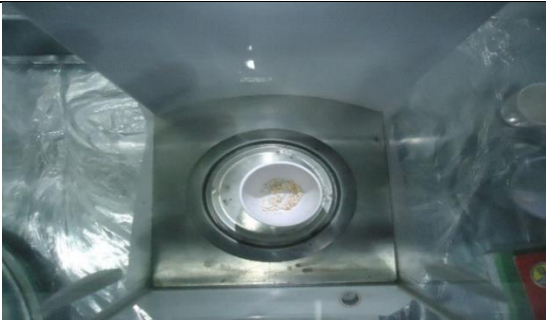
Tabla VI: Descripción del Procedimiento

Determinación de la Humedad	
<p>1. Realizar el taraje de los crisoles.</p>	<p>2. Pesarse los crisoles vacíos.</p>
	
<p>3. Pesarse 5 g de cada muestra de quitosano.</p>	<p>4. Secarse las muestras de quitosano hasta peso constante.</p>
	
<p>5. Pesarse las muestras secas del quitosano.</p>	
	
<p>6. Se determinaron los porcentajes de humedad de cada muestra, utilizando la siguiente ecuación:</p>	
$\% H = \frac{m_{\text{muestra}} - (m_{\text{crisol}} + \text{muestra seca} - m_{\text{crisol}})}{m_{\text{muestra}}} * 100$	
<p>Ecuación IV</p>	
<p>Donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> - m_{muestra} = masa de la muestra de quitosano, en gramos. - m_{crisol} = masa del crisol seco, en gramos. - $m_{\text{crisol}} + \text{muestra seca}$ = sumatoria de la masa del crisol y de la muestra seca de quitosano, en gramos. - %H = porcentaje de humedad de la muestra de quitosano. 	

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Anexo H: Determinación del porcentaje de cenizas totales en la muestra de quitosano.

Tabla VII: Descripción del Procedimiento

Determinación de Cenizas Totales	
1. Realizar el taraje de los crisoles.	2. Pesar los crisoles vacíos.
	
3. Pesar 5 g de cada muestra de quitosano.	4. Secar las muestras hasta peso constante.
	
5. Pesar 5 g de cada muestra de quitosano.	6. Realizar la calcinación de las muestras.
	
7. Pesar las cenizas obtenidas de la calcinación.	
	

6. Determinar los porcentajes de ceniza total de cada muestra, utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ CT} = \frac{m_{\text{crisol} + \text{cenizas}} - m_{\text{crisol}}}{m_{\text{crisol} + \text{muestra seca}} - m_{\text{crisol}}} * 100 \quad \text{Ecuación V}$$

Donde:

- m_{crisol} = masa del crisol seco, en gramos.
- $m_{\text{crisol} + \text{muestra seca}}$ = sumatoria de la masa del crisol y de la muestra seca de quitosano, en gramos.
- $m_{\text{crisol} + \text{cenizas}}$ = sumatoria de la masa del crisol y de las cenizas de la muestra, en gramos.
- % CT = porcentaje de cenizas totales de la muestra de quitosano.

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Anexo I: Determinación del peso molecular del quitosano.

Tabla VIII: Descripción del Procedimiento

Determinación del Peso Molecular	
<p>1. Pesar 1.5 g para cada muestra de quitosano.</p>	<p>2. Disolver las muestras en ácido acético al 1%.</p>
	
<p>3. Preparar soluciones de quitosano a 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 y 0.01 g/mL.</p>	<p>4. Determinar la viscosidad dinámica de cada solución.</p>
	
<p>5. Determinar la densidad de cada solución, mediante la siguiente ecuación:</p>	
$\rho = \frac{m_{\text{picnómetro} + \text{muestra}} - m_{\text{picnómetro}}}{V_{\text{picnómetro}}}$	
<p>Ecuación VI</p>	
<p>Donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> - $m_{\text{picnómetro}}$ = masa del picnómetro seco, en gramos. - $m_{\text{picnómetro} + \text{muestra}}$ = masa del picnómetro con la muestra, en gramos. - $V_{\text{picnómetro}}$ = volumen del picnómetro, en mililitros. - ρ = densidad de la solución, en gramos/mililitros. 	
<p>6. Determinar la viscosidad cinemática de las soluciones, mediante la siguiente ecuación:</p>	
$v = \frac{\eta}{\rho}$	
<p>Ecuación VII</p>	
<p>Donde:</p> <ul style="list-style-type: none"> - η = viscosidad dinámica de la solución, en centipoise (cps). - ρ = densidad de la solución, en gramos/mililitros. - v = viscosidad cinemática de la solución, en centistokes (cst). 	

7. Determinar la viscosidad relativa de las soluciones de quitosano, empleando la siguiente ecuación:

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta'} \quad \text{Ecuación VIII}$$

Donde:

- η = viscosidad dinámica de la solución de quitosano, en centipoise (cps).
- η' = viscosidad dinámica de la solución del solvente puro, en centipoise (cps).
- η_r = viscosidad relativa de la solución de quitosano.

