

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE VIDA ÚTIL DE NARANJAS (*Citrus sinensis*) SIN CÁSCARA CUBIERTAS CON LÁMINAS COMESTIBLES ALMACENADAS A 14 °C

Por

Victoria E. Astudillo Garcés

Tesis sometida en cumplimiento parcial de los requisitos para el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

En

CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO
Recinto Universitario de Mayagüez
Facultad de Ciencias Agrícolas
2017

Aprobado por:

Lynette E. Orellana Feliciano, Ph.D
Miembro, comité graduado

Fecha

Félix M. Román Pérez, Ms
Miembro, comité graduado

Fecha

María de L. Plaza Delestre, Ph.D
Presidente, comité graduado

Fecha

Rocío Zapata, Ms
Representante, Estudios Graduados

Fecha

Fernando Pérez, Ph.D
Coordinador
Programa Ciencia y Tecnología de Alimentos

Fecha

Derechos de Autor Reservados ©

Victoria E. Astudillo Garcés

2017

ABSTRACT

The Citrus Producers Association of Puerto Rico produces peeled oranges. When the shell is removed, it faces the problem of a short shelf life for this product. This research was carried out to evaluate the use of edible film that can be used to extend the shelf life of shelled fresh oranges at 14.0 ± 1.0 °C. Control samples were evaluated against two treatments: 5 % hydroxypropylmethylcellulose with 2.5 % glycerol and 2 % potassium sorbate (HPMC + SP) and 1 % chitosan in 1% acetic acid and 15 % glycerol. Total counts of aerobic microorganisms and fungi (molds and yeasts) were performed. pH, °Brix, weight loss, firmness, appearance, color, titratable acidity and vitamin C in fruits were determined. These analyzes were carried out on days 0, 3, 6, 9, 12 and 15 for oranges with edible film. The analysis for the control sample, were conducted on days 0, 1, 3 and 5. In addition, the main sugars and organic acids contained in the Orange juice by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The quantification was performed at the beginning, intermediate and final sampling of each treatment and control. In general, oranges with edible films had a longer shelf life compared to control oranges. No significant differences were found between the oranges coated with the films, in relation to the physicochemical analysis. The oranges coated with chitosan lasted for 12 days while the HPMS + SP coated lasted 15 days, without affecting the physical and chemical properties of oranges. The use of edible films is a suitable alternative to extend the shelf life, thus increasing the marketing opportunity of shelled fresh oranges.

RESUMEN

La Asociación de Productores de Cítricos, APC de Puerto Rico produce naranjas peladas. Al ser removida la cáscara, enfrenta el problema de un corto periodo de vida útil para este producto. Esta investigación se realizó para evaluar el uso de láminas comestibles que puedan ser utilizadas para extender el largo de vida útil durante el almacenamiento de naranjas frescas sin cáscara a 14.0 ± 1.0 °C. Muestras control fueron evaluadas contra dos tratamientos (tipos de láminas): hidroxipropilmetilcelulosa 5 % con 2.5 % de glicerol y 2 % de sorbato de potasio (HPMC+SP) y quitosano 1 % en ácido acético al 1 % y 15 % de glicerol. Se realizó recuento total de microorganismos aerobios y hongos (mohos y levaduras). Se determinó pH, °Brix, pérdida de peso, firmeza, apariencia, color, acidez titulable y vitamina C en las frutas. Estos análisis se realizaron los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 a las naranjas cubiertas con lámina comestible. A las muestras control, los análisis se realizaron los días 0, 1, 3 y 5. Además, se cuantificaron los principales azúcares y ácidos orgánicos contenidos en el jugo de las naranjas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés, HPLC). La cuantificación se realizó al inicio, intermedio y final del muestreo de cada tratamiento y control. En general, las naranjas con láminas comestibles presentaron un largo de vida útil mayor al compararlo con las naranjas control. No se encontraron diferencias significativas entre las naranjas cubiertas con las láminas, respecto al análisis fisicoquímico. Las naranjas cubiertas con quitosano duraron 12 días mientras que las cubiertas con HPMS+SP duraron 15 días, sin que se afectaran las propiedades físicas y químicas de las naranjas. El uso de láminas comestibles es una buena alternativa para extender el largo de vida útil, aumentando así, la oportunidad de comercialización de las naranjas frescas sin cáscara.

A mi amado esposo e hijos

Mi tesis la dedico con todo mi amor y cariño a mi adorado esposo Sebastián Salinas, porque querer es poder, y atrás de todo buen hombre hay una buena mujer, me alegra ser tu apoyo en todo momento, y sencillamente hoy me corresponde a mí agradecerte todas las cosas buenas que has hecho por mí, me has aportado cosas gracias a tu genialidad, intelecto y amor incondicional. Gracias por creer en mi capacidad, siempre has estado brindándome tu comprensión, cariño y amor. A nuestros hijos Christopher y Gabriela, fruto de un amor puro y verdadero. Gracias hijos por ser mi mayor motivación, por ser mi norte y mi sostén emocional hacía el avance de mi desarrollo profesional, por ese aguante que como hijos me han dado, en esas horas donde sentía que mis fuerzas estaban disminuidas, en las que mi ánimo, muchas veces necesitó del amor de ustedes mis queridos hijos y tan solo una sonrisa me recompensó. Los amo inmensamente.

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios por haberme acompañado, guiado y darme la oportunidad de vivir este proceso profesional, por ser mi fortaleza en mis momentos de debilidad y por llenarme de una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

Le agradezco a la Universidad de Puerto Rico Recinto de Mayagüez, por haberme admitido y darme la oportunidad de culminar un logro más en mi vida profesional.

Gracias a mis padres, por los valores que me han inculcado, que desde la distancia siempre me han brindado su confianza, comprensión, cariño y mucho apoyo para hacer de mí una gran persona.

A mis abuelos, hermanos, primos, tías y demás familiares, quienes han estado siempre junto a mí, compartiendo cada instante de mi vida, gracias por siempre tener una palabra de aliento en los momentos más difíciles y a pesar de la distancia llevarme en sus pensamientos y mejores deseos.

De todo corazón, le agradezco a mi tutora Dra. María Plaza, por aceptarme como su estudiante, por la paciencia y comprensión. Gracias por el apoyo en cada momento que desvanecía mi ánimo, que más que una mentora se convirtió en una amiga, gracias por abrir las puertas de su casa a mi familia.

A la Dra. Lynnette Orellana, muchas gracias por toda su asesoría, confianza, apoyo y dedicación que fueron de grandísima ayuda para lograr culminar este proyecto.

Al profesor Félix Román, gracias por su colaboración y dedicación con mi trabajo.

A la Señora Rocío Zapata, representante de estudios graduados, por su colaboración.

Al Dr. Fernando Pérez, Coordinador del Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos, por su disponibilidad y diligencia.

Al profesor Ernesto Riquelme, por su colaboración, disponibilidad y gran aporte con su asesoría en la parte estadística, que me fue de gran utilidad.

A la planta de la Asociación de Productores de Cítricos de Puerto Rico, por proveer las naranjas.

Les agradezco a cada uno de mis profesores de la Maestría, por su tiempo, dedicación, gran calidad humana y por su capacidad académica, pero sobre todo por la exigencia que contribuye a mi desarrollo profesional.

A José Ariel Muñoz, Administrador de la Finca Alzamora, por su colaboración y confianza para el uso del laboratorio del programa doctoral de ciencias agroambientales, ubicado en la finca Alzamora.

Al Agro Jaime Reyes, por su gran colaboración y disponibilidad.

A la gran familia de química, la Dra. Ivelisse Padilla, por darme la oportunidad de trabajar como Instructora de Laboratorio de Química General y la confianza depositada en mí para apoyar en otras áreas, más que una jefa se convirtió en una amiga, gracias por el apoyo brindado y por abrir las puertas de su casa a mi familia. La profesora Verónica Sánchez, por sus enseñanzas y apoyo en el trabajo como Instructora de Laboratorio de Química General. Instructores y profesores, gracias por las experiencias compartidas.

Les agradezco a todas y cada una de las personas de la Red Sísmica de Puerto Rico con quienes tuve la fortuna de compartir, los llevo en el corazón, al Dr. Víctor Huérfano por la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo, a Annie, Yamilette y Dalixza por la confianza, colaboración y apoyo en el proceso de culminación de mi maestría.

A todas aquellas personas que me brindaron su apoyo desinteresado en la semana que estuve hospitalizada por mi cirugía, mil y mil gracias, su apoyo fue de gran aporte para que todo resultara bien. A Bessie, muchísimas gracias por el apoyo incondicional brindado en todo momento, por tus sabios consejos y por compartir momentos inolvidables, tu eres mi angelito en la tierra, te llevo en el corazón. A Efraín, mil gracias por toda tu colaboración y amistad sincera, eres una excelente persona, ya eres parte de mi familia.

Finalmente, a mis amigos y compañeros, quienes me han acompañado a lo largo de la Maestría, compartiendo su amistad y momentos inolvidables. A ellos mil y mil gracias, deseándoles el mayor de los éxitos en su desempeño profesional.

TABLA DE CONTENIDO

ABSTRACT	iii
RESUMEN	iv
AGRADECIMIENTOS	v
TABLA DE CONTENIDO	viii
LISTA DE TABLAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
1. JUSTIFICACIÓN	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 La naranja.....	3
2.1.1 Estructura de la naranja.....	3
2.1.2 Composición de la naranja.....	5
2.1.3 Maduración.....	8
2.1.4 Cambios composicionales.....	9
2.2 Problemática de los cítricos en poscosecha	10
2.2.1 Respiración.....	12
2.2.1.1 Climaterio.....	13
2.2.2 Transpiración.....	14
2.2.3 Alteraciones fisiológicas	16
2.2.4 Alteraciones físicas.....	18
2.2.5 Alteraciones patológicas.....	18
2.3 Criterios de calidad	21
2.4 Tratamientos poscosecha en cítricos.....	22
2.4.1 Láminas comestibles	24
2.4.1.1 Lámina de Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC).....	26
2.4.1.2 Lamina de Quitosano	28
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Objetivo general	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. MÉTODOLOGÍA	32
4.1 Obtención de las naranjas.....	32

4.2	Elaboración de las láminas comestibles	32
4.2.1	Lámina de Quitosano	33
4.2.2	Lámina de Hidroxipropilmetilcelulosa (Celulosa modificada).....	33
4.3	Recubrimiento de las naranjas sin cáscara con láminas comestibles.....	34
4.4	Condiciones de almacenamiento y muestreo.....	35
4.5	Muestreo	35
4.6	Tratamiento de la muestra	36
4.7	Análisis Fisicoquímico.....	37
4.7.1	Medición de pH.....	37
4.7.2	Medición de Sólidos Solubles totales (°Brix)	37
4.7.3	Determinación de Pérdida de peso	37
4.7.4	Medición de Firmeza	38
4.7.5	Medición de Color.....	39
4.7.6	Determinación de Acidez titulable	40
4.7.7	Determinación de Vitamina C por titulación.....	41
4.7.8	Determinación de Azúcares por HPLC.....	42
4.7.8.1	Preparación de muestras	43
4.7.8.2	Preparación de estándares y curva de calibración.....	44
4.7.8.3	Condiciones y determinación de azúcares por el equipo HPLC	44
4.7.9	Determinación de Ácidos Orgánicos por HPLC.....	45
4.7.9.1	Preparación de muestras	46
4.7.9.2	Preparación de estándares y curva de calibración.....	46
4.7.9.3	Condiciones y determinación de azúcares por el equipo HPLC	47
4.8	Análisis Microbiológico.....	48
4.9	Apariencia	50
4.10	Análisis estadístico	50
5.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	52
5.1	Análisis Fisicoquímico.....	52
5.1.1	Medición de pH.....	52
5.1.2	Determinación de Sólidos Solubles (°Brix)	53
5.1.3	Determinación de Pérdida de peso	55
5.1.4	Medición de Firmeza	57
5.1.5	Medición de Color.....	59
5.1.6	Determinación de Acidez titulable	62

5.1.7	Determinación de Vitamina C	64
5.1.8	Determinación de Azúcares por HPLC	65
5.1.8.1	Cuantificación de Sacarosa	65
5.1.8.2	Cuantificación de Glucosa	70
5.1.8.3	Cuantificación de Fructosa.....	71
5.1.9	Determinación de Ácidos Orgánicos por HPLC	73
5.1.9.1	Cuantificación de ácido cítrico	74
5.1.9.2	Cuantificación de ácido málico.....	78
5.1.9.3	Cuantificación de ácido ascórbico.....	79
5.2	Análisis Microbiológico	83
5.2.1	Recuento de bacterias aerobias	83
5.2.2	Recuento de mohos y levaduras	86
5.3	Apariencia	90
6.	CONCLUSIONES	92
7.	RECOMENDACIONES.....	94
8.	BIBLIOGRAFÍA	95
9.	ANEXOS	99

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Equivalencia en el día de muestreo con respecto al número de muestreo.	51
Tabla 2. Equivalencia en el día de muestreo con respecto al número de muestreo para los análisis de azúcares y ácidos orgánicos.....	51
Tabla 3. Parámetro de pH en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.....	53
Tabla 4. Parámetro de °Brix en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.....	54
Tabla 5. Pérdida de peso en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.....	56
Tabla 6. Firmeza en naranjas sin cáscara tratadas a través del tiempo.....	58
Tabla 7. Color en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.	60
Tabla 8. Acidez titulable en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.....	62
Tabla 9. Vitamina C en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.	64
Tabla 10. Concentración de azúcares en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.	69
Tabla 11. Concentración de ácidos orgánicos en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.	77
Tabla 12. Recuentos de bacterias aerobias en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.	83
Tabla 13. Recuentos de mohos y levaduras en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de un cítrico. Dibujo del corte transversal de un fruto maduro de cítrico.....	4
Figura 2. Estructura de la quitina y del quitosano.	29
Figura 3. Coordenadas de color en el sistema Hunter Lab	39
Figura 4. Representación del tono de un color (en escala de grados), indicando posiciones angulares de los tonos.	39
Figura 5. Cromatograma de una mezcla estándar de azúcares (STD): Sacarosa, Glucosa y Fructosa.	66
Figura 6. Cromatogramas de muestras de naranjas tratadas con quitosano, celulosa y control.	67
Figura 7. Cromatogramas de estándares de ácidos orgánicos (STD): Ácido Cítrico (210 nm), Acido Málico (210 nm) y Ácido Ascórbico (250 nm)	75
Figura 8. Cromatogramas de muestras de naranjas tratadas con quitosano, celulosa y control a 210 nm de longitud de onda. Ácido Cítrico (1), Acido Málico (2) y Ácido Ascórbico (3).....	76
Figura 9. Cromatogramas de muestras de naranjas tratadas con quitosano, celulosa y control a 250 nm de longitud de onda. Ácido Ascórbico (3).	81
Figura 10. Imágenes de naranjas tratadas con láminas comestibles de quitosano y celulosa y control, en los tiempos iniciales y finales.....	91

1. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día más consumidores buscan comodidad en frutas y verduras mínimamente procesadas. La demanda del mercado de frutas y verduras mínimamente procesadas ha experimentado una rápida expansión en los últimos años, debido al agitado estilo de vida, a su fácil adquisición y a la conciencia de la salud, en los consumidores. La preservación de los productos mínimamente procesados presenta desafíos únicos para la industria alimenticia debido a que estos productos, tienen un metabolismo activo que pueden resultar en productos rápidamente deteriorados si no se controlan sus metabolismos (McHugh & Senesi, 2000).

Las naranjas, como parte de las frutas cítricas sufren una serie de cambios fisiológicos y bioquímicos después de la cosecha. Estos cambios aceleran el envejecimiento de la fruta y pueden producir el deterioro del sabor, cambio de color, pérdida de peso, ablandamiento, pudrición, entre otros. Por lo tanto, los métodos de almacenamiento de frutas tienen un impacto significativo en su vida útil. La capacidad para mantener la calidad de la fruta puede ser utilizada como un indicador importante para comparar los diferentes métodos de almacenamiento, y es especialmente útil para la evaluación de las propiedades sensoriales. Generalmente, el sabor de la fruta es controlado por su composición química, y el equilibrio entre azúcar y ácido, el cual es crucial en el control de los cambios de sabor en las frutas de poscosecha (Sun et al., 2012).

Como una alternativa para conservar las naranjas frescas sin cáscara se encuentra el recubrimiento con láminas comestibles. El desarrollo de nuevos recubrimientos comestibles con una mejor funcionalidad y el rendimiento de frutos frescos y mínimamente procesados es uno de los retos de la industria poscosecha. En los últimos años, los esfuerzos de investigación se han centrado en el diseño de nuevos revestimientos ecológicos a base de polímeros biodegradables, que no sólo reducen los requisitos de embalaje, sino también que conducen a la conversión de los subproductos de la industria alimentaria en un valor añadido de componentes formadores de películas. Tradicionalmente, los recubrimientos comestibles se han utilizado como una barrera para minimizar la pérdida de agua y retrasar la senescencia natural de las frutas recubiertas a través de la permeabilidad selectiva a los gases (Campos, Gerschenson, & Flores, 2010).

Debido al interés de la Asociación de Productores de Cítricos (APC) de participar en el comercio de naranjas sin cáscara a nivel internacional, esta investigación se enfocó en los patrones de variación de azúcares solubles y ácidos orgánicos, así como la calidad física y microbiológica en las naranjas sin cáscara. Para poder incursionar en la venta a nivel internacional, es de suma importancia mantener propiedades organolépticas de frescura y de larga vida útil. Es por esto que se hace indispensable recurrir al uso de técnicas de valor agregado, que consiste en revestir las naranjas sin cáscara con una lámina comestible que ayude a mantener estables dichas propiedades de frescura y de excelente calidad física, química y microbiológica. Se espera, que esta investigación proporcione información teórica sobre las prácticas de almacenamiento de cítricos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 La naranja

La naranja es nativa de la región tropical y subtropical de Asia. La naranja se originó desde hace unos 20 millones de años en el sudeste asiático. Desde entonces hasta ahora han sufrido numerosas modificaciones debido a la selección natural y a hibridaciones tanto naturales como producidas por el hombre, dispersándose alrededor del mundo. Existen diversas especies de naranja, entre ellas está la naranja dulce (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) y dentro de esta especie se conocen diferentes variedades como 'Valencia', 'Criolla', entre otras. Todas estas variedades se utilizan para el consumo en fresco y elaboración de productos a base de cítricos tales como: jugos, jaleas y dulces. Otra especie es la naranja agria (*Citrus aurantium*) que es utilizada para la extracción de aceites, en la parte ornamental. La naranja como todas las frutas cítricas contiene de un 40 – 50 % de zumo, 20 – 40 % de piel y un 20 – 30 % de pulpa y semillas. Aproximadamente un 90 % de su contenido es agua con un 5 % de azúcares (Kelebek, Selli, Canbas, & Cabaroglu, 2009).

2.1.1 Estructura de la naranja

El fruto de los cítricos es una baya denominada hesperidio de forma esférica, redonda achatada u ovoide (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007). La naranja como un fruto cítrico, tiene dos partes anatómicas: el pericarpo o cáscara y el endocarpo o pulpa, que es la parte comestible del fruto (Soler Fayos, 2009; Sun et al., 2012). La figura 1 ilustra la morfología de los frutos cítricos.

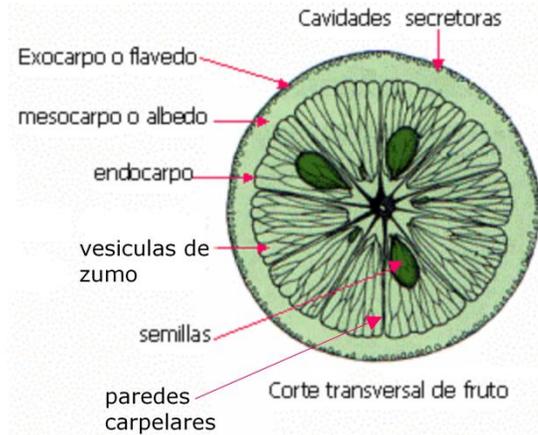


Figura 1. Morfología de un cítrico. Dibujo del corte transversal de un fruto maduro de cítrico (Soler Fayos, 2009).

El pericarpo, a su vez, está formado por el exocarpo y el mesocarpo. El exocarpo o flavedo, está formado por células parenquimáticas densamente empaquetadas con una fina cutícula en su parte más externa. El mesocarpo o albedo es un tejido blanco esponjoso y el exocarpo o flavedo (cáscara) posee numerosas glándulas oleíferas muy desarrolladas que se notan en la superficie de la fruta como puntos redondos, oscuros y hundidos. El mesocarpo o albedo, está formado también por células parenquimáticas pero débilmente empaquetadas dejando grandes espacios intercelulares que proporcionan a este tejido su apariencia esponjosa característica. Este tejido es de color blanco, y cubre el endocarpo (Soler Fayos, 2009)

El endocarpo se encuentra lleno de pequeñas vesículas de pulpa ahusadas pedunculadas que son como lagrimitas o sacos de jugo. La pulpa del fruto está formada por los carpelos o gajos con sus numerosas vesículas llenas de jugo. Las vesículas de jugo, a su vez, contienen una glándula de aceite y cromatóforos que les imparten un cierto color que para el caso de las naranjas es amarillento o anaranjado. Los carpelos

o gajos están separados por una película blancuzca transparente que es una prolongación del tejido blanco esponjoso. En el interior de los gajos se encuentran las semillas que son de forma elipsoidal, en algunos casos aplanadas con un extremo terminado en un pico irregular. Las semillas pueden ser numerosas o estar prácticamente ausentes en algunos híbridos (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007). El endocarpo también se conoce como el saco de jugo y posee un alto contenido de azúcares solubles y ácidos orgánicos. El pericarpo que se compone del flavedo y albedo, ambos de los cuales son bajos en contenido de azúcares solubles y ácidos orgánicos. Durante el almacenamiento poscosecha, el pericarpo de la fruta usualmente consume sustratos durante la respiración. También, los sustratos son consumidos para suplir la energía necesaria para cumplir con la resistencia a microorganismos y diferentes condiciones de estrés. Esto resulta en la pérdida de nutrientes y la degradación de la calidad, lo cual es inaceptable para los consumidores (Sun et al., 2012).

2.1.2 Composición de la naranja

La composición de las naranjas, así como de las frutas en general, varía fuertemente con la variedad y el grado de madurez. Es así como la materia seca representa un 14.3 %, siendo los mayores constituyentes de esta los azúcares, polisacáridos y ácidos orgánicos. En menor cantidad se encuentran los compuestos nitrogenados, los lípidos, pigmentos y sustancias de aroma, los cuales son de importancia en la calidad organoléptica. Por último se pueden mencionar las vitaminas y minerales que aportan valor nutricional (Belitz, Grosch, & Schieberle, 2009).

Los cítricos representan un material potencial para la alimentación y la industria farmacéutica ya que contienen un número de metabolitos secundarios que son bioactivos. Ejemplo de esto son los flavonoides, la mayoría de los cuales existen en forma de glicósidos de flavanona, es decir, naringina, hesperidina y neohesperidina. Otro metabolito secundario son los alcaloides, principalmente de sinefrina, tiramina, octopamina y los ácidos hidroxicinámicos, incluyendo el ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido clorogénico y ácido caféico. Cada grupo de estos compuestos tiene una actividad biológica especial. Los flavonoides y los ácidos hidroxicinámicos poseen potentes propiedades tales como antioxidantes, actividad anticancerígena y actividad de barrido de radicales libres. Los protoalcaloides poseen actividad adrenérgica (estimulante) para promover la pérdida de peso. Además de su sabor y gusto, el contenido de los metabolitos secundarios de los cítricos es también muy importante para evaluar la calidad de las frutas cítricas (Dongxiu et al., 2011).

El azúcar es el componente principal que afecta la calidad del fruto, así como una de las señales moleculares que regulan la maduración de la fruta y el envejecimiento. El azúcar también juega un papel importante en la regulación de las funciones fisiológicas, metabolismo, expresión genética, el suministro de energía y sustratos de crecimiento de la planta, el desarrollo y senescencia (Sun et al., 2012). La sacarosa, fructosa y glucosa son los principales azúcares solubles en la naranja, mientras otros monosacáridos y oligosacáridos se encuentran en cantidades trazas (Belitz et al., 2009).

Como principales productos metabólicos, los ácidos orgánicos juegan un papel regulador en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los ácidos orgánicos son solutos metabólicamente activos en la osmoregulación celular y el equilibrio catiónico excesivo. Estos actúan como componentes clave en respuesta a las deficiencias nutricionales, la acumulación de iones metálicos y la interacción planta-microorganismo (Sun et al., 2012). Los ácidos cítrico, málico y quínico son los principales ácidos orgánicos encontrados en la naranja, siendo el primero el más abundante (Belitz et al., 2009).

En cuanto al aporte nutricional de la naranja, se encuentra que es fuente importante de vitamina C (ácido ascórbico), alcanzando un contenido de alrededor de 50 mg/100 g de porción comestible. Las cítricas son una excelente fuente de vitamina C, un vaso de jugo de naranja por lo general contiene la cantidad diaria requerida por el organismo humano (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007). Otras vitaminas como algunas del grupo B, vitamina A, vitamina D y tocoferoles se encuentran en cantidades casi insignificantes. Por otro lado, el aporte de minerales es principalmente de potasio como catión y entre los aniones inorgánicos el de mayor abundancia es el fosfato (Belitz et al., 2009). En términos de proteínas y grasas, los cítricos poseen un contenido de muy bajo de ambos macronutrientes.

Las sustancias de aroma importantes en la naranja variedad 'Valencia', incluyen acetaldehído, (Z)-3-hexenal, decanal, (R)-limoneno y trans-4, 5-epoxy-(E)-2-decenal. Los ésteres también son indispensables pero el aroma de mezclas recombinadas no es

mejorado cuando un miembro de este grupo se pierde. Por otro lado, la contribución de (R)- α -pineno y mirceno es despreciable (Belitz et al., 2009).