8. Determinar la viscosidad específica de las soluciones de quitosano, mediante la siguiente ecuación:

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad \text{Ecuación IX}$$

Donde:

- η_r = viscosidad relativa de la solución de quitosano.
- η_{sp} = viscosidad específica de la solución de quitosano.

9. Determinar la viscosidad reducida de las soluciones de quitosano, utilizando la siguiente ecuación:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad \text{Ecuación X}$$

Donde:

- η_{sp} = viscosidad específica de la solución de quitosano.
- C = concentración de la solución de quitosano, en g/ml.
- η_{red} = viscosidad reducida de la solución de quitosano, en ml/g.

10. Determinar el peso molecular aproximado del quitosano, utilizando la ecuación de Mark-Houwink-Sakurada:

$$[\eta] = k * MV^\alpha \quad \text{Ecuación XI}$$

Donde:

- $[\eta]$ = viscosidad intrínseca del quitosano, en mililitros/gramos.
- k = constante empírica del polímero, el solvente y la temperatura.
- α = constante empírica del polímero, el solvente y la temperatura.
- MV = peso molecular del quitosano, en gramos/mol.

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019



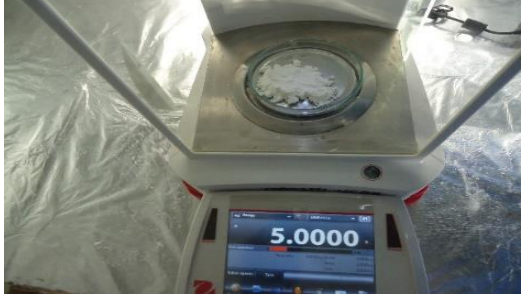


Anexo J: Elaboración de los recubrimientos comestibles.

Tabla IX: Composición de las Soluciones de Recubrimientos Comestibles

Soluciones	Componentes (v/v)		Glicerina (v/v)
	Solución de Quitosano	Solución de Almidón	
A	20 %	80 %	2 %
B	50 %	50 %	2 %
C	80 %	20 %	2 %