2.1.3 Maduración

La vida de los productos hortofrutícolas puede ser dividida en tres principales estados fisiológicos: crecimiento, maduración y senescencia. El crecimiento se describe como un incremento irreversible en atributos físicos del fruto. Al hablar de maduración, se puede mencionar la maduración fisiológica, hortofrutícola y de consumo u organoléptica. La senescencia es la etapa caracterizada por procesos de degradación que provocan el envejecimiento y finalmente la muerte de los tejidos del fruto (Lasallista, 2012).

La maduración es el conjunto de procesos de desarrollo y cambios observados en la fruta. En la maduración, los frutos experimentan un conjunto de cambios físicos y químicos, cuando alcanzan su tamaño definitivo y completan su desarrollo. Estos cambios, tanto químicos como físicos, hacen que la fruta alcance un color, sabor y textura que lo hace apto para consumo. Este proceso es consecuencia de la actividad bioquímica del fruto, la cual es desencadenada por los procesos fisiológicos del mismo (Lasallista, 2012). Como consecuencia de la maduración la fruta desarrolla una serie de características fisicoquímicas que permiten definir distintos estados de madurez de la misma. Todo esto es de suma importancia en poscosecha en relación a los siguientes aspectos: desarrollo de índices de madurez o cosecha, definición de técnicas y frecuencia de cosecha, exigencias de calidad del mercado (características externas/composición interna), forma de consumo del producto (natural/procesado),

aplicación de técnicas adecuadas de manejo, conservación, transporte y comercialización y posible vida útil poscosecha. En relación a los estados de madurez de la fruta, es conveniente conocer y distinguir de manera precisa el significado de los siguientes términos, de uso común en poscosecha (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007):

- **Madurez fisiológica:** Una fruta se encuentra fisiológicamente madura cuando ha logrado un estado de desarrollo en el cual ésta puede continuar madurando normalmente para consumo aún después de cosechada. Esto es una característica de las frutas climatéricas (como el plátano y otras) que se cosechan verde-maduras y posteriormente maduran para consumo en poscosecha. Las frutas no climatéricas, como los cítricos, no maduran para consumo después que se separan de la planta.
- **Madurez hortícola:** Es el estado de desarrollo en que la fruta se encuentra apta para su consumo u otro fin comercial. La madurez hortícola puede coincidir o no con la madurez fisiológica (como es el caso de los cítricos).
- **Madurez de consumo u organoléptica.** Estado de desarrollo en que la fruta reúne las características deseables para su consumo (color, sabor, aroma, textura, composición interna).

2.1.4 Cambios composicionales

Durante su desarrollo y maduración las frutas experimentan una serie de cambios internos de sus componentes, que son más evidentes durante la maduración de consumo, y que guardan una estrecha relación con la calidad y otras características de

poscosecha del producto (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007). Dentro de los principales cambios observados en las frutas maduras para consumo y su relación con la composición interna de las mismas, se pueden destacar:

- **Desarrollo del color.** Con la maduración por lo general disminuye el color verde de las frutas debido a una disminución de su contenido de clorofila y a un incremento en la síntesis de pigmentos de color amarillo, naranja y rojo (carotenoides y antocianinas) que le dan un aspecto más atractivo a ésta.
- **Desarrollo del sabor y aroma.** El sabor cambia debido a la hidrólisis de los almidones que se transforman en azúcares, por la desaparición de los taninos y otros productos causantes del sabor astringente. En adición ocurre la disminución de la acidez debido a la degradación de los ácidos orgánicos. El aroma se desarrolla por la formación de una serie de compuestos volátiles, que le imparten un olor característico a las diferentes frutas.
- **Cambios en firmeza.** Por lo general, la textura de las frutas cambia debido a la hidrólisis de los almidones y de las pectinas, por la reducción de su contenido de fibra y por los procesos degradativos de las paredes celulares. Las frutas se tornan blandas y más susceptibles de ser dañadas durante el manejo poscosecha (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

2.2 Problemática de los cítricos en poscosecha

Durante el periodo poscosecha se producen pérdidas importantes, tanto en cantidad como en calidad. Estas pérdidas dependen de la especie, método de cosecha, almacenamiento y transporte, entre otros (Lasallista, 2012). Un aspecto fundamental a

tener en cuenta en el manejo poscosecha de frutas es que éstas continúan vivas aún después de cosechadas. De tal manera, la fruta cosechada continúa respirando, madurando en algunos casos e iniciando procesos de senescencia, todo lo cual implica una serie de cambios estructurales, bioquímicos y de componentes que son específicos para cada fruta. Asimismo, el producto cosechado está constantemente expuesto a la pérdida de agua debido a la transpiración y a otros fenómenos fisiológicos (Alvarez Quintero, 2012; Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007; Contreras Oliva, 2010).

Los frutos cítricos, en particular, presentan una serie de problemas tras su recolección derivados de la falta de aporte hídrico y de nutrientes desde la planta, quedando así a expensas de su propio metabolismo. Esto da lugar a una pérdida gradual de calidad de la fruta en sus características organolépticas de textura, sabor y aroma a medida que avanza su estado de senescencia, determinando finalmente la muerte fisiológica. Este tipo de metabolismo limitado a sus propias reservas coloca además al fruto en una situación de debilidad frente a la deshidratación y las agresiones físicas externas tales como: fricción, golpes o heridas y también frente a las infecciones, especialmente de tipo fúngico. Por tanto, son normalmente las alteraciones fisiológicas y patológicas las que limitan su comercialización mucho antes de que cese su actividad metabólica (Alvarez Quintero, 2012; Contreras Oliva, 2010). Por esto es importante conocer la fisiología del fruto durante la etapa poscosecha para entender el proceso de deterioro de la calidad.

2.2.1 Respiración

La respiración es un indicador de la actividad metabólica y juega un papel significativo en la fisiología poscosecha y en el deterioro de la calidad de los alimentos (Contreras Oliva, 2010). Mediante la respiración la fruta obtiene la energía necesaria para desarrollar una serie de procesos biológicos indispensables. El proceso respiratorio ocurre a expensas de las sustancias de reserva (azúcares, almidones, ácidos orgánicos, etc), normalmente presentes en las células, que son oxidadas, con el consiguiente consumo de oxígeno (O_2) y producción de dióxido de carbono (CO_2) y agua. Adicionalmente, la respiración genera calor (calor vital) que al ser liberado al medio que rodea a la fruta puede afectar al producto cosechado (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

La respiración, involucra reacciones complejas que en condiciones normales requiere de la presencia de O_2 para la degradación de los compuestos (respiración aeróbica). Sin embargo, cuando los niveles de oxígeno son muy bajos, la respiración se desplaza hacia la ruta anaeróbica generándose compuestos volátiles, como el acetaldehído y etanol, que pueden dar origen a malos sabores. Durante la respiración, la pérdida de reservas alimenticias almacenadas en el producto significa el aceleramiento de la senescencia, conforme las reservas que proporcionan energía para mantener el estatus viviente del producto se agotan. Por tanto, la velocidad de deterioro de las frutas generalmente es proporcional a su velocidad de respiración (Alvarez Quintero, 2012; Contreras Oliva, 2010).

El periodo de vida útil de los productos hortofrutícolas está directamente relacionado con la tasa de respiración, así cuanto más alta es la tasa de respiración más perecedero es el fruto. Es por ello que gran parte de la tecnología poscosecha se basa en provocar una reducción de la respiración y, por tanto, una reducción en el metabolismo, mediante la manipulación de las condiciones externas. La respiración puede estar afectada por muchos factores, siendo los más importantes la temperatura, la composición atmosférica y el estrés físico (Lasallista, 2012).

2.2.1.1 Climaterio

De acuerdo al patrón respiratorio y de producción de etileno (C_2H_4) durante la maduración organoléptica o de consumo, las frutas se clasifican en climatéricas y no climatéricas. Las frutas climatéricas incrementan marcadamente su ritmo respiratorio y producción de etileno durante la maduración organoléptica. De igual manera, los cambios asociados con esta etapa de desarrollo (color, sabor, aroma, textura) son rápidos, intensos y variados. Por el contrario, en las frutas no climatéricas, los procesos de desarrollo y maduración organoléptica son continuos y graduales; manteniendo éstas, en todo momento, niveles bajos de respiración y de producción de etileno. Las frutas climatéricas pueden ser maduras organolépticamente en la planta o después de cosechadas. Las frutas no-climatéricas sólo maduran para consumo en la planta (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

Los cítricos están considerados como frutos con una intensidad respiratoria baja. Por tanto, su comportamiento basado en su patrón de respiración y producción de etileno

(C₂H₄) los clasifica como frutos no climatéricos, con una producción de C₂H₄ baja (<0.10 mL/Kg.h en naranjas a 20 q) (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007). Pero al igual que en todos los frutos, la manipulación y temperatura estimulan la intensidad respiratoria de los mismos (Alvarez Quintero, 2012; Contreras Oliva, 2010).

2.2.2 Transpiración

La transpiración es un proceso por el cual los tejidos vegetales pierden agua en forma de vapor desde las células del interior hacia la atmósfera que los rodea. Las diferentes formaciones epidérmicas son las que regulan el flujo de vapor de agua hacia el exterior de los productos. El vapor de agua sale hacia el exterior desde los espacios intercelulares existentes entre las células del parénquima poroso, pasa a través de estomas, lenticelas, o microheridas, y atraviesa la epidermis y la cutícula. Las aperturas epidérmicas representan la principal vía de pérdida de agua, mientras que la transpiración a través de la cutícula representa alrededor del 5-10 % de la pérdida total. Algunos estudios han propuesto que la difusión de vapor de agua en cítricos se realiza tanto a través de las aperturas epidérmicas como a través de una fase acuosa líquida en la cutícula, contrariamente a los gases CO₂, O₂ y C₂H₄ cuya difusión se realiza esencialmente a través de los estomas (Contreras Oliva, 2010).

La transpiración es la principal causa de la pérdida de agua de las frutas y vegetales ocasionando pérdidas de peso, deterioro en la apariencia (marchitamientos y arrugamientos), disminución de firmeza (ablandamiento, pérdida de turgencia), cambios en la calidad nutricional, además de una mayor susceptibilidad a determinadas

alteraciones tanto fisiológicas como patológicas (Contreras Oliva, 2010; Lasallista, 2012). En los cítricos, la transpiración es la principal causa de deterioro durante la poscosecha. La transpiración se produce en mayor proporción en la piel del fruto que en la pulpa, y en el hemisferio peduncular que en el estilar, por lo que la zona peripeduncular del fruto es más susceptible a la senescencia y, por tanto, más proclive a las alteraciones fisiológicas (Lasallista, 2012).

La intensidad de la pérdida de agua depende de factores intrínsecos del fruto y de factores ambientales. Entre las variables intrínsecas, las más relevantes son la relación superficie/volumen, la estructura de la epidermis y el grosor y composición de la cera epicuticular. Las pérdidas de agua son directamente proporcionales a la relación superficie/volumen, por lo que los frutos de mayor volumen y más esféricos son los que presentan menor pérdida de agua (Alvarez Quintero, 2012; Contreras Oliva, 2010).

Los factores ambientales que más influyen en la deshidratación son la temperatura, la humedad relativa (HR) y la velocidad de circulación del aire que rodea al fruto, ya que determinan las diferencias entre la presión de vapor de agua dentro y fuera del fruto (Contreras Oliva, 2010; Lasallista, 2012). Durante el almacenamiento a bajas temperaturas y alta HR, se reduce el gradiente de presión de vapor de agua entre el fruto y la atmósfera de almacenamiento. Estas condiciones ocasionan que disminuye la velocidad de pérdida de agua por transpiración. Además, durante el almacenamiento y transporte, es importante una adecuada ventilación y velocidad del aire, puesto que incide sobre la capa de aire húmedo que rodea al fruto (Contreras Oliva, 2010).

2.2.3 Alteraciones fisiológicas

Las alteraciones fisiológicas pueden tener su origen en deficiencias nutricionales o condiciones climáticas adversas ocurridas durante el período precosecha y/o en una incorrecta manipulación en poscosecha, como por ejemplo el almacenamiento a temperaturas y HR no adecuadas, conservación en atmósferas no adecuadas, etc. Este tipo de alteraciones produce cambios indeseables en la piel de los cítricos y por lo tanto una pérdida del valor comercial (Contreras Oliva, 2010).

Dentro de los desórdenes más comunes en las frutas cítricas se encuentran la necrosis peripeduncular o SERB (Steam end rind breakdown). El SERB es producido por una desecación de los tejidos situados alrededor del pedúnculo. En su fase inicial queda un anillo de 2 a 5 mm sin dañar, y al ir avanzando, el área afectada se hunde y cambia de color hacia tonos marrones. La alteración puede estar provocada por un desequilibrio nutricional, que involucra tanto el nitrógeno como el fósforo. Estas alteraciones se desarrollan durante el almacenamiento cuando hay condiciones propicias para la deshidratación (Contreras Oliva, 2010).

Los cítricos, al igual que otros frutos tropicales y subtropicales, son sensibles a los daños por frío (“chilling injury”) cuando se almacenan a bajas temperaturas, aunque superiores al punto de congelación (Contreras Oliva, 2010; Soler Fayos, 2009). Las alteraciones fisiológicas se presentan principalmente en un rango de temperatura de aproximadamente 5 a 14 °C. Los síntomas más comunes son fallas en la maduración, desarrollo de sabores y aromas atípicos, decoloración, ennegrecimiento y deterioro de

los tejidos, e incremento de la susceptibilidad del producto al ataque de patógenos secundarios (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

La temperatura es el factor ambiental que más influye en el deterioro del producto cosechado, por lo que puede ocurrir el daño por alta temperatura. Las recomendaciones dadas por la FAO (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007), para el almacenamiento de naranjas son de 3 – 9 °C, 85 – 90 % HR y una vida aproximada de almacenamiento de 3 a 12 semanas. En general, el ritmo de deterioro del producto es 2 a 3 veces mayor por cada incremento de 10 °C por encima de la temperatura óptima de conservación de los productos. La temperatura, también modifica el efecto que tiene el etileno, los niveles residuales de O₂ y los altos niveles de CO₂ en el producto cosechado. Además, afecta directamente el ritmo respiratorio de las frutas y la germinación de esporas de los hongos y el posterior desarrollo de patógenos. Por encima de 40 °C, se observan severos daños en el producto y a 60 °C aproximadamente, cesa toda actividad enzimática. Adicionalmente, la fruta sufre una pérdida excesiva de agua por transpiración; todo lo cual arruina el producto (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

Debido al daño por bajos niveles de oxígeno (O₂) en el ambiente, las frutas pueden presentar una inducción de procesos de fermentación, ocasionando la producción de malos olores y sabores y el deterioro del producto. Esto es común cuando la ventilación del ambiente en el cual se encuentran las frutas es deficiente. Estos cambios son favorecidos por altas temperaturas. El daño por alta concentración de dióxido de carbono (CO₂), dado por la acumulación de CO₂, puede retrasar el ablandamiento normal y la

pérdida de color verde de algunas frutas. En otros casos, se puede observar decoloración y deterioro interno debido a la acumulación de este gas en la atmósfera de almacenamiento; así como también, mal sabor y depresiones superficiales en la cáscara de la fruta (“pitting”). Por último, está el daño por pérdida de agua, donde la fruta cosechada pierde agua por transpiración de manera irreversible. Como consecuencia, el producto sufre una serie de alteraciones fisiológicas que aceleran los procesos de senescencia, síntesis de etileno y deterioro de tejidos. Esto, conjuntamente con los síntomas externos de marchitez y arrugamiento del producto, afectan seriamente su calidad comercial. En frutas, el valor máximo permisible en términos de pérdida de agua es un 5 % aproximadamente. La pérdida de agua por transpiración es mayor a temperatura alta y humedad relativa baja (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

2.2.4 Alteraciones físicas

La rotura de las células por medios físicos permite que las enzimas entren en contacto con sustancias las cuales normalmente se encuentran separadas. Como consecuencia, se producen una serie de reacciones químicas que conducen al deterioro de las células. El tejido dañado frecuentemente se torna marrón o negro debido a la síntesis de melanina. La producción de olores y sabores atípicos y desagradables es también una característica de los tejidos afectados (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

2.2.5 Alteraciones patológicas

De las principales causas de pérdidas económicas durante la poscosecha, son las alteraciones patológicas las que limitan la vida útil de las frutas frescas (Soler Fayos,

2009). Los daños patológicos bajo condiciones ambientales se deben principalmente a patógenos del género *Penicillium*, siendo el de mayor incidencia *P. digitatum* Sacc. (60-80 %). Por su parte, la podredumbre amarga provocada por *Geotrichum citri aurantii* es menos importante, aunque se vuelve más importante luego de épocas húmedas prolongadas (Cocco, Almiton, & Meier, 2016).

Uno de los principales problemas de poscosecha lo constituye el llamado hongo verde, *Penicillium digitatum* (Sacc) y el hongo azul, *Penicillium italicum* (Whem). Su difusión y multiplicación se lleva a cabo por medio de sus esporas que se encuentran dispersas en el aire. Las esporas no se desarrollan en frutas sanas, penetran en la fruta a través de los golpes y heridas ocasionados durante la recolección, transporte y manejo de la fruta. Los primeros síntomas se manifiestan por la aparición de una mancha en la superficie de la piel que con posterioridad se transforma en blanquecina, desarrollando una esporulación de color verde o azul dependiendo de la especie de *Penicillium*. La fruta pierde su consistencia, desprendiendo un olor característico, perdiendo por completo su aptitud para el consumo humano. Las condiciones para su desarrollo son una humedad relativa elevada y una temperatura de 20 a 25 °C. A 10 °C, *P. digitatum* crece más rápidamente que *P. italicum* que permanece oculto por el desarrollo del primero, pero a temperaturas inferiores a 10 °C, la situación se invierte, por lo que en las cámaras de refrigeración se observa con mayor frecuencia a *P. italicum* (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007). Otros hongos que alteran los cítricos son *Alternaria citri*, *A. alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae*, *Phytophthora citrophthora* (Soler Fayos, 2009).

El ataque por patógenos generalmente sigue al daño físico o al deterioro fisiológico. En concreto para que la podredumbre se produzca en los frutos, deben darse las siguientes condiciones: a) nivel de inóculo suficiente en el ambiente; b) contacto entre el inóculo y la superficie de los frutos; c) entrada de la espora en el fruto a través de una herida (incluso no perceptible a simple vista); d) condiciones favorables para que la espora se desarrolle dentro de la herida; e) susceptibilidad del fruto a la alteración. Por lo tanto, la incidencia de las podredumbres depende de las características intrínsecas del fruto, de las condiciones ambientales, del manejo durante la recolección y posterior manipulación poscosecha (Contreras Oliva, 2010; Soler Fayos, 2009).

Ciertos patógenos producen o inducen la formación de enzimas que hidrolizan las paredes celulares, ocasionando un ablandamiento de los tejidos y una degradación de toda la fruta. Los tejidos de la fruta pueden decolorarse por la síntesis de ciertas sustancias que se producen como respuesta al ataque de los patógenos. Los patógenos pueden producir o inducir la síntesis de una serie de productos tóxicos que ocasionan malos olores y sabores que hacen que la fruta no sea apta para el consumo humano. La susceptibilidad de las frutas al deterioro por enfermedades aumenta con el tiempo de almacenamiento. Esto está relacionado con el proceso de senescencia durante el cual se incrementa la permeabilidad de las membranas celulares y se produce una eventual desorganización total de la estructura del producto. Con la edad del producto también disminuye la capacidad de síntesis de sustancias fungistáticas naturales (fitoalexinas) que protegen a las frutas (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

2.3 Criterios de calidad

La calidad es el conjunto de propiedades inherentes a un producto que permite distinguir entre unos y otros. Además, estas propiedades tienen importancia en la determinación del grado de aceptación por el consumidor e implica una combinación de características, propiedades y atributos que le darían al producto un valor como alimento y mercancía. Se consideran características determinantes de la calidad de un producto tanto las internas como las externas. Las primeras hacen referencia sobre todo a las características organolépticas; las segundas son las relacionadas con el color, forma y en general factores cosméticos. Junto con estas características de maduración y comerciales, las propiedades nutricionales de los frutos son de gran importancia en la definición de su calidad (Perez Acevedo, 2001).

Para comercializar las naranjas es muy importante establecer normas mínimas de calidad, con las cuales el agricultor pueda recibir precios justos y el consumidor disfrutar de un precio razonable. La calidad de los frutos cítricos depende de su sanidad y presentación. Los frutos deben estar sanos, de consistencia firme, exentos de descomposición o deterioro, exentos de materias extrañas visibles y de magulladuras. Deben estar libres de daños ocasionados por insectos y/o microorganismos, daños por bajas temperaturas y exentos de humedad externa y de olores y sabores extraños y de cualquier otro factor que los haga impropios para el consumo humano (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007). La calidad de la naranja se determina de acuerdo a varias de sus cualidades. Entre las características físicas del fruto se tiene: peso, forma, tamaño, contenido o volumen del jugo, color externo y de la pulpa, aspecto, espesor, y daños

causados por insectos, enfermedades y de cualquier otro tipo de daño. Así mismo en los frutos se aprecian sus características químicas, tales como: contenido de azúcar (sólidos solubles totales o SST.), acidez (acidez titulable), la relación entre el contenido de azúcar y la acidez total, etc. Estas características son variables que pueden ser utilizadas como un material ideal para estudiar las propiedades de almacenamiento de los frutos cítricos, así como el transporte de sustancias y redistribución entre diferentes tejidos durante el almacenamiento de la fruta (Plaza et al., 2011).

2.4 Tratamientos poscosecha en cítricos

Desde el momento en que los frutos cítricos son recolectados hasta su comercialización y consumo se inicia un proceso de deterioro natural, que conducirá a la pérdida del producto en un corto periodo de tiempo si no se realizan procesos de manipulación y conservación para evitarlo (Lasallista, 2012). La evolución poscosecha de los cítricos tras la aplicación de distintos tratamientos puede alterar significativamente la calidad de los mismos. En general, la calidad final de los frutos se puede mantener mediante el empleo de distintas tecnologías poscosecha, pero en todo caso siempre vendrá condicionada por la calidad inicial del fruto, siendo el grado de madurez en el momento de la recolección, uno de los factores que influye de manera decisiva en la calidad y conservación de la fruta. Los tratamientos poscosecha más utilizados en la industria de cítricos son la frigoconservación, la aplicación de ceras comerciales, la desverdización y aplicación de tratamientos cuarentenarios por frío cuando estos son exigidos por los países importadores. Otras tecnologías más novedosas en estudio incluyen el uso de atmósferas insecticidas con alto contenido en dióxido de carbono, la aplicación de

radiaciones ionizantes, el desarrollo de recubrimientos naturales y otros tratamientos térmicos, químicos y biológicos (Contreras Oliva, 2010).

La refrigeración se utiliza como método que ayuda a reducir la incidencia de las alteraciones patológicas en la fruta, ya que las bajas temperaturas reducen la germinación de las esporas y el crecimiento de patógenos. Además, al retrasar la senescencia del fruto, este mantiene un mayor contenido de los compuestos antifúngicos (e.g. fitoalexinas) que mejoran la resistencia fisiológica al ataque fúngico del fruto (Contreras Oliva, 2010). En el caso de los cítricos, la principal estrategia de control de hongos es la aplicación de fungicidas de síntesis, como ortofenilfenato sódico, tiabendazol, imazalil o guazantina. Sin embargo, el uso continuo de fungicidas de síntesis, presentan varias limitaciones importantes, como la aparición de cepas resistentes, las restricciones regulatorias sobre la aceptación de residuos en países importadores de cítricos y el posible efecto perjudicial de estos compuestos sobre la salud y el medio ambiente (Palou, Smilanick, & Droby, 2008). En la actualidad se están estudiando nuevas estrategias para el control de enfermedades poscosecha, que incluyen tratamientos físicos, químicos y biológicos. Así, por ejemplo, se ha estudiado la aplicación de aire caliente y baños en agua caliente, la aplicación de luz ultravioleta (254 nm), el uso de agentes químicos naturales de baja toxicidad, como las sales inorgánicas, parabeno y el desarrollo de agentes de control biológico (Contreras Oliva, 2010; Palou et al., 2008).

2.4.1 Láminas comestibles

Las principales pérdidas poscosecha de frutos se deben a infección fúngica, trastornos fisiológicos y lesiones físicas. Uno de los enfoques potenciales para extender la vida útil en almacenamiento de estos productos perecederos es aplicar recubrimientos comestibles en la superficie, seguido de un almacenamiento en frío (No, Meyers, Prinyawiwatkul, & Xu, 2007).

La lámina o cubierta comestible consiste en una capa delgada que se preforma o forma directamente sobre la superficie de los productos vegetales como una envoltura protectora. El mecanismo por el cual los recubrimientos conservan la calidad de frutas y vegetales es debido a que crean una barrera física a los gases, produciendo una atmósfera modificada, ya que reducen la disponibilidad de O₂ e incrementan la concentración de CO₂ (Ramos-García, Bautista-Baños, & Barrera-Necha, 2010). Las láminas comestibles se han utilizado para regular la transferencia de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, lípidos, aroma, compuestos de sabor y ayudan a retrasar la senescencia natural de las frutas a través de la permeabilidad selectiva a los gases (McHugh & Senesi, 2000). La aplicación de recubrimientos se presenta como un método exitoso para la conservación de frutas, debido a que ayudan a extender la vida útil de los productos por crear una barrera selectiva, previniendo así la deshidratación y retardando la maduración. Además, los recubrimientos mejoran la calidad y apariencia de los frutos y sirven como vehículo para sustancias de interés, tales como vitaminas, antioxidantes y compuestos con actividad antimicrobiana (Barrera Bello, Gil Loaiza, García Pajón, Durango Restrepo, & Gil González, 2012).

Las láminas comestibles se elaboran a partir de una gran variedad de proteínas, polisacáridos y lípidos ya sea como componentes únicos o combinados, con la finalidad de desarrollarlas con mejores propiedades de barrera y mecánicas (Ramos-García et al., 2010). Algunos polisacáridos usados para láminas comestibles son almidón, alginato, derivados de celulosa, quitosano y agar. Los lípidos incluyen ceras, acilgliceroles y ácidos grasos. La elección de la formulación de la lámina comestible depende en gran medida de la función deseada, así como de la biodegradabilidad, la comestibilidad, la apariencia estética y las buenas propiedades de barrera contra el oxígeno. Además, las películas comestibles pueden servir como un soporte para las sustancias antimicrobianas, nutricionales y antioxidantes (Du, Avena, Hua, & McHugh, 2011). Los recubrimientos hechos a base de polisacáridos han sido los más utilizados para recubrir frutos, y esto es debido a sus propiedades mecánicas de adherencia y flexibilidad en la superficie de los productos hortofrutícolas (Ramos-García et al., 2010).

Dependiendo de su composición, la funcionalidad de los materiales de la lámina comestibles puede variar, ya que cada componente confiere diferentes propiedades a la matriz compuesta. Las láminas hechas de polisacáridos o proteínas normalmente tienen propiedades mecánicas y de barrera de gases adecuadas, pero muestran pobres propiedades de barrera al vapor de agua. Por el contrario, las láminas compuestas de lípidos exhiben buenas propiedades de barrera al vapor de agua, pero muestran una resistencia mecánica pobre y una alta permeabilidad al oxígeno. Cuando tales ingredientes se combinan, podrían interactuar físicamente y / o químicamente y pueden dar lugar a películas con propiedades mejoradas. Por ejemplo, las láminas comestibles

basadas en frutas pueden fabricarse con excelentes propiedades de barrera al oxígeno, pero no con buenas propiedades de barrera contra la humedad. Mediante la combinación de purés de frutas con diversos agentes gelificantes (como el alginato), la barrera contra el agua y las propiedades de tracción de las películas a base de frutas pueden mejorar (Du et al., 2011).

2.4.1.1 Lámina de Hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)

La celulosa es el material estructural de las paredes celulares de las plantas y está compuesta por cadenas lineales de unidades (1 → 4) -β-D-glucopiranosilo. La sustitución química de algunos grupos hidroxilo a lo largo de la cadena da origen a éteres de celulosa iónicos (carboximetilcelulosa, CMC) y no iónicos (metilcelulosa, MC, hidroxipropilcelulosa, HPC e hidroxipropilmetilcelulosa, HPMC). Las láminas de derivados de celulosa son resistentes, flexibles, totalmente transparentes y altamente sensibles a la presencia de agua, pero resistentes a las grasas y los aceites. Los tratamientos de modificación química de la celulosa pueden usarse para disminuir la solubilidad en agua de éteres de celulosa (Campos et al., 2010).

Los materiales a base de celulosa están siendo ampliamente utilizados ya que ofrecen las ventajas como comestibilidad, biocompatibilidad, propiedades de barrera, aspecto estético, no son tóxicos, no son contaminantes y tienen bajo costo. Las láminas comestibles de hidroxipropilmetilcelulosa son atractivas para aplicaciones alimentarias porque es un derivado vegetal comestible no iónico fácilmente disponible. Este material forma películas transparentes, inoloras, insípidas, resistentes al aceite, hidrosolubles,

muy eficientes como barreras al oxígeno, dióxido de carbono, aroma y lípidos, pero con moderada resistencia al transporte de vapor de agua. El HPMC se utiliza en la industria alimentaria como emulsionante, formador de película, coloide protector, estabilizante, agente de suspensión o espesante. La resistencia tensil de las láminas de HPMC es alta y su flexibilidad no es ni demasiado alta ni demasiado frágil, lo que las hace adecuadas para revestimientos comestibles (Imran, El-fahmy, Desobry, & Revol- Junelles, 2010). El HPMC está aprobado para usos alimentarios por la FDA (“Food Drug Administration”) y la UE (Unión Europea); su seguridad en el uso de alimentos ha sido aprobado por el JECFA (Burdock, 2007).

El sorbato de potasio es la sal del ácido sórbico más comúnmente utilizada como conservante. Esta sal es altamente soluble en agua (58.2 % a 20 °C). De todos los agentes antimicrobiales utilizados en los alimentos, son los sorbatos, los mejor caracterizados en cuanto a su espectro de acción. El sorbato de potasio incrementa la actividad antimicrobiana a pH bajo, y su efectividad ha sido reportada para un amplio rango de microorganismos (bacterias de deterioro, bacterias patogénicas, mohos y levaduras), relacionados con alimentos. Así, las láminas comestibles que contienen sorbato de potasio son típicamente más efectivas a valores de pH menores de 6.0. Las sales de ácido sórbico han sido entre los agentes antimicrobianos más estudiados en láminas comestibles a base de proteína y carbohidratos, tales como metilcelulosa, proteína de suero aislada y quitosano, ya que el sorbato es ampliamente usado y permanece químicamente activo en la matriz de la lámina. El grupo carboxilo (el sitio activo en el sorbato), forma enlaces de hidrógeno con las cadenas de proteína o

carbohidratos en la lámina (Cagru, Ustunol, & Ryser, 2004; Smilanick, Mansour, Gabler, & Sorenson, 2008). Sin embargo, la inhibición de microorganismos por sorbatos varía, dependiendo de las diferentes especies y cepas, grado de contaminación, tipo y composición del sustrato, concentración y pH del sorbato, actividad del agua, presencia de otros aditivos, temperatura de almacenamiento y tipo de envase (Smilanick et al., 2008).

2.4.1.2 Lámina de Quitosano

El quitosano es un polímero de carbohidrato natural derivado por desacetilación de quitina [poli- β - (1 \rightarrow 4) -N-acetil-D-glucosamina] que es un componente principal de las conchas de crustáceos tales como cangrejo, camarón y cangrejo de río (figura 2). Es un polisacárido catiónico de alto peso molecular que exhibe actividad antibacteriana y antifúngica, así como propiedades filmógenas. Se ha reportado numerosa información sobre el potencial del quitosano para actuar como conservante de los alimentos, función que se evaluó ya sea a partir de ensayos in vitro o a través de la aplicación directa de quitosano en matrices complejas de alimentos. Las láminas a base de quitosano, tienen buenas propiedades mecánicas y permeabilidad selectiva a los gases (CO₂ y O₂). Sin embargo, la alta permeabilidad al vapor de agua limita su aplicación (Campos et al., 2010). Se han reportado estudios en donde el uso de aceites esenciales disminuye la pérdida de vapor de agua, pero produce una disminución significativa en la resistencia a la tracción, la rotura por alargamiento y la elasticidad de las láminas (Campos et al., 2010; Du et al., 2011).

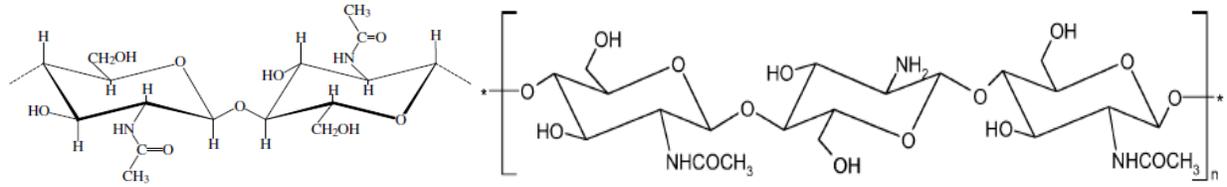


Figura 2. Estructura de la quitina y del quitosano. (Dutta, Duta, & Tripathi, 2004; Moller, Grelier, Pardon, & Coma, 2004).

El quitosano se puede extraer con diferentes grados de desacetilación y pesos moleculares, los cuales presentan diferentes propiedades funcionales y actividades biológicas. Su actividad antimicrobiana está ligada a su grupo amino cargado positivamente el cual interactúa con la membrana celular del microorganismo cargada negativamente promoviendo un aumento en su permeabilidad y causando interrupciones que conducen a la muerte celular. Se ha demostrado que el quitosano inhibe el crecimiento de muchas bacterias causantes de deterioro y patógenas, así como levaduras y mohos. La actividad antimicrobiana depende del tipo de quitosano, el grado de acetilación, peso molecular, microorganismo objetivo, pH del medio y presencia de otros aditivos o componentes alimenticios (Campos et al., 2010).

El quitosano no se puede disolver directamente en agua y es soluble en varias soluciones acuosas ácidas tales como ácidos acético, cítrico, ascórbico, fórmico, láctico, málico, oxálico, succínico, adípico y propiónico. Debido a las interacciones entre el quitosano y los diferentes ácidos, las propiedades de la lámina se ven afectadas, incluyendo las propiedades mecánicas, permeabilidad al vapor de agua y al oxígeno (Zhong, Song, & Li, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar el tiempo de vida útil y cambios en las características físicas, químicas y microbiológicas de naranjas sin cáscara, recubiertas con dos láminas comestibles: hidroxipropilmetilcelulosa 5 % con 2.5 % de glicerol y 2 % de sorbato de potasio (HPMC+SP) y quitosano 1 % en ácido acético al 1 % y 15 % de glicerol, almacenadas a 14.0 ± 1.0 °C.

3.2 Objetivos específicos

- Analizar el efecto de las dos láminas comestibles de: hidroxipropilmetilcelulosa 5 % con 2.5 % de glicerol y 2 % de sorbato de potasio (HPMC+SP) y quitosano 1 % en ácido acético al 1 % y 15 % de glicerol, sobre las naranjas sin cáscara, para determinar la que logre mantener más estables sus propiedades organolépticas durante el periodo de almacenamiento de 14.0 ± 1.0 °C.
- Analizar el efecto de la lámina comestible sobre las características y composición de las naranjas sin cáscara durante el almacenamiento, por medio de análisis físicos y químicos tales como: pH, °Brix, pérdida de peso, firmeza, apariencia, color, acidez titulable y vitamina C.

- Cuantificar los principales azúcares y ácidos orgánicos mediante la técnica cromatográfica HPLC, al inicio, intermedio y final del almacenamiento, para verificar pérdida o estabilidad de dichos componentes.
- Determinar si hay diferencias significativas en el contenido de azúcares y ácidos orgánicos entre tratamientos y a través del tiempo, con respecto al control.
- Realizar conteo de bacterias aerobias y hongos (mohos y levaduras), en las naranjas sin cáscara recubierta y control, en los diferentes días de muestreo del almacenamiento.
- Determinar si hay diferencias significativas en los conteos microbianos de las naranjas recubiertas y control, durante el almacenamiento.
- Seleccionar la mejor lamina comestible basado en las características de calidad evaluadas.

4. MÉTODOLÓGÍA

4.1 Obtención de las naranjas

Las naranjas (*Citrus sinensis*) de la variedad 'Valencia', fueron recibidas sin cáscara, por la planta de procesamiento de la APC localizado en el municipio de Lares, PR. Dichas naranjas provinieron tanto de Puerto Rico como de República Dominicana. Previo a la remoción de las cáscaras, las naranjas fueron lavadas y sanitizadas en la misma planta de procesamiento de la APC. Las naranjas sin cáscara se recibieron en el Centro de Innovación y Tecnología agroindustrial, Edificio Ramírez de Arellano y Rosell de la Universidad de Puerto Rico Recinto de Mayagüez en cajas de cartón. Cada caja contenía 60 naranjas sin cáscara, separadas por capas con papel de "estraza". Una vez recibidas las cajas, se trasladaron al laboratorio de la finca Alzamora de la Universidad de Puerto Rico Recinto de Mayagüez, donde se llevó a cabo el recubrimiento y almacenamiento. Para cada tratamiento se emplearon seis cajas de naranjas sin cáscara.

4.2 Elaboración de las láminas comestibles

Para la preparación de las láminas se usó todo el material metálico (bandejas y pinzas) y de vidrio (Erlenmeyer, vasos, varilla de agitación) previamente lavado y esterilizado en autoclave (Sterilmatic, Market Forge Industries Inc.) a 121 °C por 15 min. Adicionalmente el material de pesada y material volumétrico (probetas) se lavaron y secaron antes de su uso. Las mesas donde se colocaron las naranjas laminadas para secado se limpiaron con hipoclorito de sodio a 200 ppm.

4.2.1 Lámina de Quitosano

La lámina de quitosano fue preparada con quitosano (MP, Fischer Scientific), el cual posee un grado de desacetilación de 90.28 %, viscosidad 165 mpa.s y peso molecular de 100,000 – 300,000 g/mol. El agua empleada fue agua embotellada para consumo y, el ácido acético se preparó al 1 % utilizando vinagre blanco comercial (5 %). El glicerol usado para la lámina fue Glicerol, ACS, 99.5+% (Alfa Aesar, Fisher Scientific).

La lámina a base de quitosano constó de: quitosano al 1 % en ácido acético al 1 % con 15 % de glicerol. Para preparar 3.0 L de lámina se emplearon 30.0 g de quitosano y se agitó hasta completa disolución en 2,520 g de ácido acético al 1 %. Al disolverse bien el quitosano en la solución, se mantuvo agitación por 15 minutos adicionales y en este punto se le agregó 450.0 g de glicerol. Después de la adición del glicerol se continuó la agitación por 30 min. Las naranjas sin cáscara fueron recubiertas inmediatamente después de ser preparada la solución.

4.2.2 Lámina de Hidroxipropilmetilcelulosa (Celulosa modificada)

La lámina de celulosa modificada fue preparada con hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel™ E19). El agua empleada fue agua embotellada para consumo. El sorbato de potasio que se agregó a esta lámina fue sorbato de potasio con una pureza de 99.9 % (Acros organics, Fisher Scientific). El glicerol utilizado para la lámina fue Glicerol, ACS, 99.5+% (Alfa Aesar, de Fisher Scientific).

La lámina a base de celulosa modificada constó de: hidroxipropilmetilcelulosa al 5 % con 2 % de sorbato de potasio y 2.5 % de glicerol. Esta lámina fue preparada y seleccionada, por haber tenido buenos resultados de acuerdo a estudios previos (Buitrago Florez, 2013). Para preparar 3.0 L de lámina se disolvieron 150.0 g de hidroxipropilmetilcelulosa (Methocel™ E19), 60.0 g de sorbato de potasio y 75.0 g de glicerol en 2715.0 g de agua. Esta mezcla se mantuvo en agitación constante a $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta completa disolución. Una vez se encontró completamente homogénea la solución, se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta aproximadamente $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. La lámina a base de celulosa modificada (HPMC+SP) se usó para recubrir las naranjas sin cáscara, una vez la solución alcanzo una temperatura de aproximada de $22\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Recubrimiento de las naranjas sin cáscara con láminas comestibles

Las láminas preparadas se colocaron en recipientes metálicos para poder sumergir varias naranjas al mismo tiempo. Para recubrir las naranjas con las láminas comestibles, se sumergieron (aproximadamente seis simultáneamente) en la solución de cada lámina por un periodo de 2 minutos aproximadamente. Las naranjas recubiertas se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel de “estraza” (similar al papel en el que se empacan las naranjas para su comercialización) el cual se colocó sobre las mesas del laboratorio previamente limpiadas y desinfectadas. Una vez las láminas comestibles se secaron completamente, las naranjas recubiertas se colocaron dentro de cajas de cartón nuevas, similares a las cajas en las que fueron recibidas.

4.4 Condiciones de almacenamiento y muestreo

Las naranjas recubiertas, debidamente empacadas fueron almacenadas en la incubadora (modelo E-36HO, Percival) a una temperatura de 14.0 ± 1.0 °C y una humedad relativa de $80.0 \% \pm 5.0 \%$. Cada tratamiento fue almacenado por separado. La incubadora fue limpiada y desinfectada con una solución de hipoclorito de sodio a 200 ppm, previo al almacenamiento de cada tratamiento. Las naranjas recubiertas con celulosa modificada (HPMC+SP) fueron almacenadas durante 15 días. Las naranjas recubiertas con lámina de quitosano se almacenaron por 12 días. Las naranjas sin cáscara, utilizadas como control, se almacenaron por 5 días solamente. Para su almacenamiento, las mismas se cambiaron de empaque, con el objetivo de evitar la contaminación durante el transporte. Estas naranjas se colocaron en cajas de cartón nuevas y se empacaron de manera similar a la que son comercializadas.

4.5 Muestreo

Para realizar los análisis de estabilidad en cuanto a sus propiedades físicas, químicas y microbiológicas, se muestreo cada 3 días para cada tratamiento de lámina. En el caso de las muestras control, por durar poco tiempo el muestreo se realizó a los días: 0, 1, 3 y 5. El muestreo realizado fue por selección aleatoria. Los análisis en cada muestreo se hicieron por triplicado.

Para obtener resultados más confiables, el proceso de laminación se realizó por triplicado. De esta manera, se manejaron 3 procesos o lotes como análisis independientes de cada uno de los tratamientos y control.

4.6 Tratamiento de la muestra

Para cada muestreo realizado se obtuvo un total de siete naranjas por tratamiento. De acuerdo al análisis realizado se utilizaron las naranjas enteras o el jugo de las naranjas. De las siete naranjas, tres naranjas enteras se usaron para análisis microbiológico y; cuatro para análisis fisicoquímico. Para el análisis de firmeza se usaron las naranjas enteras. En el caso del análisis de pérdida de peso, se escogieron aleatoriamente 10 naranjas de cada tratamiento, las mismas fueron pesadas en todos los días de muestreo. En el caso de los análisis de pH, sólidos solubles (°Brix), color, acidez titulable, vitamina C y determinación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC, se usó el jugo de las cuatro naranjas.

Para obtener el jugo utilizado para las pruebas fisicoquímicas, las cuatro naranjas muestreadas fueron exprimidas en un exprimidor eléctrico (Black & Decker). Posteriormente el jugo se pasó por un colador, para separarlo de la pulpa. Una parte del jugo fue utilizada para realizar los análisis fisicoquímicos, la otra parte se envaso en tubos plásticos de centrifuga de 50 mL y se almacenaron en el congelador a -80 °C. Las muestras congeladas se utilizaron para los análisis de determinación de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC.

4.7 Análisis Físicoquímico

4.7.1 Medición de pH

Para medir el pH se empleó un metro de pH (Sartorius) previamente calibrado con soluciones amortiguadoras de 4.0, 7.0 y 10.0 a 25 °C. El procedimiento fue seguido conforme se establece en la AOAC 973.41 (2000). La medición del pH se realizó al jugo de naranja a 25 °C. Esta medida se repitió 3 veces a cada muestra.

4.7.2 Medición de Sólidos Solubles totales (°Brix)

Los sólidos solubles totales (SST) se midieron en un refractómetro electrónico (Abbemat 200, Anton Paar), previamente calibrado con agua destilada a 25 °C y fueron expresados como °Brix. El procedimiento fue seguido conforme se establece en la AOAC 932.12 (2000). La medición de sólidos solubles totales se realizó al jugo de naranja a 25 °C. Este ensayo se llevó a cabo por triplicado a cada muestra.

4.7.3 Determinación de Pérdida de peso

Para la determinación de pérdida de peso se empleó una balanza analítica (TE 214S, Sartorius), previamente calibrada. Después de recubrir las naranjas se seleccionaron 10 naranjas aleatoriamente de cada tratamiento y lote. Las naranjas utilizadas para este análisis se rotularon después de laminadas y se pesaron a temperatura ambiente (aproximadamente a 22 °C). Las mismas 10 naranjas se pesaron en cada día de muestreo. Para determinar la pérdida de peso de las naranjas se empleó la ecuación:

$$\% \text{ Pérdida de peso} = \frac{(W_i - W_f)}{W_i} \times 100 \% \quad \text{Ecuación 1.}$$

W_i → Peso inicial (día 0), después de laminadas. En gramos (g)

W_f → Peso final (día en el que corresponde el muestreo). En gramos (g)

4.7.4 Medición de Firmeza

La firmeza se midió, utilizando la naranja entera, utilizando un Analizador de Textura (TA-XT2, Stable Micro Systems), previamente calibrado conforme indica el manufacturero. Para medir la firmeza se empleó el procedimiento descrito por estudios previos (Buitrago Florez, 2013). El análisis se realizó por compresión, con un “probe” TA-60, que consiste de un cilindro metálico con un diámetro de 10 mm, con punta redonda. Para cada medición se introdujo el “probe” 5.000 mm. La velocidad establecida para el “probe” fue de 5.00 mm/s antes de la prueba, 2 mm/s durante la prueba y al final regresaba con 10.00 mm/s de velocidad.

Las mediciones se reportaron como fuerza en gramos (g), necesaria para introducir la punta (“probe”) 5.000 mm en la superficie de la naranja. Este análisis se realizó a cuatro naranjas de cada tratamiento por lote. La prueba se realizó como mínimo en cuatro áreas de cada naranja. Las áreas muestreadas fueron seleccionadas aleatoriamente sin incluir los extremos del pedúnculo (es decir, en el eje ecuatorial), ya que no es una superficie regular.

4.7.5 Medición de Color

La medición del color se realizó con el uso de un colorímetro (MiniScan XE Hunter lab), previamente calibrado, con platos de porcelana negro y blanco. La prueba se le realizó al jugo, de acuerdo a las instrucciones del equipo. Las mediciones se realizaron por triplicado a cada muestra para los tres tratamientos por lote. El colorímetro empleado reportó los valores en la escala L, a^* y b^* . Las variables representan: L (luminosidad) donde 0 es el negro y 100 es el blanco, a (rojo-verde); los valores positivos para rojo, negativos para verde y 0 el neutro y b (eje amarillo-azul) valores positivos para amarillo, negativos para azul y 0 el neutro (ver Figura 3).

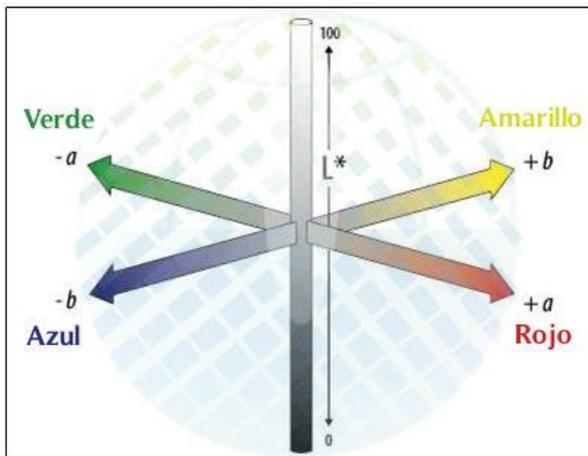


Figura 3. Coordenadas de color en el sistema Hunter Lab (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014).

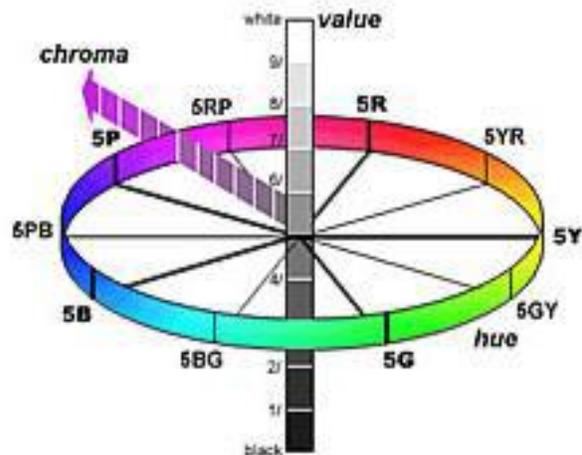


Figura 4. Representación del tono de un color (en escala de grados), indicando posiciones angulares de los tonos (Domene Ruiz & Segura Rodriguez, 2014a).

Los valores para este análisis fueron reportados empleando el método CIELAB, cuyas coordenadas son cilíndricas. Para esto se usaron los valores a^* y b^* para calcular el Choma (saturación) y Hue (tono), tal como se representan en la figura 4. Los valores fueron obtenidos utilizando las siguientes ecuaciones (Mcguire, 1992):

$$Chroma = \sqrt{(a^2 + b^2)} \quad \text{Ecuación 2.}$$

$$Hue = \left(\frac{ATAN \frac{b}{a}}{6.2832} \right) \times 360 \quad \text{Ecuación 3.}$$

Donde:

a = verde/rojo

b = azul/amarrillo

ATAN = arcotangente

4.7.6 Determinación de Acidez titulable

La acidez titulable o total se determinó siguiendo el método oficial descrito por la AOAC 942.15 (2000). Para este análisis se usó una alícuota de 10 mL de jugo de naranja (la cual se pesó) y se diluyó con 50 mL de agua destilada, en un Erlenmeyer. Para encontrar el punto final de la titulación se empleó fenolftaleína como indicador. Posteriormente se procedió a titular con NaOH (hidróxido de sodio) estandarizado (con ftalato ácido de potasio, KHP), con una concentración aproximada de 0.10 N. El mismo procedimiento se realizó a 3 blancos.

La determinación de acidez titulable se realizó por triplicado a cada muestra. Los resultados fueron expresados como porcentaje (%) de acidez titulable en términos de ácido cítrico, por ser el ácido orgánico predominante en las naranjas. La ecuación empleada fue la siguiente:

$$\% \text{ Acidez} = \frac{(V_m - V_b) \times N_{\text{NaOH}} \times \text{eq. g ácido}}{W_m} \times 100\% \quad \text{Ecuación 4.}$$

Donde:

V_m = Volumen de NaOH empleado para titular la muestra (L)

V_b = Volumen de NaOH empleado para titular el blanco (L)

N_{NaOH} = Concentración del NaOH, en Normalidad (eq/L)

eq.g ácido = Equivalentes por gramo de ácido, correspondiente al ácido cítrico. El valor calculado es de 64.04 g/eq.