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

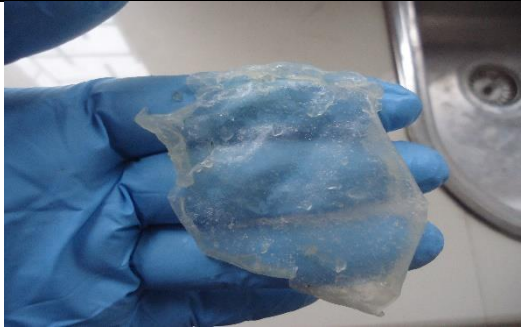

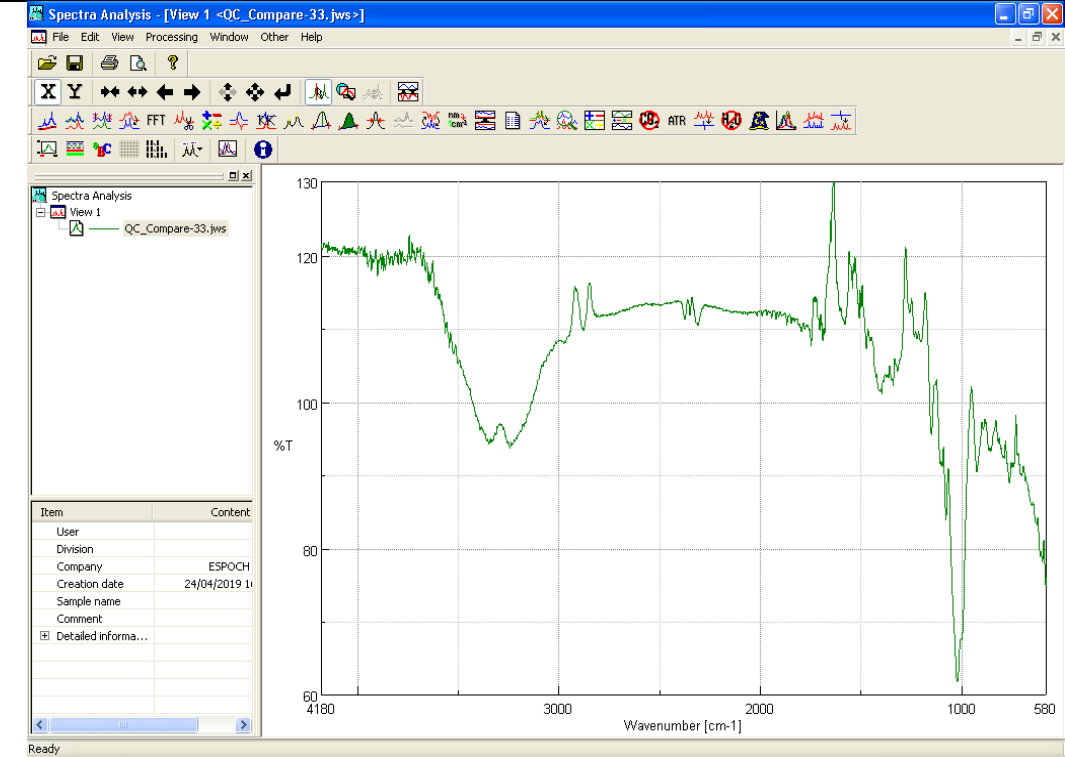
Tabla X: Descripción del Procedimiento

Elaboración de los Recubrimientos Comestibles	
1. Pesar 2.5g para cada muestra de quitosano.	2. Disolver las muestras en ácido acético al 1%.
	
3. Pesar 5g para cada muestra de almidón.	4. Mezclar cada muestra de almidón en 100 mL de agua destilada.
	
5. Elaborar 3 soluciones (A, B, C) con los componentes descritos en la Tabla IX.	
	

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Anexo K: Caracterización de los recubrimientos comestibles.

Tabla XI: Descripción del Procedimiento

Caracterización de los Recubrimientos Comestibles																	
<p>1. Colocar 25 mL de cada solución (A, B, C) en cajas Petri y secar. Retirar las películas formadas de la superficie de moldeo y observar sus características físicas.</p>	<p>2. Realizar la medición del pH de cada solución (A, B, C) en un pH-metro.</p>																
																	
<p>3. Realizar un análisis por espectroscopía infrarrojo del recubrimiento seleccionado para las pruebas de conservación de las frutas (Solución C)</p>																	
 <table border="1"><thead><tr><th>Item</th><th>Content</th></tr></thead><tbody><tr><td>User</td><td></td></tr><tr><td>Division</td><td></td></tr><tr><td>Company</td><td>ESPOCH</td></tr><tr><td>Creation date</td><td>24/04/2019 11:...</td></tr><tr><td>Sample name</td><td></td></tr><tr><td>Comment</td><td></td></tr><tr><td>Detailed informa...</td><td></td></tr></tbody></table>		Item	Content	User		Division		Company	ESPOCH	Creation date	24/04/2019 11:...	Sample name		Comment		Detailed informa...	
Item	Content																
User																	
Division																	
Company	ESPOCH																
Creation date	24/04/2019 11:...																
Sample name																	
Comment																	
Detailed informa...																	

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019







Anexo L: Aplicación y evaluación de funcionalidad de los recubrimientos comestibles.






Tabla XII: Evaluación sensorial de las frutas

Calificativo	Nivel de Calidad
1 - 2	Mala Calidad
3 - 4	Calidad Aceptable
5 - 6	Excelente Calidad

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019

Tabla XIII: Descripción del Procedimiento

Aplicación y Evaluación de Funcionalidad de los Recubrimientos Comestibles	
1. Lavar las frutas.	2. Aplicar el recubrimiento por inmersión.
	
3. Fresas con recubrimiento a temperatura ambiente: Día N° 0.	4. Fresas con recubrimiento a temperatura ambiente: Día N° 7.
	
5. Fresas con recubrimiento a temperatura de refrigeración: Día N° 0.	6. Fresas con recubrimiento a temperatura de refrigeración: Día N° 16.
	

<p>7. Moras con recubrimiento a temperatura ambiente: Día N° 0.</p>	<p>8. Moras con recubrimiento a temperatura ambiente: Día N° 7.</p>
	
<p>9. Moras con recubrimiento a temperatura de refrigeración: Día N° 0.</p>	<p>10. Moras con recubrimiento a temperatura de refrigeración: Día N° 12.</p>
	
<p>11. Comparación entre una fruta con recubrimiento y una sin recubrimiento</p>	
	
<p>12. Determinar el peso promedio diario de las frutas, con la siguiente ecuación:</p>	
$\bar{x} = \frac{(P_1 + P_2 + P_3 + P_4 + P_5)}{n}$	
<p style="text-align: right;">Ecuación XII</p>	
<p>Donde:</p>	
<ul style="list-style-type: none"> - P_n = peso de cada fruta, en gramos. - n = número de frutas pesadas. - \bar{x} = peso promedio diario de las frutas, en gramos. 	
<p>13. Calcular la pérdida de peso de las frutas, utilizando la siguiente ecuación:</p>	
$\% Pp = \frac{(P_{\text{día } 0} - P_{\text{día } n})}{P_{\text{día } 0}} * 100$	
<p style="text-align: right;">Ecuación XIII</p>	
<p>Donde:</p>	
<ul style="list-style-type: none"> - $P_{\text{día } 0}$ = peso promedio de las frutas el primer día de evaluación, en gramos. - $P_{\text{día } n}$ = peso promedio de las frutas en “n” día de evaluación, en gramos. - $\% Pp$ = porcentaje de pérdida de peso de las frutas. 	

Realizado por: Adrián Hidalgo, 2019