W_m = Peso de la muestra de jugo (g)

4.7.7 Determinación de Vitamina C por titulación

La determinación del contenido de vitamina C se llevó a cabo siguiendo el método oficial descrito por la AOAC 967.21 (1998). Para esto, se pesó una alícuota de 2.00 mL de jugo de naranja en un Erlenmeyer, luego se le añadió 5.00 mL de la solución de ácido metafosfórico-ácido acético y 8.00 mL de agua destilada. La mezcla se tituló con la solución de 2,6-indofenol (tinte).

Las determinaciones de vitamina C se hicieron por triplicado a cada muestra. Los resultados fueron expresados como porcentaje (%) de vitamina C, en términos de ácido ascórbico, por ser el principal componente de la vitamina C. La ecuación empleada es la siguiente:

$$\text{Contenido de Vitamina C (mg/100g)} = \frac{C \times V_{\text{tinte}}}{W_m} \times 100\% \quad \text{Ecuación 5.}$$

Donde:

$$C = \text{mg de ácido ascórbico/mL de tinte} \quad \rightarrow \quad C = \frac{2.00 \text{ mL} \times 1 \text{ mg/mL}}{V_{\text{tinte corregido}}}$$

$V_{\text{tinte corregido}}$ = Volumen de tinte empleado para titular el estándar – blanco (mL)

2.00 mL = Alícuota del estándar de ácido ascórbico

1 mg/mL = Concentración del estándar de ácido ascórbico

V_{tinte} = Volumen de tinte empleado para titular la muestra (mL)

W_m = Peso de la muestra de jugo (g)

$$\text{mg/100 g} \quad \rightarrow \quad \text{g/100 g} = (\text{mg/100 g})/1000$$

4.7.8 Determinación de Azúcares por HPLC

La determinación simultánea de los principales azúcares en el jugo de naranja fue llevada a cabo usando un cromatógrafo líquido de alta resolución, HPLC Agilent (Agilent Technologies Inc.), que consta de un desgasificador de fase móvil (Agilent 1200, serie G1379B), una bomba cuaternaria (Hewlett Packard 1100, serie G1311A), un automuestreador (Agilent 1200, ALS SL) y un detector de índice de refracción (Agilent 1260, Infinity). El compartimiento de columna acoplado al HPLC está conformado por un módulo de control de temperatura (Module 11) y el compartimiento calentador de columna (Waters Corporation). El HPLC fue operado mediante el software Chemstation (Agilent Technologies) y el mismo se utilizó para la adquisición y procesamiento de datos.

Para la separación cromatográfica de sacarosa, glucosa y fructosa, se utilizó una columna Waters Sugar-Pak I (Waters Corporation) y un módulo de precolumna (Waters Guard-Pak Holder, Precolumn Module WAT088141). Las dimensiones de la columna Sugar-Pak I utilizada fueron las siguientes: 300 mm de largo x 3.5 mm diámetro, 10 μm de tamaño de poro. Esta es una columna empacada con una resina de calcio adherida

a una base de estirenovinilbenceno de intercambio catiónico. La fase móvil utilizada para la separación fue una solución de la sal CaEDTA (sal monohidratada de calcio disodio de ácido etilenodiaminotetraacético $C_{10}H_{12}CaN_2Na_2O_8$, FW: 374.27 g/mol, Sigma-Aldrich) a una concentración de 50 ppm, preparada en agua HPLC (Chromasolv®, Sigma-Aldrich). Previo a su uso, la fase móvil fue filtrada utilizando una membrana de nylon (tamaño de poro de 0.45 μm y diámetro de 47 mm, Whatman®). En adición la misma fue desgasificada en un ultrasonicador a temperatura ambiente (Fisher Scientific).

4.7.8.1 Preparación de muestras

Para el análisis de azúcares, se usó el jugo de naranja almacenado a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Las muestras fueron descongeladas en el refrigerador a $4\text{ }^\circ\text{C}$. El jugo fue homogeneizado y transferido a 3 tubos de centrifuga de 2 mL (Fisher Scientific) diferentes. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos en una centrifuga (5417C, Eppendorf). Del sobrenadante se tomó una alícuota de 50 μL y se llevó a un volumen de 25 mL con el diluyente, CaEDTA 50 mg/L. La solución se homogenizó por 20 segundos con agitación constante en un agitador tipo "Vortex" (VWR). La solución de jugo preparada fue filtrada, utilizando una membrana de PTFE con tamaño de poro de 0.20 μm (25 mm de diámetro, VWR), y transferida a un vial de HPLC.

El análisis de azúcares se les realizó a las naranjas laminadas con quitosano a los días de muestreo 0, 9 y 12, para las naranjas con celulosa a los días 0, 9 y 15, mientras que para el control se analizó a los días 0, 3 y 5. El procedimiento se realizó por triplicado para cada muestreo y se inyectó por triplicado en el equipo.

4.7.8.2 Preparación de estándares y curva de calibración

La cuantificación de los azúcares en las muestras de naranja se realizó por medio de curva de calibración. Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon de forma cuantitativa soluciones de estándares mezclados, partiendo de soluciones “stock”. Los estándares “stock”, se prepararon a 1000 ppm en agua HPLC (Chromasolv®, Sigma-Aldrich) por separado. Los azúcares preparados son: Sacarosa a 1000 ppm (Sacarosa, $C_{12}H_{22}O_{11}$, FW: 342.3 g/mol, Grado utrapuro, Pureza: 99.9 %, Amresco), Glucosa a 1000 ppm (D-Glucosa anhidro, $C_6H_{12}O_6$, FW: 180.16 g/mol, Grado A.C.S., Pureza: 100 %, Fisher Scientific) y fructosa (D-fructosa, $C_6H_{12}O_6$, FW: 180.16 g/mol, Pureza: ≥ 99 %, Sigma-Aldrich). Partiendo de los estándares individuales se prepararon soluciones de estándares mezclados en el diluyente, CaEDTA 50 mg/L. Las concentraciones de los estándares fueron de 100, 80, 60, 40, 20, 10 y 5 ppm, respectivamente.

Cada mezcla de estándar se inyectó en triplicado al inicio y al final de cada muestreo. Los valores de áreas obtenidos se promediaron para realizar la curva de calibración (Área vs. concentración en ppm).

4.7.8.3 Condiciones y determinación de azúcares por el equipo HPLC

El método empleado para la separación de azúcares en el jugo de naranja fue el recomendado por el fabricante de la columna Sugar-Pak I (Waters Corporation). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Fase móvil CaEDTA 50 mg/L a un flujo de 0.8 mL/min; diluyente CaEDTA 50 mg/L; Columna Sugar-Pak I a 90 °C; volumen de inyección de 25 μ L; temperatura del detector de 30 °C.

Cada muestra se preparó por triplicado y se inyectó tres veces de cada vial. Por lo que cada lote de tratamiento consta de nueve réplicas, que fueron promediadas para la cuantificación.

4.7.9 Determinación de Ácidos Orgánicos por HPLC

La determinación simultánea de los principales ácidos orgánicos en el jugo de naranja se realizó con el uso de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent serie 1260 (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA), compuesto por un desgasificador, una bomba binaria, un automuestreador, un compartimento de columna con termostato y un detector de ultravioleta con arreglo de diodos. El equipo fue controlado utilizando el programa es Agilent Mass Hunter Workstation versión B.04.01. Este mismo programa fue utilizado para el procesamiento y la adquisición de datos.

La separación cromatográfica se llevó a cabo utilizando una columna Dionex C18 (4.6 mm, 250 mm, 5 μ m, ThermoFisher). La fase móvil utilizada para dicha separación fue Fosfato monobásico de potasio 0.01 M (KH_2PO_4 , Sigma-Aldrich), preparada en agua HPLC (Chromasolv®, Sigma-Aldrich). El pH de la solución se ajustó a 2.60 ± 0.02 , con ácido fosfórico al 85 % (H_3PO_4 , Sigma-Aldrich) La solución se filtró al vacío con una membrana de nylon (tamaño de poro de 0.45 μ m y diámetro de 47 mm, Whatman®), se desgasificó en un ultrasonido a temperatura ambiente (Fisher Scientific) y se transfirió a una botella de cristal ámbar.

4.7.9.1 Preparación de muestras

Para el análisis de ácidos orgánicos, se usó el jugo de naranja almacenado a -80 °C. Las muestras se descongelaron en el refrigerador a 4 °C y luego el jugo fue homogeneizado. Luego de la homogenización, el jugo se transfirió a 3 tubos de centrifuga de 2 mL (Fisher Scientific) diferentes. Las muestras se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 minutos en una centrifuga 5417C (Eppendorf). Del sobrenadante se tomó una alícuota de 200 µL y se llevó a un volumen de 5 mL con el diluyente, KH₂PO₄ 0.01 M a pH = 2.60. La solución se homogeneizó por 20 segundos con agitación constante en un agitador tipo “Vortex” (VWR). La solución de jugo preparada se transfirió a un vial, pasando el mismo por una membrana de PTFE con tamaño de poro de 0.20 µm (25 mm de diámetro, VWR).

La preparación de muestra se realizó a las muestras de jugo obtenidas de las naranjas laminadas con quitosano a los días 0, 9 y 12 de muestreo, para las naranjas con celulosa a los días 0, 9 y 15, mientras que para el control se analizó a los días 0, 3 y 5. El procedimiento se realizó por triplicado a cada muestreo y se inyectó por triplicado en el equipo.

4.7.9.2 Preparación de estándares y curva de calibración

La cuantificación de los ácidos orgánicos al igual que para los azúcares, se realizó por medio de curva de calibración. Para la elaboración de la curva de calibración se prepararon cuantitativamente soluciones de estándares con concentraciones conocidas, partiendo de soluciones “stock”. Los estándares “stock”, se prepararon de forma individual a 1000 ppm en agua HPLC (Chromasolv®, Sigma-Aldrich) cada uno. Los

estándares de ácidos orgánicos preparados fueron: cítrico (Ácido Cítrico, $C_6H_8O_7$, FW: 192.12 g/mol, Pureza: $\geq 98.5\%$, Sigma-Aldrich), málico (L-(-)-Ácido Málico, $C_4H_6O_5$, FW: 134.09 g/mol, Pureza: $\geq 95\%$, Sigma-Aldrich) y ascórbico (L-Ácido Ascórbico, $C_6H_8O_6$, FW: 176.12 g/mol, Grado reactivo, cristalino, Pureza: $\geq 98\%$, Sigma-Aldrich). Partiendo de los estándares individuales se prepararon soluciones de estándares en el diluyente, KH_2PO_4 0.01 M a pH = 2.60. Las concentraciones de los estándares fueron: para los ácidos málico y ascórbico de 100, 80, 60, 40, 20, 10 y 5 ppm, y para el ácido cítrico de 700, 600, 500, 400, 300, 200 y 100 ppm. Cada mezcla de estándar se inyectó tres veces al inicio y al final de cada muestreo. Los valores de áreas obtenidos se promediaron para realizar la curva de calibración (Área vs. concentración en ppm).

4.7.9.3 Condiciones y determinación de azúcares por el equipo HPLC

El método empleado para la determinación de ácidos orgánicos en el jugo de naranja se realizó con base en las condiciones cromatográficas establecidas por Scherer et al. (2012) con algunas modificaciones. Las condiciones empleadas para la separación fueron las siguientes: Fase móvil KH_2PO_4 0.01 M a pH = 2.60; elución isocrática con un flujo de 0.7 mL/min; diluyente KH_2PO_4 0.01 M a pH = 2.60; columna a una temperatura de 25 °C; volumen de inyección de 10 μ L; el detector de arreglo de diodos se programó para leer dos longitudes de onda simultáneas para la detección de los compuestos, a 210 nm (para los ácidos cítrico y málico) y 250 nm (para el ácido ascórbico).

El área obtenida de las seis inyecciones de los estándares se promedió para realizar la curva de calibración, que relaciona el área con la concentración de los estándares. Cada

muestra se preparó por triplicado y se inyectó tres veces el mismo vial. Por lo que cada lote de tratamiento consta de 9 réplicas, que fueron promediadas para la cuantificación.

4.8 Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se realizó para determinar presencia o ausencia de bacterias y hongos (mohos y levaduras). El estudio microbiológico se llevó a cabo teniendo en cuenta los procedimientos establecidos en el Bacteriological Analytical Manual (BAM, por sus siglas en inglés), tanto para recuento de aerobios (BAM: Aerobic Plate Count), como para mohos y levaduras (BAM: Yeast, Molds and Mycotoxins). Para este propósito se emplearon los medios: PCA (Plate Count Agar) para conteo aeróbico y petrifilm para mohos y Levaduras (Petrifilm™, Yeast and Mold Count Plate, 3M). El medio PCA se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante, que fueron 23.5 g de medio PCA en 1 L de agua destilada. Este medio se calentó y agitó constantemente, hasta completa disolución y se dejó hervir por 1 minuto. El medio se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos. Luego se sirvió en platos Petri, aproximadamente 20 mL por plato, donde se inoculará la muestra. Para realizar las diluciones de las muestras se usó agua peptonada al 0.1 % y se esterilizó en autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Para realizar los recuentos microbiológicos, se usaron tres naranjas enteras de cada muestreo. Para analizar la superficie de las naranjas laminadas, las naranjas se sumergieron en una bolsa estéril con 225 mL de agua peptonada al 0.1 %, por un tiempo de 2 minutos. De esta agua de enjuague se tomó una alícuota de 10 mL y se transfirió a una botella de dilución que contenía 90 mL de agua peptonada al 0.1 %. De esta manera

se continuaron diluciones sucesivas en otras botellas que contenían 90 mL de agua peptonada al 0.1 %. Para el muestreo de Aeróbicos totales, de cada dilución se usó 1.0 mL mediante esparcido en plato. Para el muestreo de hongos y levaduras, se transfirió 1.0 mL a los petrifilm. En el caso del muestreo de hongos y levaduras se siguieron las recomendaciones establecidas por el fabricante (3M). La inoculación se realizó por duplicado para cada factor de dilución. Los platos con medio PCA se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$ y los petrifilm se incubaron a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 días.

Después del tiempo de incubación se realizaron los conteos microbiológicos. Los platos de PCA que se tuvieron en cuenta, fueron los que contenían entre 25 y 250 CFU (unidades formadoras de colonias). Para el análisis de los petrifilm, se tuvo en cuenta la guía de interpretación suministrada por el fabricante. Por esto se consideró los petrifilms que presentaron entre 15 y 150 CFU. Los conteos se expresaron en número de colonias por gramo de producto, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$N = \frac{\sum C}{n} \times d \quad \text{Ecuación 6.}$$

Donde:

N = Numero de colonias por g de producto

$\sum C$ = Suma de todas las colonias en todos los platos donde hubo conteo

n = Numero de platos donde hubo conteo

d = Dilución donde hubo el primer conteo

4.9 Apariencia

La apariencia se realizó visualmente y se documentó mediante fotografías. Para este parámetro se usaron tres naranjas, que fueron seleccionadas aleatoriamente. Las mismas tres naranjas se usaron en los tiempos de muestreo correspondientes de cada tratamiento y control. El examen visual se hizo a la superficie externa, y se cotejó presencia o ausencia de deterioro físico.

4.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico se empleó para todos los resultados obtenidos mediante un análisis de varianza (ANOVA), usando un diseño experimental factorial incompleto. Este permitió detectar interacciones y diferencias significativas entre las diversas variables. El nivel de confianza utilizado fue del 95 % ($\alpha = 0.05$). Para establecer comparación entre medias de tratamientos con los muestreos se utilizó la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). para este análisis se empleó el paquete completo de Infostat (Di Rienzo et al., 2011).

En el presente estudio se obtuvieron tres tratamientos: naranjas laminadas con quitosano, naranjas laminadas con celulosa modificada (HPMC+SP) y naranjas control. Las naranjas de todos los tratamientos se almacenaron bajo las mismas condiciones, pero con diferencia en el tiempo. Dado que el objetivo es encontrar el efecto de los diferentes tratamientos con respecto al tiempo de almacenamiento, se usó el arreglo factorial, para observar las interacciones. Teniendo en cuenta que los muestreos no se realizaron en los mismos días de almacenamiento, ni en la misma proporción en los tres

tratamientos, se realizaron tablas de equivalencia, tal como se presenta a continuación en la tabla 1.

Tabla 1. Equivalencia en el día de muestreo con respecto al número de muestreo.

DIA		NUMERO DE MUESTREO	
QUITOSANO Y CELULOSA	CONTROL	Pérdida de peso	pH, °Brix, firmeza, color, acidez titulable, vitamina C y microbiología
0	0		1
3	1	1	2
6	3	2	3
9	5	3	4
12		4	5
15		5	6

En el caso de los análisis de azúcares y ácidos orgánicos por HPLC, se realizaron solo al inicio, intermedio y final del almacenamiento a los 3 tratamientos. En la tabla 2, se muestran las equivalencias de los días de muestreo con respecto al número del muestreo que corresponde al análisis.

Tabla 2. Equivalencia en el día de muestreo con respecto al número de muestreo para los análisis de azúcares y ácidos orgánicos.

DIA			MUESTREO
QUITOSANO	CELULOSA	CONTROL	
0	0	0	1
9	9	3	2
12	15	5	3

5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Análisis Físicoquímico

5.1.1 Medición de pH

La medida potenciométrica más importante utilizada en la industria agroalimentaria sirve para cuantificar la concentración de H_3O^+ , existente en el zumo del fruto, que se puede considerar la acidez activa. Esto se puede relacionar con el contenido de ácidos presentes y la capacidad de proliferación microbiana durante el almacenamiento (valores bajos permitirán una vida de anaquel más amplia) puesto que actuará a nivel fisiológico en el fruto como barrera fisiológica natural frente a la acción microbiana (Domene Ruiz & Segura Rodriguez, 2014b). El cambio de pH puede verse afectado por el proceso de respiración, donde se da la degradación oxidativa de los productos más complejos normalmente presentes en las células, como almidón, azúcares y ácidos orgánicos a moléculas más simples, como el dióxido de carbono y el agua, con la consiguiente liberación de energía. Esta energía es indispensable para mantener el resto de las reacciones metabólicas del fruto (Lasallista, 2012).

Conforme se observa en la tabla 3, el pH no presentó cambios significativos en el transcurso del tiempo de almacenamiento dentro de cada tratamiento. Estos resultados, indican que hay protección por parte de la lámina durante el almacenamiento en cada tratamiento. Al comparar los tres tratamientos, se observaron diferencias significativas, debido a que los pH iniciales son diferentes entre tratamientos. Esta diferencia en los

valores de pH iniciales se puede relacionar a la naturaleza del fruto y al origen de los mismos. A pesar de esto, se notó que la lámina evitó que el pH del jugo de las naranjas recubiertas se viese afectado a través del tiempo de almacenamiento.

Tabla 3. Parámetro de pH en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

MUESTREO	pH		
	Quitosano	Celulosa	Control
1	3.62 ± 0.15 ^{bcde}	3.92 ± 0.13 ^e	3.28 ± 0.04 ^a
2	3.48 ± 0.07 ^{abc}	3.68 ± 0.05 ^{cde}	3.50 ± 0.07 ^{abc}
3	3.75 ± 0.16 ^{cde}	3.89 ± 0.02 ^e	3.27 ± 0.09 ^a
4	3.65 ± 0.13 ^{bcde}	3.81 ± 0.13 ^{de}	3.37 ± 0.06 ^{ab}
5	3.56 ± 0.05 ^{abcd}	3.73 ± 0.06 ^{cde}	nd
6	nd	3.75 ± 0.13 ^{cde}	nd

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

En estudios previos se han reportado valores de pH de 3.35 ± 0.01 para naranjas de variedad Kozan (Kelebek et al., 2009). Además, se ha encontrado valores de pH de 3.58 a 3.98 en jugo de naranjas valencia en diferentes cosechas (Nagy & Smoot, 1977). En otro estudio de naranjas valencia, se reportó un valor muy similar al anterior de 3.55 ± 0.06 (Plaza et al., 2011). Siendo este parámetro característico para las variedades de naranjas, se determinó que los resultados obtenidos de pH de las naranjas se encontraron dentro del rango de los estudios preliminares.

5.1.2 Determinación de Sólidos Solubles (°Brix)

En la tabla 4 se observa que para los grados Brix, no hay diferencias significativas dentro de cada tratamiento a través del tiempo de almacenamiento. Al comparar los tratamientos se observaron diferencias, debido a que iniciaron con valores diferentes. En

el tratamiento con Quitosano en el muestreo 4 (correspondiente al día 9 de almacenamiento), aumentó el contenido de sólidos solubles significativamente con respecto a los días 0, 3 y 6 (muestréos 1, 2 y 3, respectivamente). Durante el proceso de maduración ocurre la hidrólisis de los almidones que se transforman en azúcares, en adición a la disminución de la acidez debido a la degradación de los ácidos orgánicos (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007). En el último día de muestreo (día 12 de almacenamiento) el contenido de azúcares tendió a disminuir, sin embargo, no hubo diferencia significativa con respecto al día 9.

Tabla 4. Parámetro de °Brix en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

MUESTREO	°BRIX		
	Quitosano	Celulosa	Control
1	8.64 ± 0.31 ^{de}	9.00 ± 0.17 ^{cde}	10.67 ± 0.12 ^a
2	8.75 ± 0.51 ^{de}	10.74 ± 0.26 ^a	10.48 ± 0.06 ^a
3	8.59 ± 0.33 ^e	9.64 ± 0.14 ^{abcde}	10.76 ± 0.29 ^a
4	9.76 ± 0.41 ^{abcd}	10.39 ± 0.35 ^a	10.74 ± 0.93 ^a
5	9.14 ± 0.49 ^{bcde}	10.26 ± 0.12 ^{ab}	nd
6	nd	9.92 ± 0.13 ^{abc}	nd

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

En el caso del tratamiento con Celulosa se presentó una diferencia significativa entre el día 0 (muestreo 1) y el día 3 (muestreo 2) de almacenamiento, dándose un aumento en los sólidos solubles. El incremento pudo ser ocasionado por el mismo proceso de maduración. Entre los días 6 (muestreo 3) y 15 (muestreo 6), no hubo diferencias significativas en el contenido de los sólidos solubles. En las naranjas control no se presentaron diferencias significativas en el transcurso del tiempo de almacenamiento. Este comportamiento se puede explicar, debido a que las naranjas son no climatéricas y

sufren un proceso de maduración lento. En las frutas no climatéricas los procesos de desarrollo y maduración organoléptica son continuos y graduales; manteniendo éstas, en todo momento, niveles bajos de respiración y de producción de etileno (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

El contenido de sólidos solubles totales (°Brix) en las naranjas tratadas y control se encontró por debajo del reportado por Kelebek et al. (2009) el cual fue 11.8 ± 0.00 para naranjas de variedad Kozan. Sin embargo, Nagy & Smoot (1977) reportó 10.2 a 12.6 en °Brix para naranjas valencia. De manera similar, se obtuvo 10.62 ± 0.23 °Brix en naranjas valencia a 20 °C (Plaza et al., 2011). Los valores obtenidos fueron muy cercanos a los reportados, sin embargo, este valor puede depender de la variedad y del grado de madurez del fruto.

5.1.3 Determinación de Pérdida de peso

La pérdida de peso en las naranjas principalmente se debe a pérdida de agua en el fruto, el cual ocurre por la transpiración. La transpiración es un proceso de transferencia de vapor de agua desde el fruto hacia la atmósfera. Mientras el fruto permanece unido a la planta, las pérdidas de agua se reponen a través del sistema radicular y vascular de la planta. En los frutos cítricos, una de las principales causas de deterioro fisiológico durante el periodo poscosecha es producido por la transpiración al separarse de la planta madre y la falta de reposición del agua (Lasallista, 2012).

De acuerdo a los resultados de la tabla 5, se observó una diferencia significativa en la pérdida de peso, a través del tiempo de almacenamiento y entre los diferentes tratamientos. Los valores altos en la pérdida de peso en las naranjas tratadas con las láminas de quitosano y celulosa en los primeros 3 días de almacenamiento, pudo ser debido al proceso de secado de la lámina.

Tabla 5. Pérdida de peso en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

MUESTREO	PERDIDA DE PESO (%)		
	Quitosano	Celulosa	Control
1	2.46 ± 0.52 ^f	2.06 ± 0.35 ^{fg}	1.22 ± 0.17 ^g
2	4.65 ± 0.14 ^{de}	3.93 ± 0.46 ^e	2.68 ± 0.08 ^f
3	6.19 ± 0.08 ^c	5.69 ± 0.40 ^{cd}	4.72 ± 0.22 ^{de}
4	8.21 ± 0.64 ^b	7.44 ± 0.34 ^b	nd
5	nd	9.72 ± 0.54 ^a	nd

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

El comportamiento en la pérdida de peso entre las dos láminas comestibles fue muy similar y no hubo diferencias significativas entre muestreos, mientras que el control perdió un poco más de agua en 5 días de almacenamiento, que fue lo que duraron. Esto indica que las láminas comestibles elaboradas a base de Quitosano y Celulosa, evitaron la pérdida de agua excesiva, siendo esta, una de las características principales de las láminas. Otro parámetro importante que pudo haber afectado en el proceso de pérdida de peso de las naranjas tratadas en el transcurso del tiempo fue la temperatura y humedad relativa en la que se encontraban almacenadas (14.0 °C y 80.0 % HR). La transpiración no sólo causa desecación, arrugamiento y ablandamiento, sino que también acelera la senescencia, siendo mayor con las altas temperaturas y baja humedad ambiente (Lasallista, 2012). En general, la diferencia en cuanto a la pérdida de

peso puede atribuirse a que las láminas elaboradas tanto a base de celulosa como de quitosano actúan como barreras protectoras que limitan la pérdida de humedad excesiva por transpiración.

Se ha demostrado que algunas láminas comestibles no presentan buenas propiedades de barrera frente a la humedad, sin embargo, la adición de lípidos mejora potencialmente estas propiedades de barrera de agua. Uno de los casos es la adición de carvacrol (aceite esencial, proveniente del orégano) en lámina comestible basada en puré de manzana, donde se obtuvo un decrecimiento significativo en la permeabilidad de vapor de agua de la lámina (Du et al., 2011). De la misma manera, se encontró que la permeabilidad al vapor de agua decrece al aumentar la porción hidrofóbica de los compuestos de la lámina. Este efecto ocurre dado a que la transferencia de vapor de agua generalmente ocurre a través de la porción hidrofílica de la lámina, así, la permeabilidad al vapor de agua depende de la relación hidrofílico – hidrofóbico de los componente de la lámina (Du et al., 2011).

5.1.4 Medición de Firmeza

Un factor natural que afecta negativamente al fruto cosechado es el proceso de transpiración, que continua a pesar de ser cosechado. Este factor se ve reflejado en pérdida de peso y pérdida de calidad tales como: marchitamiento, pérdida de firmeza y sabor. La transpiración se produce en mayor proporción en la piel del fruto que en la pulpa. Por lo que la zona externa del fruto es más susceptible a la senescencia y por tanto, más propensa a las alteraciones fisiológicas (Lasallista, 2012).

La firmeza es un parámetro indicativo de la calidad de los frutos y está relacionada con la estructura de la pared celular y con el estado de madurez. La firmeza de las frutas depende de la turgencia, cohesión, forma y tamaño de las células que conforman la pared celular, la presencia de tejidos de sostén o soporte y de la composición del fruto. Los componentes de la pared celular que contribuyen a la firmeza son la hemicelulosa, la celulosa y la pectina. La firmeza va disminuyendo con el tiempo y no todos los frutos evolucionan con igual velocidad (Domene Ruiz & Segura Rodriguez, 2014a).

La fuerza de tensión es uno de los indicadores más comunes de las propiedades mecánicas de una lámina comestible. Los plastificantes normalmente son adicionados para incrementar la flexibilidad o plasticidad en el polímero de la lámina comestible. En este caso el aditivo que cumple las funciones de plastificante en las láminas de quitosano y de celulosa modificada, es el glicerol. Los plastificantes frecuentemente son adicionados dentro de la lámina comestible para reducir las fuerzas intermoleculares e incrementar la movilidad de las cadenas poliméricas, de esta manera mejoran la flexibilidad (Du et al., 2011; McHugh, Avena-Bustillos, & Du, 2009).

Tabla 6. Firmeza en naranjas sin cáscara tratadas a través del tiempo.

MUESTREO	FUERZA (g)		
	Quitosano	Celulosa	Control
1	2.21 ± 0.29 ^{abc}	2.45 ± 0.21 ^a	1.58 ± 0.18 ^{de}
2	2.12 ± 0.13 ^{abcd}	2.16 ± 0.17 ^{abcd}	1.35 ± 0.05 ^e
3	1.81 ± 0.35 ^{bcde}	2.14 ± 0.34 ^{abcd}	1.61 ± 0.21 ^{cde}
4	1.92 ± 0.16 ^{abcde}	2.16 ± 0.09 ^{abcd}	1.44 ± 0.20 ^e
5	2.13 ± 0.18 ^{abcd}	2.30 ± 0.16 ^{ab}	nd
6	nd	2.36 ± 0.11 ^{ab}	nd

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

Conforme se muestra en la tabla 6, no se observó cambio significativo a través del tiempo dentro de cada tratamiento, ni entre las dos láminas, pero si se presentaron diferencias significativas entre estos dos tratamientos con el control. Las diferencias encontradas en la firmeza indicaron que se necesita más fuerza para romper la superficie de las naranjas recubiertas que en las naranjas control. Este comportamiento demuestra que el uso de la lámina ayudó a proveerle mayor firmeza y, por ende, flexibilidad a la parte externa del fruto, debido a que, al perder la cáscara, estas características disminuyen. Además, las láminas comestibles ayudaron a proteger el fruto del ablandamiento ocasionado por la deshidratación excesiva, y así evitar el aumento en la sensibilidad a daños mecánicos y ataque microbiano, por más tiempo.

5.1.5 Medición de Color

El color es una cualidad sensorial importante de los alimentos. Los consumidores asocian el color de sus alimentos con su sabor y aroma, es por esto que se considera un factor crítico de calidad en algunos productos frescos y procesados. El color de la lámina puede influir en la aceptabilidad del producto por parte del consumidor, por ello es importante analizar si los tratamientos afectan la coloración de las naranjas tratadas. El parámetro L describe la luminosidad o claridad, donde 0 es el negro y 100 es el blanco (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014). En la tabla 7 se observan los resultados obtenidos para L, y según el análisis estadístico realizado, indica que no hubo diferencias significativas entre tratamientos, ni a través del tiempo de almacenamiento, indicando que la luminosidad se mantuvo constante en el jugo de las naranjas.

Tabla 7. Color en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

MUESTREO	L			Chroma		
	Quitosano	Celulosa	Control	Quitosano	Celulosa	Control
1	56.66 ± 0.27 ^a	56.65 ± 0.64 ^a	56.73 ± 0.14 ^a	37.63 ± 1.77 ^{de}	36.66 ± 2.17 ^e	47.57 ± 1.79 ^a
2	57.30 ± 0.51 ^a	56.51 ± 0.09 ^a	56.10 ± 0.19 ^a	37.28 ± 3.20 ^{de}	42.75 ± 1.82 ^{abcde}	45.66 ± 2.62 ^{abc}
3	56.09 ± 1.59 ^a	56.55 ± 0.40 ^a	56.62 ± 0.61 ^a	38.03 ± 4.59 ^{de}	39.36 ± 0.67 ^{cde}	45.94 ± 0.42 ^{ab}
4	57.04 ± 0.19 ^a	56.26 ± 0.20 ^a	56.12 ± 0.34 ^a	40.90 ± 2.04 ^{bcde}	41.79 ± 1.20 ^{abcde}	43.26 ± 0.56 ^{abcd}
5	57.77 ± 0.67 ^a	56.82 ± 0.13 ^a	nd	38.18 ± 1.69 ^{de}	42.77 ± 1.18 ^{abcde}	nd
6	nd	56.70 ± 0.45 ^a	nd	nd	39.94 ± 2.03 ^{bcde}	nd
Hue						
MUESTREO	Quitosano	Celulosa	Control			
1	87.34 ± 0.86 ^a	85.46 ± 1.41 ^a	86.92 ± 0.14 ^a			
2	87.40 ± 2.19 ^a	83.97 ± 0.54 ^a	85.91 ± 1.37 ^a			
3	85.76 ± 4.96 ^a	86.29 ± 1.15 ^a	86.43 ± 0.19 ^a			
4	86.23 ± 1.38 ^a	84.43 ± 0.68 ^a	86.41 ± 0.74 ^a			
5	86.87 ± 1.94 ^a	85.10 ± 0.68 ^a	nd			
6	nd	86.05 ± 1.52 ^a	nd			

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

La estadística se realizó para cada parámetro: L, Chroma y Hue, independientemente

El Chroma o saturación toma el valor de 0 para estímulos acromáticos y normalmente no pasa de 150, aunque puede superar valores de 1000 para estímulos monocromáticos (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014). En los resultados obtenidos de las naranjas sin cáscara tratadas con las dos láminas y el control, no se presentaron diferencias significativas a través del tiempo para Chroma. Además, no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos con láminas comestibles de quitosano y celulosa. Sin embargo, al comparar el jugo de las naranjas cubiertas con lámina comestible con el control, si se presentaron diferencias significativas. Los valores promedio para Chroma presentados en la tabla 7 van de 36.66 a 42.77 en el jugo de las naranjas con quitosano y celulosa, mientras que para el jugo de las naranjas control van de 43.26 a 47.57. Estos resultados sugieren que el jugo extraído de los frutos control, varió de un color naranja pálido a naranja intenso con respecto a los frutos tratados con quitosano y celulosa. A pesar de esta diferencia, también se notó que el valor de Chroma para el control inicial es más alto comparado con los dos tratamientos, esto es debido a la variación del producto y lotes de cosecha.

El tono, Hue, varía entre 0 y 360° y para los estímulos acromáticos es una magnitud indefinida. El Hue indica la posición en una escala de 100 tonos, dicha escala está compuesta por 10 tonos fundamentales; el tono serían las variaciones que un solo color puede tener al combinarlo con otros (Mathias-Rettig & Ah-Hen, 2014). De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 7, no hubo diferencia significativa entre tratamientos, ni durante el tiempo de almacenamiento. Estos resultados, indican que la tonalidad del jugo se mantuvo constante, sin ser afectada por las láminas.

En general, se obtuvo que el color no se vio afectado por las láminas comestibles, pero si ayudaron a conservarlo durante el almacenamiento. De una manera muy similar se demostró este comportamiento en el efecto del color en el jugo naranjas Valencia, ocasionado por láminas comestibles (Materano, Valera, Zambrano, Maffei, & Torres, 2007).

5.1.6 Determinación de Acidez titulable

La acidez titulable se expresó como ácido cítrico, por ser el principal ácido orgánico presente en las naranjas. La tabla 8 presenta la correlación de los valores de acidez titulable en el jugo de naranja de los diferentes tratamientos, con respecto al tiempo de muestreo. En las naranjas cubiertas con lámina comestible a base de quitosano, se observó una tendencia al incremento en la acidez titulable, iniciando en 0.90 g/100g hasta llegar a 1.02 g/100g en el último día de almacenamiento, correspondiente al día 12. El análisis estadístico presentó que no hubo diferencias significativas durante el tiempo de almacenamiento, lo que nos permite concluir que no hay cambio en la acidez del producto.

Tabla 8. Acidez titulable en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

MUESTREO	ACIDEZ TITULABLE (g/100g)		
	Quitosano	Celulosa	Control
1	0.90 ± 0.26 ^{bcd}	0.73 ± 0.09 ^d	1.35 ± 0.03 ^a
2	1.19 ± 0.13 ^{abc}	0.88 ± 0.05 ^{bcd}	1.09 ± 0.07 ^{abcd}
3	0.95 ± 0.22 ^{abcd}	0.78 ± 0.03 ^{cd}	1.25 ± 0.18 ^{ab}
4	0.96 ± 0.11 ^{abcd}	0.81 ± 0.19 ^{cd}	1.29 ± 0.05 ^{ab}
5	1.02 ± 0.06 ^{abcd}	0.89 ± 0.07 ^{bcd}	nd
6	nd	0.91 ± 0.17 ^{bcd}	nd

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

En el tratamiento con la lámina comestible basada en celulosa modificada, al igual que en las naranjas con la lámina de quitosano, no se presentó diferencia significativa durante el periodo de almacenamiento (ver tabla 8). La acidez titulable en las naranjas recubiertas con celulosa inició en un valor de 0.73 g/100g, y finalizó en el día 15 de almacenamiento con un valor de 0.91 g/100g. De manera similar que en el tratamiento con quitosano, se observó una protección del alimento a través del tiempo.

En las naranjas control, no se presentó diferencia significativa en la acidez titulable a través del tiempo de almacenamiento. Sin embargo, al comparar el control con los tratamientos, se presentó diferencia significativa en algunos días de muestreo. Este efecto pudo ser debido a la diferencia de lotes de naranjas, ya que los tres tratamientos iniciaron con valores diferentes, siendo el control quien inició con un valor de 1.35 g/100g, mayor con respecto a 0.90 g/100g y 0.73 g/100g, de los tratamientos de quitosano y celulosa, respectivamente. Por tal motivo, el valor en la acidez titulable se mantuvo más alto durante el periodo de almacenamiento, sin embargo, permaneció constante.

El valor de acidez titulable puede variar de acuerdo a la variedad de la naranja, tal como lo describe Albertini et al. (2006), donde es más constante en variedades menos ácidas, como es el caso de la naranja valencia. La acidez titulable en las naranjas tratadas y control fue similar al reportado por Kelebek et al. (2009) de 0.87 ± 0.00 % para naranjas de variedad Kozan. Similarmente reportó, Nagy & Smoot (1977) concentraciones de acidez titulable de 0.77 % a 1.11 % en naranjas valencia.

5.1.7 Determinación de Vitamina C

La vitamina C que se determinó por medio de titulación con 2,6-dicloro indofenol se expresó como ácido ascórbico, ya que es el principal ácido que contribuye a la vitamina C, después del ácido dehidroascórbico (Fennema, 1996). El contenido de vitamina C en frutas y hortalizas puede estar influenciado por diversos factores como diferencias de genotipos, condiciones climáticas y prácticas culturales (Cano, Medina, & Bermejo, 2008). En la tabla 9 se observa, que no hubo diferencia significativa durante el almacenamiento en los tres tratamientos. Además, entre los tratamientos de naranjas cubiertas con quitosano y celulosa modificada no se presentaron diferencias significativas. Estos dos tratamientos, a su vez mostraron diferencias significativas con respecto al control. Este efecto, de manera similar como ocurrió con la acidez titulable, pudo deberse a la variabilidad ocasionada por la naturaleza del producto, además iniciaron con valores diferentes en el contenido de vitamina C. Esta tendencia demostró como las láminas ayudaron a evitar la pérdida de dicha vitamina, siendo esta, un conjunto de ácidos bastante inestables que se oxidan con facilidad en contacto con el oxígeno, y al ser las láminas una barrera contra el medio externo del fruto, permitieron que se conservará por más tiempo.

Tabla 9. Vitamina C en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

MUESTREO	Ácido Ascórbico (g/100g)		
	Quitosano	Celulosa	Control
1	0.047 ± 0.000 ^{cd}	0.044 ± 0.004 ^d	0.057 ± 0.003 ^{ab}
2	0.046 ± 0.002 ^{cd}	0.048 ± 0.003 ^{bcd}	0.054 ± 0.003 ^{abc}
3	0.043 ± 0.003 ^d	0.046 ± 0.001 ^{cd}	0.060 ± 0.002 ^a
4	0.046 ± 0.003 ^{cd}	0.047 ± 0.003 ^{cd}	0.064 ± 0.005 ^a
5	0.049 ± 0.006 ^{bcd}	0.046 ± 0.001 ^{cd}	nd
6	nd	0.046 ± 0.002 ^{cd}	nd

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

5.1.8 Determinación de Azúcares por HPLC

La cuantificación de los azúcares principales que se encuentran en la naranja, tales como: sacarosa, glucosa y fructosa (Belitz et al., 2009), se realizó por medio de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés, HPLC). El análisis se realizó al jugo de las muestras de naranjas obtenidas al inicio, un punto intermedio y al final del almacenamiento. La técnica analítica HPLC, es un método para separar mezclas, y en este caso en particular, separar los azúcares por medio de la identificación de sus tiempos de retención, que son comparables a los estándares empleados.

La cuantificación de sacarosa, glucosa y fructosa se llevó a cabo por medio de curvas de calibración para cada azúcar con su respectivo estándar. Las concentraciones empleadas para cada curva de calibración son de: 5.0 ppm, 10.0 ppm, 20.0 ppm, 40.0 ppm, 60.0 ppm, 80.0 ppm y 100 ppm. La linealidad mide cuán bien una curva de calibración sigue una línea recta, mostrando que la respuesta es proporcional a la cantidad de analito. Una medida comúnmente usada para medir la linealidad es el coeficiente de correlación al cuadrado (R^2). El coeficiente de correlación (R^2) es el valor que define la forma en que los datos encajan en una línea recta (Harris, 2010).

5.1.8.1 Cuantificación de Sacarosa

La curva de calibración para la sacarosa tuvo un coeficiente de correlación (r^2) de 1.00, lo cual indica que todos los puntos de datos se encuentran dentro de una línea recta. El límite de detección (también denominado límite inferior de detección) es la cantidad más pequeña de analito que es "significativamente diferente" del blanco y el límite de

cuantificación (límite inferior de cuantificación) es una señal que es 10 veces mayor que el ruido, es decir, la cantidad más pequeña que se puede medir con una precisión razonable (Harris, 2010; Nielsen, 2010). Para esta misma curva de calibración se obtuvo un límite de detección de 1.47 ppm (1.47×10^{-4} g/100mL) y un límite de cuantificación de 4.90 ppm (4.90×10^{-4} g/100mL). Para la curva de calibración de sacarosa la menor concentración utilizada fue de 5.0 ppm, el cual es un valor por encima de los límites de detección y cuantificación. En cuanto, a los cromatogramas, se observó (ver figuras 5 y 6), que la sacarosa tuvo un tiempo de retención de 4.975 ± 0.006 minutos para las curvas de calibración, mientras que para las muestras fue de 4.973 ± 0.005 minutos. Para los estándares y muestras se obtuvieron desviaciones estándar relativas (RSD) en los tiempos de retención de 0.122 % y 0.098 %, respectivamente, lo que indica una alta reproducibilidad entre las inyecciones.

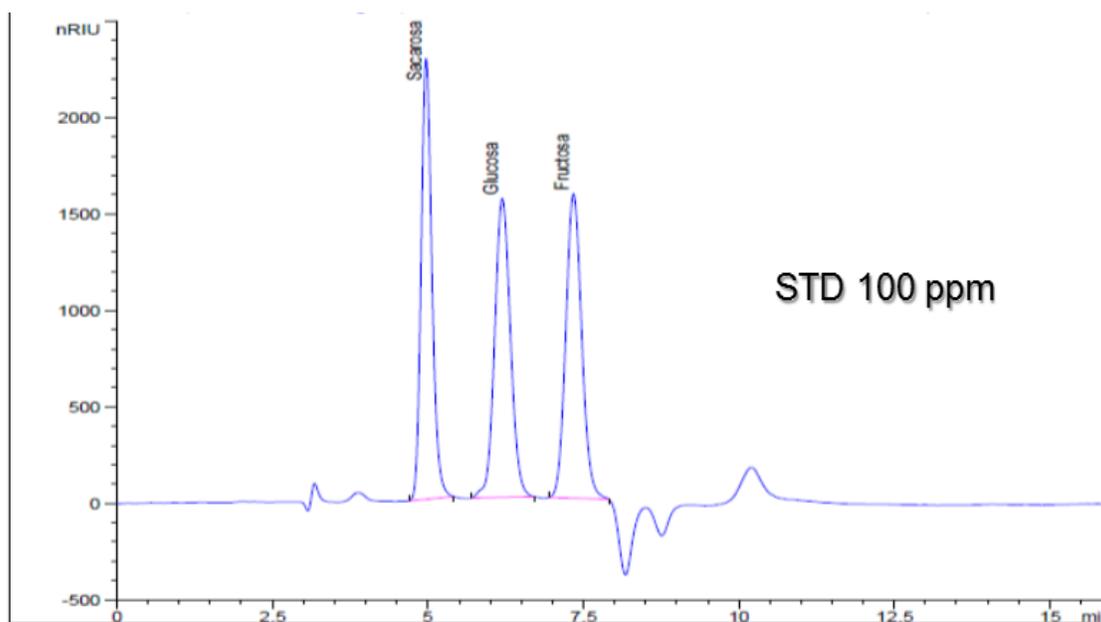


Figura 5. Cromatograma de una mezcla estándar de azúcares (STD): Sacarosa, Glucosa y Fructosa.

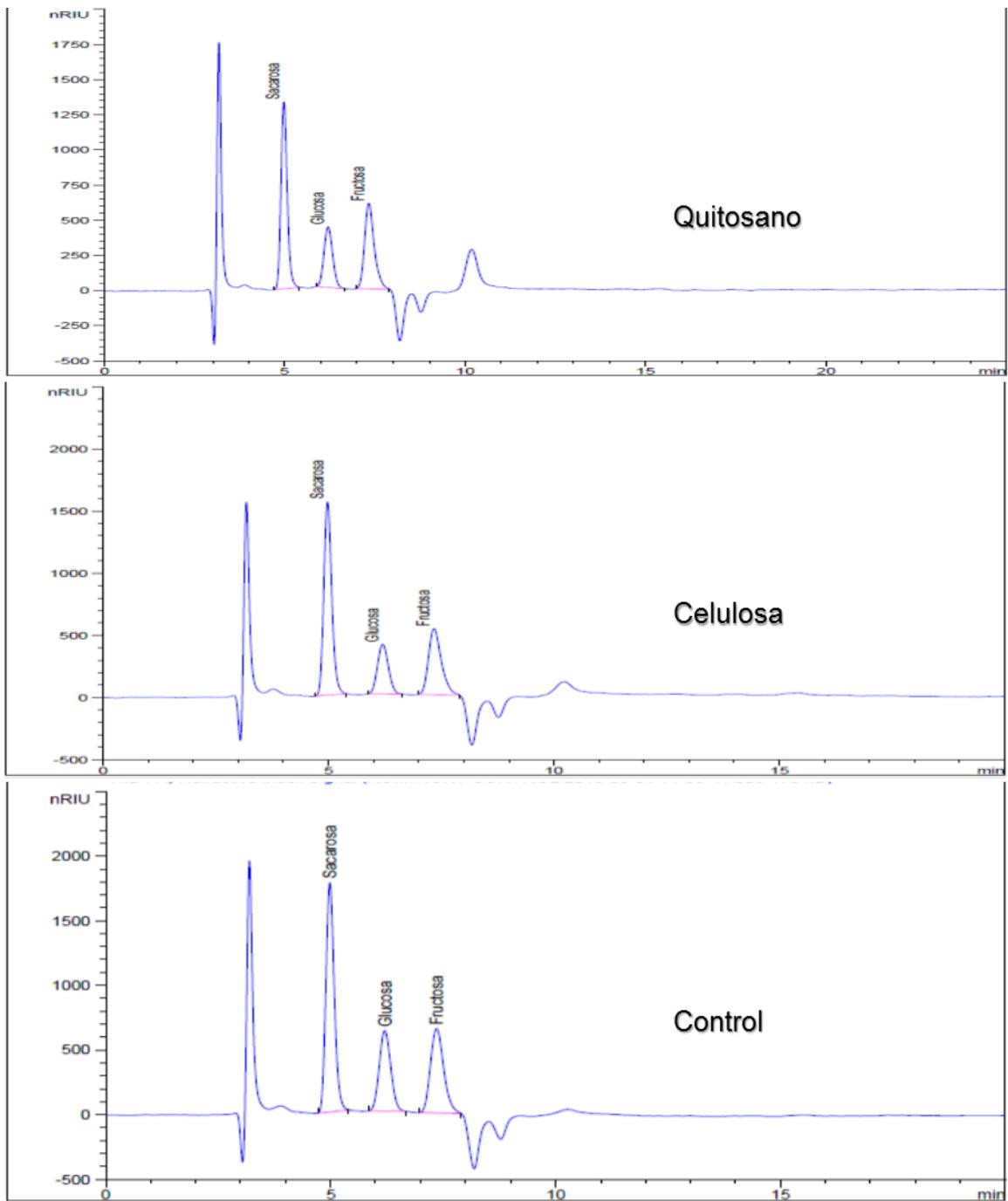


Figura 6. Cromatogramas de muestras de naranjas tratadas con quitosano, celulosa y control.

De acuerdo, a los resultados presentados en la tabla 10, se puede destacar que el azúcar principal que se encontró en la naranja fue la sacarosa. En las muestras obtenidas de las naranjas cubiertas con las láminas comestibles, no presentaron diferencia significativa en el tiempo inicial, con respecto al control. Las muestras de naranjas cubiertas con quitosano presentaron una disminución en el contenido de sacarosa desde el inicio hasta el final del almacenamiento, siendo, 3.08 g/100mL y 2.66 g/100mL, respectivamente. A pesar de esta tendencia no se presentó diferencia significativa. En cuanto a las muestras con celulosa se notó un incremento de 3.38 g/100mL al inicio, con respecto a 3.43 g/100mL al final del almacenamiento. Sin embargo, al haber dicha tendencia no hay diferencia significativa entre los contenidos de sacarosa entre el inicio y el final del almacenamiento. En los dos tratamientos con láminas comestibles se presentó un incremento en el contenido de sacarosa en el intermedio del almacenamiento (día 9) con respecto al valor inicial y finalmente el contenido disminuyó.

De acuerdo a estudios previos, se ha encontrado que las frutas experimentan una serie de cambios en sus componentes internos, que son más evidentes durante la maduración. Dentro de esos cambios se encuentra, el cambio en el sabor. El sabor cambia, debido a la hidrólisis de los almidones que se transforman en azúcares, por la desaparición de los taninos y otros productos causantes del sabor astringente y por la disminución de la acidez debido a la degradación de los ácidos orgánicos (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007). Por tal motivo, se presentó un incremento en la sacarosa en el día 9 de almacenamiento. La sacarosa, se hidroliza con facilidad en medio ácido y se degrada para obtener energía que es consumida en los procesos metabólicos. La hidrólisis de

sacarosa se denomina inversión y la mezcla equimolar resultante de glucosa y fructosa se denomina azúcar invertida (Belitz et al., 2009; Kays & Paull, 2004). Debido a la degradación de la sacarosa, se presentó una disminución en su contenido al final del almacenamiento, en los dos tratamientos con láminas de celulosa y quitosano. En las naranjas control no se presentaron diferencias significativas a través del tiempo, sin embargo, el contenido de sacarosa tendió a disminuir a través del tiempo. Con los resultados obtenidos en la tabla 8, se puede destacar que las láminas comestibles permitieron que el metabolismo del fruto continúe, pero a una velocidad más lenta que en el control. Por lo tanto, las láminas ayudaron a preservar por más tiempo la calidad del fruto.

Tabla 10. Concentración de azúcares en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

AZUCAR	TRATAMIENTO	Concentración de Azúcares en naranjas sin cáscara (g/100mL)		
		1	2	3
SACAROSA	Quitosano	3.08 ± 0.15 ^{cd}	3.37 ± 0.27 ^c	2.66 ± 0.10 ^d
	Celulosa	3.38 ± 0.05 ^{bc}	3.97 ± 0.30 ^a	3.43 ± 0.15 ^{bc}
	Control	4.18 ± 0.01 ^a	4.11 ± 0.21 ^a	3.92 ± 0.23 ^{ab}
GLUCOSA	Quitosano	1.35 ± 0.04 ^b	1.73 ± 0.16 ^{ab}	1.45 ± 0.21 ^b
	Celulosa	1.32 ± 0.10 ^b	1.72 ± 0.20 ^{ab}	1.68 ± 0.05 ^{ab}
	Control	1.96 ± 0.11 ^a	1.97 ± 0.06 ^a	2.01 ± 0.34 ^a
FRUCTOSA	Quitosano	1.97 ± 0.04 ^{ab}	2.43 ± 0.15 ^a	2.05 ± 0.25 ^{ab}
	Celulosa	1.93 ± 0.06 ^b	2.31 ± 0.16 ^{ab}	2.26 ± 0.07 ^{ab}
	Control	2.26 ± 0.07 ^{ab}	2.27 ± 0.06 ^{ab}	2.42 ± 0.32 ^a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

La estadística se realizó para cada azúcar: sacarosa, glucosa y fructosa independientemente

El contenido de sacarosa puede fluctuar durante el almacenamiento, dependiendo de la variedad de la naranja, que pueden ser muy ácidas o menos ácidas, tal como lo expone Albertini et al. (2006), en su investigación de diversas variedades de naranjas

almacenadas por 150 días a -20 °C. El contenido de sacarosa en naranjas puede variar entre 28.17 y 66.22 g/L (2.817 – 6.622 g/100mL) según sea la variedad de la naranja (Sdiri, Bermejo, Aleza, Navarro, & Salvador, 2012). Estos valores son comparables con los resultados de la tabla 8.

5.1.8.2 Cuantificación de Glucosa

La curva de calibración utilizada para la cuantificación de glucosa obtuvo un coeficiente de correlación (r^2) de 1.00. De esta curva se obtuvo un límite de detección de 1.08 ppm (1.08×10^{-4} g/100mL) y un límite de cuantificación de 3.60 ppm (3.60×10^{-4} g/100mL). Estos límites de detección y cuantificación verificaron la sensibilidad del método, por ser valores bajos con respecto al estándar de menor concentración, 5.0 ppm. Para la identificación del pico de glucosa, se obtuvieron tiempos de retención de 6.198 ± 0.005 minutos para los estándares empleados en las curvas de calibración, mientras que para las muestras fue de 6.196 ± 0.005 minutos, como se observa en las figuras 3 y 4. La reproducibilidad de las inyecciones, tanto en los estándares como en las muestras se notó con las desviaciones estándar relativas de 0.084 % para las curvas de calibración y 0.074 % correspondiente a las muestras.

Los resultados obtenidos para la cuantificación de glucosa en los tratamientos con láminas comestibles y control se presentan en la tabla 10. La glucosa en las naranjas con quitosano y con celulosa, no presentaron diferencias significativas a través del tiempo de almacenamiento. En las naranjas control no hubo diferencia significativa en el transcurso del tiempo de almacenamiento, pero si se encontraron diferencias

significativas con respecto a los otros dos tratamientos mencionados anteriormente. Esta diferencia se pudo presentar debido a que las concentraciones de glucosa iniciaron con un valor mayor, de 1.97 g/100mL en el control, con relación a las concentraciones de las muestras con quitosano de 1.35 g/100mL y celulosa con un valor de 1.32 g/100mL. En los tres tratamientos se observó una tendencia a aumentar la glucosa, desde el análisis inicial al compararlo con el último día de muestreo. Esto pudo ser debido al proceso de maduración, donde los azúcares aumentan como consecuencia de la degradación de polisacáridos tales como el almidón, entre otros (Arias Velázquez & Toledo Hevia, 2007).

En las naranjas tratadas y en las control, se presentó una tendencia de aumento en el contenido de glucosa, de manera similar como lo expone Albertini et al., (2006), en su investigación con naranjas de diversas variedades almacenadas por 150 días a -20 °C. El contenido de glucosa puede oscilar dependiendo de la variedad de la naranja, entre ellas se pueden encontrar valores desde 6.85 g/L a 19.82 g/L (0.685 – 1.982 g/100mL) (Sdiri et al., 2012).

5.1.8.3 Cuantificación de Fructosa

Para la cuantificación de fructosa se obtuvo un coeficiente de correlación (r^2) de 1.00, para la curva de calibración empleada. Dicha curva de calibración tuvo un límite de detección de 0.79 ppm (0.79×10^{-4} g/100mL) y un límite de cuantificación de 2.67 ppm (2.67×10^{-4} g/100mL). Los valores de los límites de detección y cuantificación de la curva de calibración de fructosa, demostraron una vez más la sensibilidad y confiabilidad del método, dado que fueron valores por debajo de la concentración de 5.0 ppm, que

corresponde al estándar de menor concentración de la curva de calibración. En la figura 3, se presenta la identificación del pico de fructosa. En los cromatogramas de las figuras 3 y 4, se destacan los tiempos de retención de 7.339 ± 0.009 minutos para los estándares usados en las curvas de calibración, y 7.340 ± 0.008 minutos para las muestras de naranjas analizadas. Para los tiempos de retención se obtuvieron desviaciones estándar relativas de 0.127 % para las curvas de calibración y 0.107 % en las muestras de naranja.

Los resultados obtenidos para la fructosa que se presentan en la tabla 10, no se observaron diferencias significativas en el tiempo inicial del almacenamiento en los tres tratamientos. En las naranjas tratadas y control no se presentó diferencia significativa a través del tiempo de almacenamiento. De manera similar a la glucosa, se observó una tendencia a aumentar la fructosa a través del tiempo, obteniéndose un contenido mayor al final del almacenamiento comparado al tiempo inicial. Este comportamiento se presentó en los tres tratamientos.

En el análisis de azúcares realizado por HPLC, se puede resaltar que las láminas comestibles de quitosano y celulosa, mantuvieron el contenido de los principales azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa en las naranjas, con respecto a las muestras control. Además, estas láminas permitieron que el comportamiento en el metabolismo fuera similar al de las muestras control.

En general, la tendencia de las naranjas tratadas y control fue de incrementar el contenido en fructosa, de la misma manera lo demuestra Albertini et al. (2006), en su

investigación con naranjas de diversas variedades almacenadas por 150 días a -20 °C. Tal como ocurre con la sacarosa y la glucosa, en la fructosa el contenido puede variar en las naranjas según sea la variedad, los valores oscilan entre 9.17 g/L y 21.82g/L (0.917 g/100mL – 2.182 g/100mL) (Sdiri et al., 2012).

El principal contenido de carbohidratos en frutas cítricas, son los tres azúcares: sacarosa, glucosa y fructosa. Estos representan cerca de un 80 % de los sólidos solubles totales en el jugo de naranja, y las relaciones de sacarosa:glucosa:fructosa son generalmente cerca de 2:1:1 (Kelebek et al., 2009). Esta relación fue similar en el presente estudio en las naranjas tratadas y control, además se mantuvo a través de tiempo.

5.1.9 Determinación de Ácidos Orgánicos por HPLC

Dentro del contenido de sólidos solubles totales en el jugo de naranja, los ácidos orgánicos contribuyen en una menor cantidad al compararlo con los carbohidratos, quienes son los mayores contribuyentes (Kelebek et al., 2009). Los ácidos orgánicos predominantes en la naranja son el ácido cítrico, el málico y el quínico (en orden descendente), además del ácido ascórbico, que es el principal componente de la vitamina C (Belitz et al., 2009). En este estudio, se cuantificaron los ácidos cítrico, málico y ascórbico por medio de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa, en el jugo de las naranjas tratadas y control. Para identificar los ácidos analizados en las naranjas, se realizó la comparación de los tiempos de retención de los estándares de los ácidos, con los tiempos de retención de los picos encontrados en los cromatogramas de las muestras. La cuantificación de los ácidos málico y ascórbico se

realizó mediante curvas de calibración cuyas concentraciones van de 5.00 ppm a 100 ppm. En cuanto al ácido cítrico, se empleó una curva de calibración con concentraciones de 100 ppm a 700 ppm.

5.1.9.1 Cuantificación de ácido cítrico

En la cuantificación del ácido cítrico se empleó el método de curva de calibración, para las cuales se determinó un coeficiente de correlación (R^2) de 0.999. Los límites de detección y cuantificación determinados para las curvas de calibración del ácido cítrico fueron de 11.1 ppm (1.11×10^{-3} g/100mL) y 37.2 ppm (3.72×10^{-3} g/100mL), respectivamente. Las concentraciones en las curvas de calibración fueron de 100 ppm a 700 ppm, es decir, que los límites de cuantificación están por debajo de la concentración del estándar menos concentrado. Las concentraciones de las muestras presentadas en la tabla 9, también se encuentran por encima de los límites de detección y cuantificación, proporcionando confiabilidad el método. Para realizar la cuantificación del ácido cítrico es indispensable identificar el pico correspondiente a dicho ácido. La identificación se hizo por medio de la comparación de los tiempos de retención del estándar del ácido con las muestras. En las figuras 7 y 8, se observan los cromatogramas que corresponden al estándar de ácido cítrico y a las muestras con lámina comestible de celulosa y quitosano y muestra control. En las muestras se observó un pico que aparece en 11.518 ± 0.097 minutos y en el estándar aparece el pico del ácido cítrico en 11.468 ± 0.073 minutos. El método HPLC proporciona una alta sensibilidad y confiabilidad debido a la alta reproducibilidad entre inyecciones, reflejándose en las desviaciones estándar relativas de 0.637 % y 0.838 % para las curvas de calibración y muestras respectivamente.

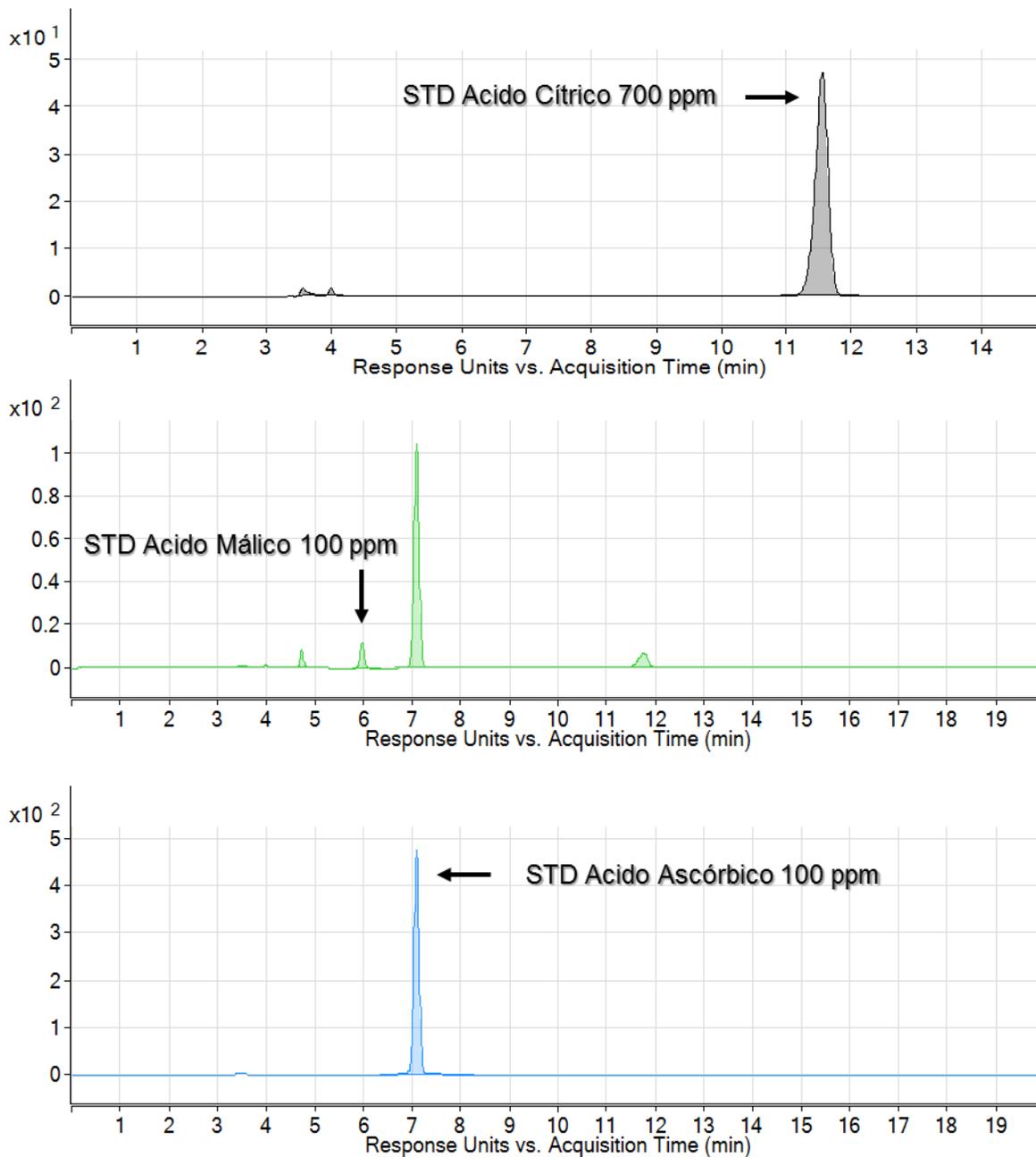


Figura 7. Cromatogramas de estándares de ácidos orgánicos (STD): Ácido Cítrico (210 nm), Acido Málico (210 nm) y Ácido Ascórbico (250 nm)

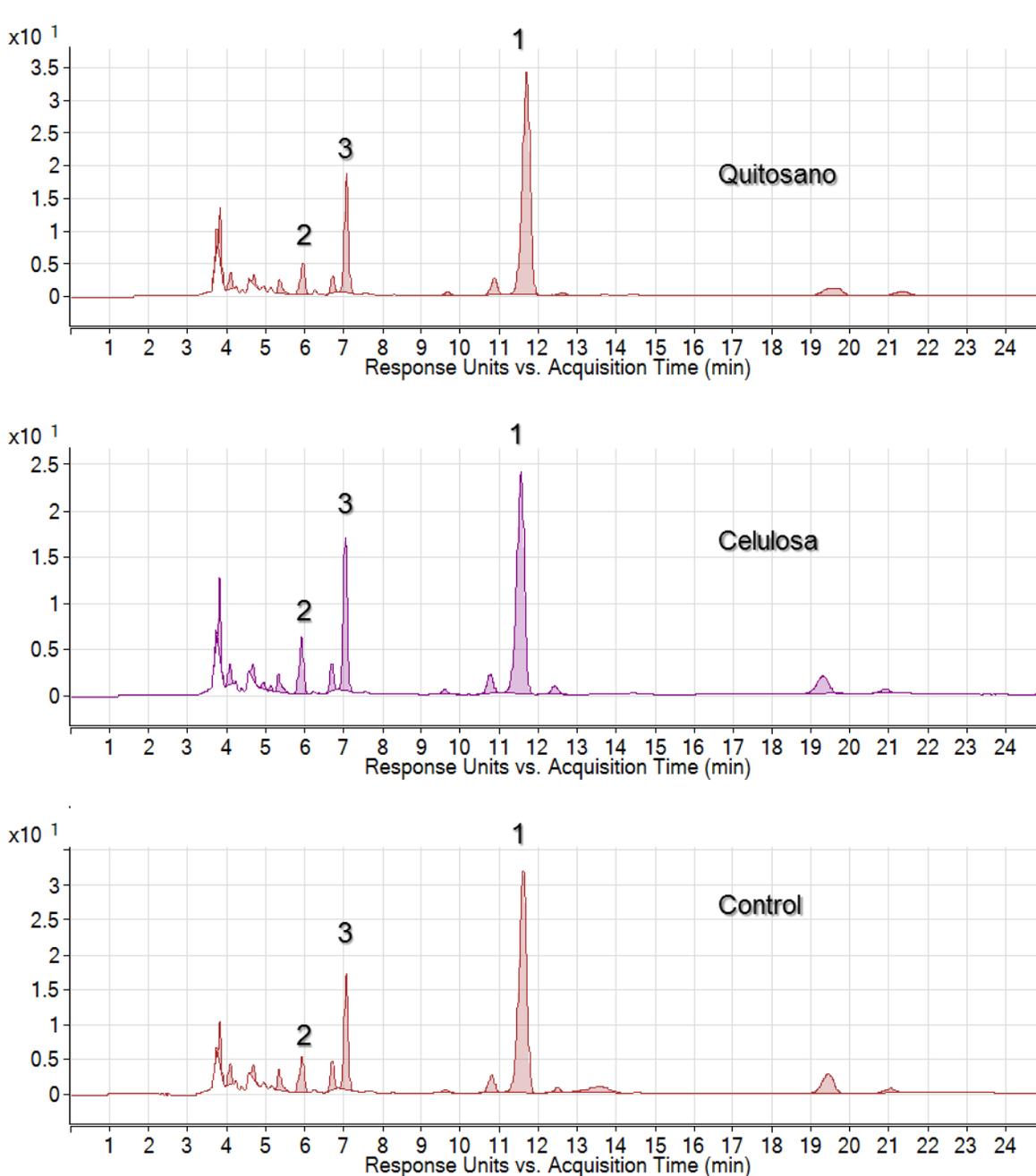


Figura 8. Cromatogramas de muestras de naranjas tratadas con quitosano, celulosa y control a 210 nm de longitud de onda. Ácido Cítrico (1), Acido Málico (2) y Ácido Ascórbico (3)

La concentración de ácido cítrico en las naranjas tratadas y control se presentan en la tabla 11. En el jugo de las naranjas con las láminas comestibles de celulosa y quitosano no se encontró diferencia significativa en el contenido de ácido cítrico en el transcurso

del tiempo en el almacenamiento. Este comportamiento fue comparable con el de las muestras control, donde no hubo diferencia significativa en su concentración en el almacenamiento. Sin embargo, si se encontró diferencia significativa entre las muestras con láminas y el control, que puede ser debido a que iniciaron con concentraciones diferentes del ácido en mención por proceder de lotes independientes. En cuanto, a la tendencia en el comportamiento a través del tiempo, se observó que los jugos de naranjas tratadas con las láminas comestibles tienden a aumentar, mientras que en las muestras control disminuyen.

Tabla 11. Concentración de ácidos orgánicos en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

ACIDO	TRATAMIENTO	Concentración de Ácidos Orgánicos en naranjas sin cáscara (g/100mL)		
		1	2	3
ACIDO CITRICO	Quitosano	0.946 ± 0.22 ^{bc}	1.026 ± 0.108 ^{abc}	1.093 ± 0.042 ^{abc}
	Celulosa	0.802 ± 0.104 ^c	0.859 ± 0.197 ^c	0.979 ± 0.174 ^{bc}
	Control	1.373 ± 0.027 ^a	1.291 ± 0.165 ^{ab}	1.302 ± 0.037 ^{ab}
ACIDO MALICO	Quitosano	0.143 ± 0.009 ^a	0.142 ± 0.019 ^a	0.149 ± 0.007 ^a
	Celulosa	0.168 ± 0.012 ^a	0.158 ± 0.017 ^a	0.165 ± 0.010 ^a
	Control	0.161 ± 0.019 ^a	0.169 ± 0.027 ^a	0.169 ± 0.008 ^a
ACIDO ASCORBICO	Quitosano	0.052 ± 0.002 ^{ab}	0.052 ± 0.002 ^{ab}	0.046 ± 0.005 ^{bc}
	Celulosa	0.045 ± 0.003 ^{bc}	0.047 ± 0.000 ^{bc}	0.041 ± 0.003 ^c
	Control	0.054 ± 0.003 ^{ab}	0.057 ± 0.005 ^a	0.058 ± 0.006 ^a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

La estadística se realizó para cada ácido orgánico independientemente

De acuerdo a otras investigaciones, el ácido cítrico es el ácido que se encuentra en mayor cantidad en naranjas frescas y almacenadas durante 150 días a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Albertini et al., 2006). El ácido cítrico se encontró en mayor cantidad en el jugo de la naranja con un valor de 12.66 g/L (1.266 g/100mL) en variedad Kozan (Kelebek et al., 2009). Sin embargo, el contenido de ácido cítrico puede cambiar entre variedades de naranjas, que

oscilan entre 13.26 g/L a 16.91 g/L (1.326 a 1.691 g/100mL), siendo el principal ácido en dicho fruto (Sdiri et al., 2012). El ácido cítrico se encontró en mayor cantidad en el jugo de la naranja con un valor de 1.0 % en naranjas valencia frescas y 1.1 % en naranjas valencia almacenadas por 2 semanas a 15.5 °C (Nisperos Carriedo, Buslig, & Shaw, 1992).

5.1.9.2 Cuantificación de ácido málico

En la cuantificación del ácido málico se obtuvo un coeficiente de correlación (R^2) para las curvas de calibración de 0.992. En dichas curvas, se tuvo como resultado un límite de detección de 1.74 ppm (1.74×10^{-4} g/100mL) y un límite de cuantificación de 4.81 ppm (4.81×10^{-4} g/100mL). Los valores de los límites de detección y cuantificación representan los valores de concentración más bajos que podrán ser detectado y cuantificados por el método. Por tanto, al ser comparados con el estándar más bajo de las curvas de calibración que es de 5.00 ppm y las concentraciones de las muestras de la tabla 9, se destaca que están por encima de dichos límites, representando confiabilidad en el método. En los cromatogramas de las figuras 5 y 6, se observan el tiempo de retención correspondiente al ácido málico, de 5.931 ± 0.026 minutos para las curvas de calibración y de 5.910 ± 0.018 minutos en las muestras de naranjas. La desviación estándar relativa para los tiempos de retención de las curvas de calibración y las muestras son de 0.442 % y 0.302 %, respectivamente.

El contenido de ácido málico que se resume en la tabla 11, se observa que no hubo diferencia significativa en el tiempo inicial en las muestras tratadas y control. Conforme

indica el análisis estadístico, no se presentaron diferencias significativas en el transcurso del tiempo en los tres tratamientos. Esta tendencia constante, es por la variedad de la naranja (Valencia) que se caracteriza por no ser muy ácida con respecto a otras variedades de naranja, tal como lo expresa Albertini et al. (2006), en su investigación. Este comportamiento indica que las láminas de quitosano y celulosa no afectaron el contenido de ácido málico en las naranjas, al ser comparadas con el control.

El ácido málico se encuentra en gran cantidad después del ácido cítrico en las naranjas tal como lo demuestran otros investigadores (Albertini et al., 2006; Kelebek et al., 2009; Nisperos Carriedo et al., 1992; Sdiri et al., 2012). Albertini et al. (2006) en su investigación demostró que el ácido málico no presenta diferencia significativa en naranjas frescas y almacenadas durante 150 días a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. El ácido málico se encontró en el jugo de naranja con un valor de 1.06 g/L (0.106 g/100 mL) en la variedad Kozan (Kelebek et al., 2009). El contenido de ácido málico puede oscilar entre 3.84 a 8.18 g/L (0.384 a 0.818 g/100mL) en diferentes variedades de naranjas (Sdiri et al., 2012). El ácido málico se encontró en el jugo de naranja con un valor de 0.1 % en naranjas valencia frescas y 0.1 % en naranjas valencia almacenadas por 2 semanas a $15.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Nisperos Carriedo et al., 1992)

5.1.9.3 Cuantificación de ácido ascórbico

Para cuantificar el ácido ascórbico en el jugo de naranja se usó el método de curva de calibración, en la cual se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.991. Los límites de detección y cuantificación correspondientes a las curvas de calibración del ácido ascórbico son de 2.72 ppm (2.72×10^{-4} g/100mL) y 4.05 ppm (4.05×10^{-4} g/100mL),

respectivamente. De la misma manera que con los anteriores ácidos mencionados, se realizó la identificación del pico correspondiente al ácido ascórbico, mediante la comparación con el tiempo de retención del pico del estándar. El tiempo de retención en el que eluyó el ácido ascórbico en el estándar fue de 7.060 ± 0.027 minutos y en las muestras se presentó un pico en 7.034 ± 0.020 minutos (ver figuras 7 y 9). Las desviaciones relativas de los tiempos de retención en las curvas de calibración y en las muestras son de 0.389 % y .281 %, respectivamente. Con estos porcentajes se puede verificar, la alta reproducibilidad de los resultados entre inyecciones.

El contenido de ácido ascórbico del jugo de las naranjas tratadas y control almacenadas a 14.0 °C, se observan en la tabla 11. Las naranjas con quitosano no presentaron diferencias significativas en el transcurso del tiempo de almacenamiento. De la misma manera ocurrió en las muestras con lámina comestible basada en celulosa y estas a su vez coinciden con las muestras control. Sin embargo, se presentaron diferencias significativas entre los tres tratamientos, debido a la variabilidad entre frutos y lotes. Las naranjas cubiertas con láminas comestibles tanto de quitosano como de celulosa presentaron una tendencia a disminuir la concentración de ácido ascórbico durante el almacenamiento. Donde las muestras con celulosa mostraron una concentración inicial de ácido ascórbico de 0.045 g/100mL y en el día 15 presentaron una concentración de 0.041 g/10mL. Las muestras con quitosano presentaron una concentración inicial de 0.052 g/100g y terminó con una concentración de 0.046 g/100mL. En las naranjas control ocurrió lo contrario, la tendencia fue un aumento durante el almacenamiento, comenzando con 0.054 g/100mL y terminando con una concentración de 0.058 g/100mL.

El contenido de ácido ascórbico es comparable con lo reportado por Kelebek et al. (2009), de 0.49 ± 0.01 g/L (0.049 g/100mL) en naranjas Kozan.

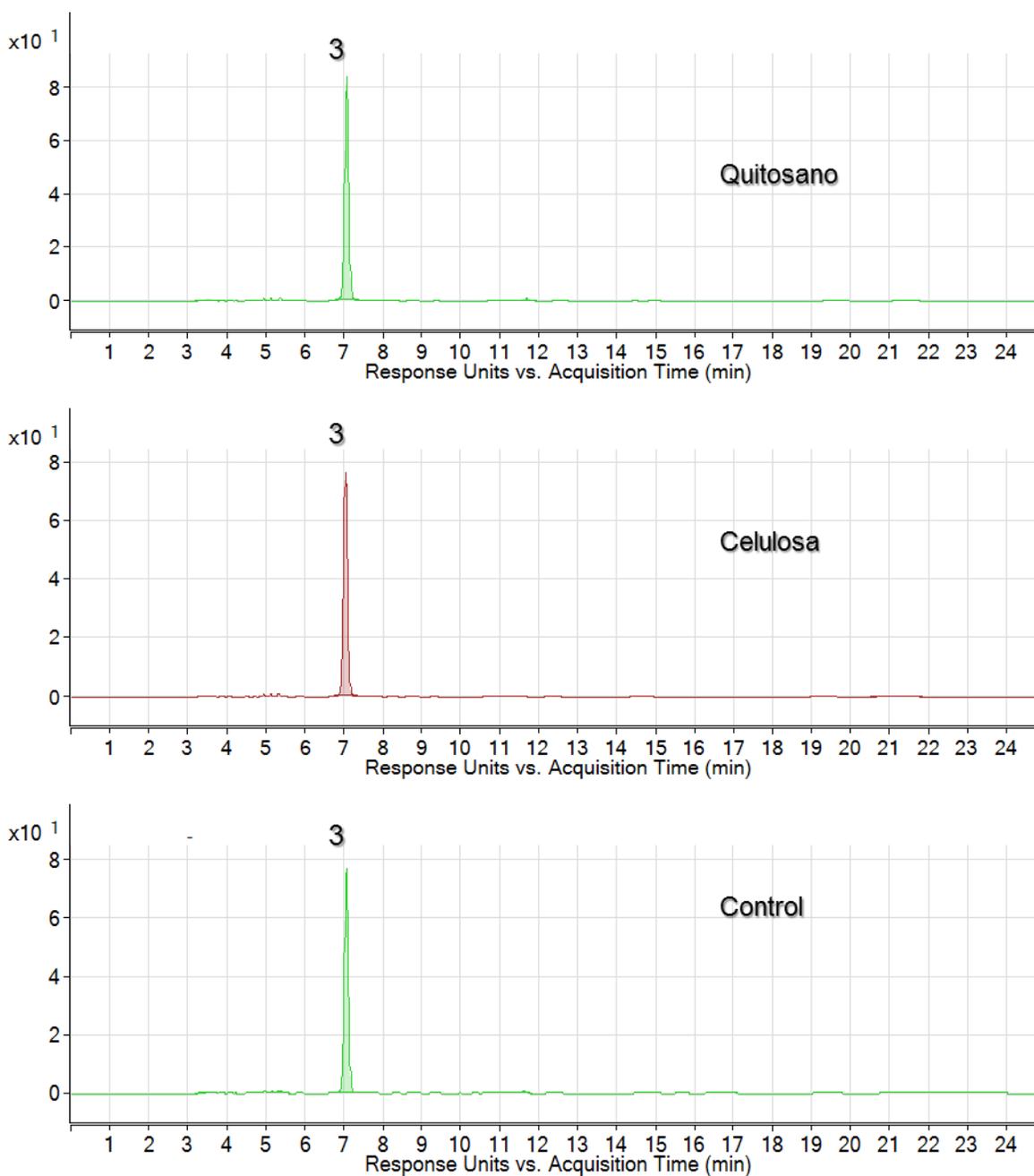


Figura 9. Cromatogramas de muestras de naranjas tratadas con quitosano, celulosa y control a 250 nm de longitud de onda. Ácido Ascórbico (3).

La composición de la atmósfera es principalmente importante con respecto al contenido de humedad y oxígeno. Los daños como consecuencia de una pequeña cantidad de oxígeno residual a veces se hacen evidentes durante el almacenamiento del producto (Fennema, 1996). Adicionalmente, el ácido ascórbico es inestable (que se destruye significativamente) en medio alcalino o neutro, en presencia de aire u oxígeno, luz y calor, sin embargo es estable en medio ácido (Fennema, 1996; Nováková, Solich, & Solichová, 2008). Por todos estos factores el ácido ascórbico, es fácilmente oxidado a ácido dehidroascórbico, motivo por el cual se presenta una disminución en la cuantificación del mismo, como se observa en la tabla 11.

Al comparar los resultados obtenidos de vitamina C en la tabla 9, con respecto a los resultados de la cuantificación de ácido ascórbico de la tabla 11, se observaron tendencias opuestas. En la determinación de ácido ascórbico por HPLC (tabla 9) se observó que va disminuyendo en el transcurso del tiempo, ya que sólo se tiene en consideración este ácido, que por factores anteriormente mencionados se pierde. Mientras que en la determinación de vitamina C por titulación (tabla 9), se da una tendencia casi constante a través del tiempo, debido a que se tiene en consideración los dos ácidos principales que se encuentran activos en la vitamina C (el ácido ascórbico y dehidroascórbico). Basándose en los resultados de estas dos técnicas, se puede destacar la importancia de las láminas comestibles, que ayudaron a mantener las características alimenticias de las naranjas, al evitar pérdidas significativas de vitamina C durante el almacenamiento.

Los valores encontrados de ácido ascórbico son comparables con los reportados por Nisperos Carriedo et al. (1992), en su estudio de naranjas valencia almacenadas por 2 semanas a 15.5 °C que va de 60.6 a 63.4 mg/100g (0.606 – 0.634 g/100g). Sin embargo, estos están un poco por encima de los encontrados en la validación de un método por HPLC de determinación simultánea de ácidos orgánicos en algunos frutos, que fue de 43.13 mg/100g (0.04313 g/100g) en jugo de naranja sin cáscara por Scherer et al. (2012).

5.2 Análisis Microbiológico

5.2.1 Recuento de bacterias aerobias

Los recuentos de bacterias aerobias (PCA) en las naranjas tratadas con láminas comestibles y control presentaron diferencias significativas entre tratamientos y a través del tiempo, tal como se muestra en la tabla 12. La tendencia en los tres tratamientos fue un aumento en el recuento bacteriano a medida que transcurría el tiempo de almacenamiento.

Tabla 12. Recuentos de bacterias aerobias en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

MUESTREO	PCA log ₁₀ CFU/g		
	Quitosano	Celulosa	Control
1	2.78 ± 0.10 ^h	5.63 ± 0.28 ^g	6.31 ± 0.65 ^{fg}
2	3.28 ± 0.56 ^h	6.93 ± 0.07 ^{def}	7.51 ± 0.28 ^{cde}
3	6.89 ± 0.21 ^{def}	8.15 ± 0.15 ^{abc}	8.81 ± 0.31 ^{ab}
4	6.70 ± 0.59 ^{efg}	8.66 ± 0.25 ^{ab}	7.84 ± 0.70 ^{bcde}
5	7.88 ± 0.39 ^{bcd}	9.04 ± 0.21 ^a	nd
6	nd	8.13 ± 0.16 ^{abc}	nd

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p>0.05)

CFU = Colony Forming Units (unidades formadoras de colonias)

PCA = Plate Count Agar

Los resultados son expresados como media ± desviación estándar

El conteo de bacterias aerobias en las naranjas con la lámina de quitosano, presentó un incremento a través del tiempo iniciando en 2.78 CFU/g en el día 0, hasta 7.88 CFU/g en el día 12 de almacenamiento. En las naranjas con lámina a base de celulosa, también se presentó un incremento en el conteo bacteriano que fue de 5.63 CFU/g en el muestreo inicial a 8.13 CFU/g en el día 12 de almacenamiento. A pesar del aumento en el conteo, se puede destacar la actividad antimicrobiana de las láminas, ya que al recibir las naranjas sin cáscara se realizó un conteo de 5.85 CFU/g y 7.33 CFU/g para las naranjas empleadas para recubrir con quitosano y celulosa, respectivamente. El efecto de las láminas sobre las naranjas sin cáscara fue el de una eliminación de bacterias de 3 log para el quitosano y 2 log para la celulosa. Esta acción antibacteriana del quitosano y de la celulosa permite extender el tiempo de vida del producto.

Al comparar los resultados de la tabla 12 de las láminas, se observa que el quitosano ayudó a evitar un crecimiento bacteriano mayor que el de celulosa hasta el día 12 de almacenamiento, donde el quitosano llegó a 7.88 CFU/g y la celulosa a 9.04 CFU/g. La actividad antibacteriana de la celulosa pudo verse afectada por iniciar con una carga tan alta desde el momento que fueron recibidas las naranjas, por lo que su efectividad disminuyó. A pesar del crecimiento bacteriano en las naranjas con la lámina de quitosano, se puede destacar que la lámina ayudó a proteger el producto con respecto al control, donde al día 5 llegó a 7.84 CFU/g, mientras que la lámina con quitosano llegó a 7.88 CFU/g en el día 12 de almacenamiento, correspondiente a casi el doble en días de duración.

El quitosano ha llamado la atención como un conservante potencial de alimentos de origen natural, debido a su actividad antimicrobiana frente a una amplia gama de hongos filamentosos, levaduras y bacterias transmitidas por los alimentos. El mecanismo de la actividad antimicrobiana del quitosano aún no ha sido completamente dilucidado, pero se han propuesto varias hipótesis. La hipótesis más factible es un cambio en la permeabilidad celular debido a las interacciones entre las moléculas positivamente cargadas de quitosano y las membranas celulares microbianas cargadas negativamente (No et al., 2007). El quitosano es insoluble en agua y altamente soluble en ácidos por debajo de pH 6.0 (Shiekh, Malik, Ahmed Al-Thabaiti, & Shiekh, 2013), y según sea el propósito del uso del quitosano, se escoge el ácido a emplear. En el estudio realizado por Zhong, Song, & Li (2011) se demostró que el ácido acético como solución para preparar la lámina de quitosano, presentó una mayor inhibición de crecimiento de algunos patógenos, al ser comparado con los ácidos láctico y málico. Estos autores concluyen que el ácido acético presentó mejores propiedades mecánicas, solubilidad y evitó pérdida de color natural del fruto y flexibilidad.

El recuento bacteriano en las naranjas con celulosa fue un poco menor que con quitosano, donde se incrementó aproximadamente en 2 log respecto a 5 log con el quitosano hasta el día 12 de almacenamiento. El principal componente al cual se le atribuye el efecto bactericida es el sorbato de potasio, tal como se demostró en el estudio realizado por Buitrago (2013), donde comparó la celulosa sin sorbato de potasio y la celulosa con sorbato de potasio como aditivo. El resultado obtenido del estudio reveló un bajo recuento de bacterias aerobias en la lámina de celulosa con sorbato de potasio, que

fue de 4.31 CFU/g, respecto a 5.31 CFU/g sin sorbato, en naranjas sin cáscara almacenadas por 28 días a 4 ± 0.5 °C.

De los resultados obtenidos en la tabla 12, cabe destacar el poder bacteriostático de las láminas comestibles de quitosano y celulosa. Además de este efecto, se puede decir que la lámina de quitosano posee características bactericidas un poco mayores que la lámina de celulosa, ya que hubo una disminución bacteriana al aplicar la lámina después de recibidas las naranjas sin cáscara.

5.2.2 Recuento de mohos y levaduras

El recuento de mohos y levaduras para las naranjas tratadas con quitosano y celulosa y las muestras control presentaron diferencias significativas entre tratamientos y a través del tiempo de almacenamiento (ver tabla 13). En los tres tratamientos la tendencia fue de aumentar el conteo para hongos.

Tabla 13. Recuentos de mohos y levaduras en naranjas sin cáscara a través del tiempo con respecto al tratamiento.

MUESTREO	PDA \log_{10} CFU/g		
	Quitosano	Celulosa	Control
1	2.21 ± 0.32 ^g	4.24 ± 0.12 ^{ef}	5.39 ± 0.79 ^{cde}
2	3.36 ± 0.97 ^{fg}	4.68 ± 0.32 ^{def}	6.62 ± 0.44 ^{abc}
3	6.85 ± 0.32 ^{ab}	5.72 ± 0.44 ^{bcd}	7.23 ± 0.16 ^a
4	6.69 ± 0.66 ^{abc}	6.60 ± 0.34 ^{abc}	7.73 ± 0.22 ^a
5	7.99 ± 0.48 ^a	7.11 ± 0.45 ^{ab}	nd
6	nd	6.79 ± 0.43 ^{abc}	nd

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

CFU = Colony Forming Units (unidades formadoras de colonias)

PDA = Potato Dextrose Agar

Los resultados son expresados como media \pm desviación estándar

El recuento de mohos y levaduras en las naranjas con quitosano aumentan en el transcurso del tiempo de almacenamiento de 2.21 CFU/g en el día inicial hasta llegar a 7.99 CFU/g al día 12 de almacenamiento. Este incremento equivale aproximadamente a 5 log, en 12 días de almacenamiento. A pesar de este aumento en el conteo de mohos y levaduras con el quitosano, se pudo observar que la lámina ayudó a prevenir dicho crecimiento en menos días, es decir, que mantuvo la calidad microbiana por más tiempo. Este efecto se observó con respecto al control, donde se obtuvo un valor de 7.73 CFU/g al quinto día de almacenamiento, un conteo similar al del quitosano, pero en menos días.

El efecto del quitosano como lámina comestible en fresas almacenadas a 13 °C, presentó muy buenos resultados como tratamiento poscosecha, evitando que se infecten las fresas con *Botrytis cinérea*, donde fueron sumergidas, previo a ser recubiertas con quitosano (El Ghaouth, Arul, Ponnampalam, & Boulet, 1991). También, se ha demostrado la efectividad del quitosano al 1 % en ácido acético, en fresas almacenadas a 10 °C por 6 días, para prevenir el daño poscosecha con respecto al control, con un porcentaje de fresas infectadas del 10 % contra 30 % a los 6 días de almacenamiento. Esta capacidad de inhibir el crecimiento de hongos proporciona una extensión en el tiempo de vida del producto. (Hernandez-Muñoz, Almenar, Del Valle, Velez, & Gavara, 2008). En otro estudio, el quitosano inhibió significativamente el crecimiento micelial de *A. kikuchiana* y *P. piricola* en peras, así como la germinación de esporas. El efecto inhibitorio del quitosano sobre el crecimiento fúngico fue dependiente de la concentración aplicada del quitosano en ácido (Meng, Yang, Kennedy, & Tian, 2010).

En estudios previos se encontró que las características de las películas de quitosano se vieron afectadas por los tipos de ácidos orgánicos utilizados como disolvente y la presencia de glicerol como plastificante. El estudio destacó que los ácidos láctico y málico inhiben el crecimiento bacteriano con mayor eficacia que el ácido acético. Sin embargo, el ácido acético es el único que sirvió como antifúngico con respecto a los otros dos ácidos. El glicerol no afectó el poder antimicrobiano en la lámina. Por tal motivo, se destaca que cuando todos los microorganismos son un factor importante en la preservación del producto alimenticio, se debe usar ácido acético como disolvente. (Adila, Suyatma, Firlieyanti, & Bujang, 2013), tal como se empleó en el presente estudio.

La celulosa también tuvo un incremento en el crecimiento de hongos durante el tiempo de almacenamiento. Este inició con 4.24 CFU/g y el recuento al día 15 de almacenamiento se obtuvo 6.79 CFU/g, correspondiente a 2 log. De manera similar al efecto ocurrido con el quitosano, la celulosa también ayudó a evitar un crecimiento de hongos en menor tiempo respecto a lo ocurrido con el control que fue de 7.73 CFU/g a los 5 días de almacenamiento. En estudios recientes se verificó un comportamiento similar, donde se compara el efecto del sorbato de potasio en la lámina de celulosa, sobre naranjas sin cáscara almacenadas a 4 ± 0.5 °C por 28 días. En dicho estudio se obtuvo un recuento de hongos de 4.94 CFU/g para la lámina de celulosa y 3.45 CFU/g para la lámina de celulosa con sorbato de potasio (Buitrago Florez, 2013). Lo que demuestra el efecto antifúngico que presenta el sorbato de potasio dentro de la lámina comestible.

Se han estudiado nuevas láminas comestibles compuestas de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) que contienen sustancias químicas de baja toxicidad con propiedades antifúngicas. Los productos químicos probados fueron principalmente sales de ácidos orgánicos, sales de parabenos y sales minerales, clasificados como aditivos alimentarios o generalmente reconocidos como compuestos seguros (GRAS). Se evaluó in vitro su actividad antifúngica contra *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, los patógenos poscosecha más importantes de los frutos cítricos frescos. También se encontró que el sorbato de potasio fue la sal de ácidos orgánicos que mejor funcionó como antifúngico en la lámina de celulosa (Valencia-chamorro, Palou, Del Rio, & Pérez-Gago, 2008). La efectividad del sorbato de potasio mejora al combinarla con calor para inhibir el crecimiento de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* (moho verde y moho azul). Además, su acción se puede ver influenciada por el pH, donde actúa mejor a bajos pH, tales como de 3 a 6.5, ya que inhibe algunas enzimas involucradas en el crecimiento de microorganismos (Montesinos-Herrero, del Río, Pastor, Brunetti, & Palou, 2009).

Al comparar el recuento de mohos y levaduras del quitosano con la celulosa, se obtuvo que el quitosano aumentó de 2.21 CFU/g a 7.99 CFU/g y la celulosa de 4.24 CFU/g a 7.11 CFU/g a los 12 días de almacenamiento. Este incremento en el conteo de hongos corresponde a aproximadamente 5 log para el quitosano y 3 log para la celulosa, durante 12 días de almacenamiento. El crecimiento de hongos puede deberse a la carga microbiana tan alta con la cual iniciaron y más aún con la que fueron recibidas. A pesar del alto conteo de hongos, se puede destacar el efecto antifúngico que tienen estas dos láminas comestibles, ya que las naranjas utilizadas para cubrir con quitosano se

recibieron con 5.30 CFU/g y las naranjas usadas para cubrir con celulosa 5.79 CFU/g. Al aplicar las láminas a las naranjas, se notó una disminución de 3 log con el quitosano y 1 log con la celulosa. Los resultados obtenidos demuestran que el quitosano y la celulosa poseen un efecto fungistático y así aumentan el largo de vida de las naranjas sin cáscara. Adicionalmente, se observó un efecto fungicida mayormente en el quitosano que, en la celulosa, debido a la disminución de hongos al aplicar la lámina sobre las naranjas sin cáscara.

5.3 Apariencia

De acuerdo a las observaciones de las naranjas almacenadas a 14.0 °C, se encontró que las naranjas con láminas comestibles duraron más tiempo con respecto al control. Las naranjas con el tiempo presentaban un poco de resequeidad y arrugamiento. Al pasar el tiempo se observó presencia de hongos en la parte superficial. La aparición de hongos inició en la zona peduncular principalmente. La mayoría de las naranjas con quitosano se observaron con mala calidad en el día 12. Mientras que las naranjas con celulosa presentaron mejor apariencia, descartándolas en el día 15 de almacenamiento. Las naranjas control, se eliminaron a los 5 días, ya que se encontraban muy deterioradas físicamente. A pesar del deterioro de las naranjas con láminas comestibles, se puede resaltar que su duración duplicó y triplicó el tiempo con respecto a las naranjas control. Además, el tipo de deterioro se notó más significativo en las naranjas control que en las que se encontraban recubiertas con las láminas comestibles.

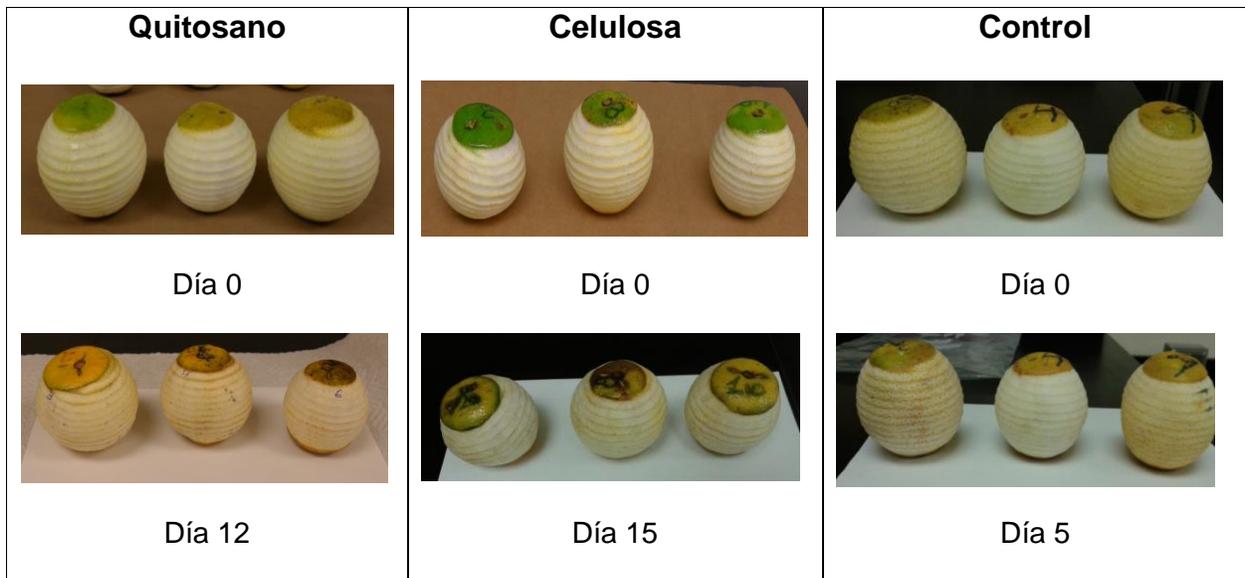


Figura 10. Imágenes de naranjas tratadas con láminas comestibles de quitosano y celulosa y control, en los tiempos iniciales y finales.

6. CONCLUSIONES

- Las láminas comestibles no afectaron significativamente las características químicas y físicas tales como: pH, °Brix, firmeza, color, acidez titulable y vitamina C, de las naranjas durante el almacenamiento a 14.0 ± 1.0 °C.
- Las naranjas con láminas comestibles de Celulosa modificada (HPMC+SP) y Quitosano presentaron una menor pérdida de humedad en comparación con las naranjas control.
- Las láminas comestibles de Celulosa modificada (HPMC+SP) y Quitosano proporcionaron firmeza a la superficie de las naranjas sin cáscara, dando flexibilidad y protección contra el ablandamiento debido a la deshidratación excesiva del fruto.
- Las láminas comestibles de celulosa y quitosano suministraron protección de barrera a las naranjas sin cáscara, ya que evitaron lesiones externas que aumentan la sensibilidad a los daños mecánicos y al ataque fúngico.
- Las naranjas sin cáscara con lámina comestible de quitosano duraron 12 días en almacenamiento a 14.0 ± 1.0 °C, mientras que las naranjas con celulosa modificada (HPMC+SP) duraron 15 días en las mismas condiciones de almacenamiento.
- La lámina comestible de celulosa (HPMC+SP) presentó mejores características, con respecto a la lámina de quitosano y control, ya que las naranjas tratadas con este tratamiento duraron más tiempo con buena apariencia y los recuentos de bacterias aerobias y hongos (mohos y levaduras) tendieron a ser menores.

- Las láminas comestibles presentaron características bacteriostáticas y fungistáticas, sobre las naranjas sin cáscara, además, funcionaron como bactericidas y fungicidas, debido a que disminuyeron el conteo microbiano al aplicarse dichas láminas.
- La lámina que exhibió mayor inhibición en el crecimiento de microorganismos fue la de la lámina a base de Celulosa modificada (HPMC + SP), en el transcurso del tiempo de almacenamiento.

7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda ensayar el uso de otros ácidos orgánicos para la preparación del quitosano y el efecto que puedan tener sobre el conteo microbiológico en el transcurso del tiempo de almacenamiento en las naranjas sin cáscara.
- Se recomienda evaluar la adición de otros preservativos, y el efecto de estos en las características químicas y sensoriales de las frutas y reducir el tiempo de secado de la película mediante una corriente de aire estéril.
- Se recomienda realizar un estudio similar con las láminas de quitosano y celulosa modificada (hidroxipropilmetilcelulosa), con un aceite esencial como aditivo y simultáneamente una lámina comestible conformada por una mezcla de quitosano y celulosa modificada, con un aditivo como aceite esencial.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adila, S. N., Suyatma, N. E., Firlieyanti, A. S., & Bujang, A. (2013). Antimicrobial and Physical Properties of Chitosan Film as Affected by Solvent Types and Glycerol as Plasticizer. *Advanced Materials Research*, 748(April 2015), 155–159. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.748.155>
- Albertini, M. V., Carcouet, E., Pailly, O., Gambotti, C., Luro, F., & Berti, L. (2006). Changes in organic acids and sugars during early stages of development of acidic and acidless citrus fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(21), 8335–8339. <https://doi.org/10.1021/jf061648j>
- Alvarez Quintero, R. M. (2012). *Formulación de un recubrimiento comestible para frutas cítricas, estudio de su impacto mediante aproximación metabólica y evaluación de la calidad poscosecha*. Universidad de Antioquia.
- Arias Velázquez, C. J., & Toledo Hevia, J. (2007). Manual de manejo poscosecha de frutas Tropicales (Papaya, piña, plátano, cítricos). *Organización de Las Naciones Unidas Para La Agricultura Y La Alimentación (FAO)*, 1, 50.
- Barrera Bello, E., Gil Loaiza, M., García Pajón, C. M., Durango Restrepo, D. L., & Gil González, J. H. (2012). Empleo de un Recubrimiento Formulado con Propóleos para el Manejo Poscosecha de Frutos de Papaya (Carica papaya L. cv. Hawaiana). *Facultad Nacional Agraria de Medellín*, 65(1), 6497–6506.
- Belitz, H.-D., Grosch, W., & Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry* (4th ed.). Berlín: Springer.
- Buitrago Florez, L. A. (2013). *Utilización de películas comestibles para extender el largo de vida útil de naranjas (Citrus sinensis) frescas peladas*. Universidad de Puerto Rico - Recinto Universitario de Mayaguez.
- Burdock, G. A. (2007). Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology*, 45(12), 2341–2351. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.07.011>
- Cagru, A., Ustunol, Z., & Ryser, E. (2004). Antimicrobial Edible Films and Coatings..pdf. *Journal of Food Protection*, 67(4), 833–848.
- Campos, C. A., Gerschenson, L. N., & Flores, S. K. (2010). Development of Edible Films and Coatings with Antimicrobial Activity. *Food and Bioprocess Technology*, 4(6), 849–875. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0434-1>
- Cano, A., Medina, A., & Bermejo, A. (2008). Bioactive compounds in different citrus varieties. Discrimination among cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(5), 377–381. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.03.005>
- Cocco, M., Almiton, N., & Meier, G. (2016). Alternativas a los fungicidas de síntesis para el control de Geotrichum citri-aurantii y Penicillium digitatum en poscosecha de naranjas y mandarinas. *Poscosecha de Frutos Cítricos*, 770, 16–22.
- Contreras Oliva, A. (2010). *EFFECTO DE TRATAMIENTOS POSCOSECHA NOVEDOSOS EN LA CALIDAD FÍSICOQUÍMICA, SENSORIAL Y NUTRICIONAL DE CÍTRICOS*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2011). InfoStat. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba.

- Domene Ruiz, M. A., & Segura Rodriguez, M. (2014a). Parámetros de calidad externa en la industria agroalimentaria. *Cajamar ADN Agro*, 3, 1–12.
- Domene Ruiz, M. A., & Segura Rodriguez, M. (2014b). Parámetros de calidad interna de hortalizas y frutas en la industria agroalimentaria. *Cajamar ADN Agro*, 5, 1–18.
- Dongxiu, H., Yang, S., Yuehui, W., Guozhu, L., Bo, C., & Shouzhuo, Y. (2011). Simultaneous flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Chemistry*, 127, 880–885.
- Du, W., Avena, R., Hua, S., & McHugh, T. (2011). Antimicrobial volatile essential oils in edible films for food safety. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2, 1124–1134.
- Dutta, P. K., Duta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 63(1), 20–31. <https://doi.org/10.1002/chin.200727270>
- El Ghaouth, A., Arul, J., Ponnampalam, R., & Boulet, M. (1991). Chitosan Coating Effect on Storability and Quality of Fresh Strawberries. *Journal of Food Science*, 56(6), 1618–1620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1991.tb08655.x>
- Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry* (Third edit). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Harris, D. C. (2010). *Quantitative Chemical Analysis* (Eighth Edi). New York: W.H. Freeman and Company.
- Hernandez-Muñoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D., & Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110(2), 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.02.020>
- Imran, M., El-fahmy, S., Desobry, S., & Revol- Junelles, A.-M. (2010). Cellulose derivative based active coatings : Effects of nisin and plasticizer on physico-chemical and antimicrobial properties of hydroxypropyl methylcellulose films. *Carbohydrate Polymers*, 81, 219–225. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.02.021>
- Kays, S. J., & Paull, R. E. (2004). *Postharvest Biology* (First Edit). Athens, Georgia. United States: Exon Press.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., & Cabaroglu, T. (2009). HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, 91(2), 187–192. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2008.10.008>
- Lasallista, C. U. (2012). *Cítricos: cultivo, poscosecha e industrialización. Serie Lasallista Investigación y Ciencia*. Colombia: Editorial Artes y Letras S.A.S.
- Materano, W., Valera, A., Zambrano, J., Maffei, M., & Torres, C. (2007). Efecto de recubrimientos sobre la poscosecha y la evolución del color del zumo de la fruta del naranjo. *Agronomía Tropical*, 57(2), 1–9.
- Mathias-Rettig, K. ., & Ah-Hen, K. (2014). El color en los alimentos un criterio de calidad medible Color. *AgroSur. Universidad Austral de Chile*, 42(2), 39–48. <https://doi.org/10.4206/agrosur.2014.v42n2-07>
- Mcguire, R. G. (1992). Reporting of Objective Color Measurements. *Hort Science*, 27(12), 1254–1255.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R. J., & Du, W.-X. (2009). Extension of Shelf Life and Control of Human Pathogens in Produce by Antimicrobial Edible Films and

- Coatings. In X. Fan, B. A. Niemira, C. J. Doona, F. E. Feeherry, & R. B. Gravani (Eds.), *Microbial Safety of Fresh Produce* (pp. 225–239). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781444319347.ch12>
- McHugh, T. H., & Senesi, E. (2000). Apple Wraps : A Novel Method to Improve the Quality and Extend the Shelf Life of Fresh-cut Apples. *Journal of Food Science*, 65(3), 480–485.
- Meng, X., Yang, L., Kennedy, J. F., & Tian, S. (2010). Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, 81(1), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.057>
- Moller, H., Grelier, S., Pardon, P., & Coma, V. (2004). Antimicrobial and Physicochemical Properties of Chitosan – HPMC-Based Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6585–6591.
- Montesinos-Herrero, C., del Río, M. Á., Pastor, C., Brunetti, O., & Palou, L. (2009). Evaluation of brief potassium sorbate dips to control postharvest penicillium decay on major citrus species and cultivars. *Postharvest Biology and Technology*, 52(1), 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.09.012>
- Nagy, S., & Smoot, J. M. (1977). Temperature and storage effects on percent retention and percent U.S. recommended dietary allowance of vitamin C in canned single-strength orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 25(1), 135–8. <https://doi.org/10.1021/jf60209a031>
- Nielsen, S. S. (2010). *Food Analysis* (Fourth edi). New York: Springer.
- Nisperos Carriedo, M. O., Buslig, B. S., & Shaw, P. E. (1992). Simultaneous detection of dehydroascorbic, ascorbic, and some organic acids in fruits and vegetables by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(7), 1127–1130. <https://doi.org/10.1021/jf00019a007>
- No, H. K., Meyers, S. P., Prinyawiwatkul, W., & Xu, Z. (2007). Applications of chitosan for improvement of quality and shelf life of foods: A review. *Journal of Food Science*, 72(5). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00383.x>
- Nováková, L., Solich, P., & Solichová, D. (2008). HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(10), 942–958. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.08.006>
- Palou, L., Smilanick, J. L., & Droby, S. (2008). Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue moulds. *Stewart Postharvest Review*, 4(2), 1–16. <https://doi.org/10.2212/spr.2008.2.2>
- Perez Acevedo, Y. (2001). Eventos fisiológicos asociados a la madurez y calidad de los frutos cítricos en Cuba y su relación con los productos transformados de la industria. *Instituto de Nvestigaciones En Fruticultura Tropical*. Cuba.
- Plaza, L., Crespo, I., de Pascual-Teresa, S., de Ancos, B., Sánchez-Moreno, C., & Muñoz, MarinaCano, M. P. (2011). Impact of minimal processing on orange bioactive compounds during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 124(2), 646–651. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.089>
- Ramos-García, M. de L., Bautista-Baños, S., & Barrera-Necha, L. L. (2010). Compuestos Antimicrobianos Adicionados en Recubrimientos Comestibles para Uso en Productos Hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28, 44–57.
- Scherer, R., Cecília, A., Rybka, P., Augusto, C., Dillenburg, A., Teixeira, J., & Teixeira,

- H. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Research International*, 135(1), 150–154.
- Sdiri, S., Bermejo, A., Aleza, P., Navarro, P., & Salvador, A. (2012). Phenolic composition, organic acids, sugars, vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins, 49, 462–468.
- Shiekh, R. A., Malik, M. A., Ahmed Al-Thabaiti, S., & Shiekh, M. A. (2013). Chitosan as a Novel Edible Coating for Fresh Fruits. *Food Sci Ence Technol Ogy Res.*, 19(2), 139–155. <https://doi.org/10.3136/fstr.19.139>
- Smilanick, J. L., Mansour, M. F., Gabler, F. M., & Sorenson, D. (2008). Control of citrus postharvest green mold and sour rot by potassium sorbate combined with heat and fungicides. *Postharvest Biology and Technology*, 47(2), 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.06.020>
- Soler Fayos, G. (2009). *Cambios en la expresión génica asociados a la maduración interna del fruto de los cítricos: identificación de rutas metabólicas implicadas en la acumulación y eliminación de ácidos*. Universidad Politécnica de Valencia.
- Sun, X.-H., Xiong, J.-J., Zhu, A.-D., Zhang, L., Ma, Q.-L., Xu, J., ... Deng, X.-X. (2012). Sugars and organic acids changes in pericarp and endocarp tissues of pumelo fruit during postharvest storage. *Scientia Horticulturae*, 142, 112–117. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.05.009>
- Valencia-chamorro, S. A., Palou, L., Del Rio, M. A., & Pérez-Gago, M. B. (2008). Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* by Hydroxypropyl Methylcellulose - Lipid Edible Composite Films Containing Food Additives with Antifungal Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(23), 11270–11278.
- Zhong, Y., Song, X., & Li, Y. (2011). Antimicrobial, physical and mechanical properties of kudzu starch-chitosan composite films as a function of acid solvent types. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 335–342. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.041>

9. ANEXOS

9.1 Análisis de varianza (ANOVA)

9.1.1 Análisis de varianza para pH

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
pH	45	0.86	0.79	2.74

Datos desbalanceados en celdas.
 Para otra descomposición de la SC
 especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.75	14	0.12	12.73	<0.0001
TRATAMIENTO	1.39	2	0.69	70.75	<0.0001
MUESTREO	0.07	5	0.01	1.47	0.2302
TRATAMIENTO*MUESTREO	0.29	7	0.04	4.20	0.0025
Error	0.29	30	0.01		
Total	2.04	44			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.29792

Error: 0.0098 gl: 30

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.								
Control	5.00	sd	0	sd	A							
Control	6.00	sd	0	sd		B						
Quitosán	6.00	sd	0	sd			C					
Control	3.00	3.27	3	0.06				D				
Control	1.00	3.28	3	0.06				D				
Control	4.00	3.37	3	0.06				D	E			
Quitosán	2.00	3.48	3	0.06				D	E	F		
Control	2.00	3.50	3	0.06				D	E	F		
Quitosán	5.00	3.56	3	0.06				D	E	F	G	
Quitosán	1.00	3.62	3	0.06					E	F	G	H
Quitosán	4.00	3.65	3	0.06					E	F	G	H
Celulosa	2.00	3.68	3	0.06						F	G	H
Celulosa	5.00	3.73	3	0.06						F	G	H
Quitosán	3.00	3.75	3	0.06						F	G	H
Celulosa	6.00	3.75	3	0.06						F	G	H
Celulosa	4.00	3.81	3	0.06							G	H
Celulosa	3.00	3.89	3	0.06								H
Celulosa	1.00	3.92	3	0.06								H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.2 Análisis de varianza para Sólidos Solubles totales (°Brix)

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
BRIX	45	0.87	0.81	3.81

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28.43	14	2.03	14.49	<0.0001
TRATAMIENTO	19.73	2	9.86	70.37	<0.0001
MUESTREO	4.17	5	0.83	5.94	0.0006
TRATAMIENTO*MUESTREO	4.53	7	0.65	4.62	0.0013
Error	4.21	30	0.14		
Total	32.63	44			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.12647

Error: 0.1402 gl: 30

TRATAMIENTO MUESTREO Medias n E.E.

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.	
Control	5	sd	0	sd	A
Control	6	sd	0	sd	B
Quitosán	6	sd	0	sd	C
Control	3	10.76	3	0.22	D
Celulosa	2	10.74	3	0.22	D
Control	4	10.74	3	0.22	D
Control	1	10.67	3	0.22	D
Control	2	10.48	3	0.22	D
Celulosa	4	10.39	3	0.22	D
Celulosa	5	10.26	3	0.22	D E
Celulosa	6	9.92	3	0.22	D E F
Quitosán	4	9.76	3	0.22	D E F G
Celulosa	3	9.64	3	0.22	D E F G H
Quitosán	5	9.14	3	0.22	E F G H
Celulosa	1	9.00	3	0.22	F G H
Quitosán	2	8.75	3	0.22	G H
Quitosán	1	8.64	3	0.22	G H
Quitosán	3	8.59	3	0.22	H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

9.1.3 Análisis de varianza para Pérdida de peso

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% PERDIDA DE PESO	36	0.99	0.98	7.62

Datos desbalanceados en celdas.
Para otra descomposición de la SC
especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	229.55	11	20.87	148.93	<0.0001
TRATAMIENTO	51.05	2	25.52	182.15	<0.0001
MUESTREO	178.02	4	44.50	317.61	<0.0001
TRATAMIENTO*MUESTREO	0.48	5	0.10	0.69	0.6349
Error	3.36	24	0.14		
Total	232.91	35			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.10202

Error: 0.1401 gl: 24

TRATAMIENTO MUESTREO Medias n E.E.

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.						
Control	5	sd	0	sd	A					
Control	4	sd	0	sd		B				
Quitosán	5	sd	0	sd			C			
Celulosa	5	9.72	3	0.22				D		
Quitosán	4	8.21	3	0.22					E	
Celulosa	4	7.44	3	0.22					E	
Quitosán	3	6.19	3	0.22						F
Celulosa	3	5.69	3	0.22						F G
Control	3	4.72	3	0.22						G H
Quitosán	2	4.65	3	0.22						G H
Celulosa	2	3.93	3	0.22						H
Control	2	2.68	3	0.22						I
Quitosán	1	2.46	3	0.22						I
Celulosa	1	2.06	3	0.22						I J
Control	1	1.22	3	0.22						J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

9.1.4 Análisis de varianza para Firmeza

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
FIRMEZA	45	0.80	0.70	10.39

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5038178.59	14	359869.90	8.49	<0.0001
TRATAMIENTO	4331915.48	2	2165957.74	51.09	<0.0001
MUESTREO	418999.06	5	83799.81	1.98	0.1110
TRATAMIENTO*MUESTREO	287264.05	7	41037.72	0.97	0.4719
Error	1271954.95	30	42398.50		
Total	6310133.54	44			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=619.53831

Error: 42398.4982 gl: 30

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.								
Quitosán	6		sd	0	sd	A						
Control	5		sd	0	sd		B					
Control	6		sd	0	sd			C				
Celulosa	1	2451.27	3	118.88				D				
Celulosa	6	2360.43	3	118.88				D	E			
Celulosa	5	2297.03	3	118.88				D	E			
Quitosán	1	2205.45	3	118.88				D	E	F		
Celulosa	2	2162.99	3	118.88				D	E	F	G	
Celulosa	4	2161.60	3	118.88				D	E	F	G	
Celulosa	3	2141.47	3	118.88				D	E	F	G	
Quitosán	5	2134.80	3	118.88				D	E	F	G	
Quitosán	2	2117.55	3	118.88				D	E	F	G	
Quitosán	4	1917.91	3	118.88				D	E	F	G	H
Quitosán	3	1810.66	3	118.88					E	F	G	H
Control	3	1606.85	3	118.88						F	G	H
Control	1	1579.54	3	118.88							G	H
Control	4	1436.61	3	118.88								H
Control	2	1348.75	3	118.88								H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.5 Análisis de varianza para Color

9.1.5.1 ANOVA para L

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
L	45	0.48	0.24	0.99

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8.83	14	0.63	2.00	0.0542
TRATAMIENTO	2.40	2	1.20	3.81	0.0336
MUESTREO	2.60	5	0.52	1.65	0.1767
TRATAMIENTO*MUESTREO	3.83	7	0.55	1.74	0.1380
Error	9.45	30	0.32		
Total	18.28	44			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=1.68876

Error: 0.3150 gl: 30

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.	
Control	6	sd	0	sd	A
Quitosán	6	sd	0	sd	B
Control	5	sd	0	sd	C
Quitosán	5	57.77	3	0.32	D
Quitosán	2	57.30	3	0.32	D
Quitosán	4	57.04	3	0.32	D
Celulosa	5	56.82	3	0.32	D
Control	1	56.73	3	0.32	D
Celulosa	6	56.70	3	0.32	D
Quitosán	1	56.66	3	0.32	D
Celulosa	1	56.65	3	0.32	D
Control	3	56.62	3	0.32	D
Celulosa	3	56.55	3	0.32	D
Celulosa	2	56.51	3	0.32	D
Celulosa	4	56.26	3	0.32	D
Control	4	56.12	3	0.32	D
Control	2	56.10	3	0.32	D
Quitosán	3	56.09	3	0.32	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.5.2 ANOVA para Chroma

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Chroma	45	0.79	0.69	5.15

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	496.07	14	35.43	7.87	<0.0001
TRATAMIENTO	358.14	2	179.07	39.78	<0.0001
MUESTREO	19.48	5	3.90	0.87	0.5155
TRATAMIENTO*MUESTREO	118.45	7	16.92	3.76	0.0049
Error	135.03	30	4.50		
Total	631.11	44			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=6.38345

Error: 4.5012 gl: 30

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.					
Control	5	sd	0	sd	A				
Control	6	sd	0	sd	B				
Quitosán	6	sd	0	sd	C				
Control	1	47.57	3	1.22		D			
Control	3	45.94	3	1.22		D	E		
Control	2	45.66	3	1.22		D	E	F	
Control	4	43.26	3	1.22		D	E	F	G
Celulosa	5	42.77	3	1.22		D	E	F	G H
Celulosa	2	42.75	3	1.22		D	E	F	G H
Celulosa	4	41.79	3	1.22		D	E	F	G H
Quitosán	4	40.90	3	1.22			E	F	G H
Celulosa	6	39.94	3	1.22			E	F	G H
Celulosa	3	39.36	3	1.22				F	G H
Quitosán	5	38.18	3	1.22					G H
Quitosán	3	38.03	3	1.22					G H
Quitosán	1	37.63	3	1.22					G H
Quitosán	2	37.28	3	1.22					G H
Celulosa	1	36.66	3	1.22					H

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.5.3 ANOVA para Hue

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Hue	45	0.31	0.00	2.02

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	40.66	14	2.90	0.97	0.5074
TRATAMIENTO	20.81	2	10.41	3.46	0.0444
MUESTREO	7.07	5	1.41	0.47	0.7952
TRATAMIENTO*MUESTREO	12.78	7	1.83	0.61	0.7453
Error	90.20	30	3.01		
Total	130.86	44			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=5.21705

Error: 3.0065 gl: 30

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.	
Control	6	sd	0	sd	A
Control	5	sd	0	sd	B
Quitosán	6	sd	0	sd	C
Quitosán	2	87.40	3	1.00	D
Quitosán	1	87.34	3	1.00	D
Control	1	86.92	3	1.00	D
Quitosán	5	86.87	3	1.00	D
Control	3	86.43	3	1.00	D
Control	4	86.41	3	1.00	D
Celulosa	3	86.29	3	1.00	D
Quitosán	4	86.23	3	1.00	D
Celulosa	6	86.05	3	1.00	D
Control	2	85.91	3	1.00	D
Quitosán	3	85.76	3	1.00	D
Celulosa	1	85.46	3	1.00	D
Celulosa	5	85.10	3	1.00	D
Celulosa	4	84.43	3	1.00	D
Celulosa	2	83.97	3	1.00	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.6 Análisis de varianza para Acidez titulable

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ACIDEZ	45	0.74	0.62	13.42

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1539796.01	14	109985.43	6.10	<0.0001
TRATAMIENTO	1213757.92	2	606878.96	33.68	<0.0001
MUESTREO	54176.80	5	10835.36	0.60	0.6993
TRATAMIENTO*MUESTREO	271861.30	7	38837.33	2.16	0.0678
Error	540634.94	30	18021.16		
Total	2080430.96	44			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=403.90977

Error: 18021.1647 gl: 30

TRATAMIENTO MUESTREO Medias n E.E.

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.	
Control	5	sd	0	sd	A
Control	6	sd	0	sd	B
Quitosán	6	sd	0	sd	C
Control	1	1347.80	3	77.51	D
Control	4	1285.39	3	77.51	D E
Control	3	1253.31	3	77.51	D E
Quitosán	2	1187.15	3	77.51	D E F
Control	2	1093.63	3	77.51	D E F G
Quitosán	5	1016.36	3	77.51	D E F G
Quitosán	4	961.03	3	77.51	D E F G
Quitosán	3	951.58	3	77.51	D E F G
Celulosa	6	908.16	3	77.51	E F G
Quitosán	1	902.73	3	77.51	E F G
Celulosa	5	890.41	3	77.51	E F G
Celulosa	2	884.17	3	77.51	E F G
Celulosa	4	809.21	3	77.51	F G
Celulosa	3	784.36	3	77.51	F G
Celulosa	1	730.67	3	77.51	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.7 Análisis de varianza para Vitamina C por titulación

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Vitamina C	45	0.84	0.76	6.41

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1571.95	14	112.28	11.14	<0.0001
TRATAMIENTO	1339.95	2	669.98	66.45	<0.0001
MUESTREO	68.33	5	13.67	1.36	0.2688
TRATAMIENTO*MUESTREO	163.67	7	23.38	2.32	0.0513
Error	302.47	30	10.08		
Total	1874.42	44			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=9.55371

Error: 10.0823 gl: 30

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.	
Control	5	sd	0	sd	A
Control	6	sd	0	sd	B
Quitosán	6	sd	0	sd	C
Control	4	63.61	3	1.83	D
Control	3	59.61	3	1.83	D
Control	1	56.85	3	1.83	D E
Control	2	54.13	3	1.83	D E F
Quitosán	5	48.85	3	1.83	E F G
Celulosa	2	48.09	3	1.83	E F G
Quitosán	1	46.86	3	1.83	F G
Celulosa	4	46.73	3	1.83	F G
Quitosán	2	46.42	3	1.83	F G
Celulosa	5	46.31	3	1.83	F G
Quitosán	4	46.24	3	1.83	F G
Celulosa	6	46.21	3	1.83	F G
Celulosa	3	45.97	3	1.83	F G
Celulosa	1	43.55	3	1.83	G
Quitosán	3	43.07	3	1.83	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.8 Análisis de varianza para Azúcares por HPLC

9.1.8.1 ANOVA para Sacarosa

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SACAROSA	27	0.909	0.868	5.279

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6.346	8	0.793	22.391	<0.0001
TRATAMIENTO	4.816	2	2.408	67.970	<0.0001
MUESTREO	1.051	2	0.526	14.832	0.0002
TRATAMIENTO*MUESTREO	0.479	4	0.120	3.381	0.0314
Error	0.638	18	0.035		
Total	6.984	26			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.53850

Error: 0.0354 gl: 18

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.		
Control	1	4.177	3	0.109	A	
Control	2	4.106	3	0.109	A	
Celulosa	2	3.974	3	0.109	A	
Control	3	3.920	3	0.109	A	B
Celulosa	3	3.427	3	0.109		B C
Celulosa	1	3.382	3	0.109		B C
Quitosán	2	3.369	3	0.109		C
Quitosán	1	3.079	3	0.109		C D
Quitosán	3	2.655	3	0.109		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.8.2 ANOVA para Glucosa

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
GLUCOSA	27	0.77	0.67	9.92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1.71	8	0.21	7.64	0.0002
TRATAMIENTO	1.18	2	0.59	21.09	<0.0001
MUESTREO	0.33	2	0.16	5.85	0.0110
TRATAMIENTO*MUESTREO	0.20	4	0.05	1.81	0.1710
Error	0.50	18	0.03		
Total	2.22	26			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.47905

Error: 0.0280 gl: 18

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.	
Control	3	2.01	3	0.10	A
Control	2	1.97	3	0.10	A
Control	1	1.96	3	0.10	A
Quitosán	2	1.73	3	0.10	A B
Celulosa	2	1.72	3	0.10	A B
Celulosa	3	1.68	3	0.10	A B
Quitosán	3	1.45	3	0.10	B
Quitosán	1	1.35	3	0.10	B
Celulosa	1	1.32	3	0.10	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.8.3 ANOVA para fructosa

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
FRUCTOSA	27	0.63	0.47	7.32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0.82	8	0.10	3.91	0.0078
TRATAMIENTO	0.15	2	0.07	2.84	0.0847
MUESTREO	0.38	2	0.19	7.27	0.0048
TRATAMIENTO*MUESTREO	0.29	4	0.07	2.76	0.0595
Error	0.47	18	0.03		
Total	1.29	26			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.46257

Error: 0.0261 gl: 18

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.
Quitosán	2	2.43	3	0.09 A
Control	3	2.42	3	0.09 A
Celulosa	2	2.31	3	0.09 A B
Control	2	2.27	3	0.09 A B
Celulosa	3	2.26	3	0.09 A B
Control	1	2.26	3	0.09 A B
Quitosán	3	2.05	3	0.09 A B
Quitosán	1	1.97	3	0.09 A B
Celulosa	1	1.93	3	0.09 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.9 Análisis de varianza para ácidos orgánicos por HPLC

9.1.9.1 ANOVA para Ácido cítrico

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
CITRICO	27	0.75	0.64	12.77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1009094.56	8	126136.82	6.70	0.0004
TRATAMIENTO	915946.02	2	457973.01	24.31	<0.0001
MUESTREO	35202.27	2	17601.14	0.93	0.4111
TRATAMIENTO*MUESTREO	57946.27	4	14486.57	0.77	0.5593
Error	339063.50	18	18836.86		
Total	1348158.05	26			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=392.65003

Error: 18836.8611 gl: 18

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.
Control	1	1372.65	3	79.24 A
Control	3	1301.54	3	79.24 A B
Control	2	1291.06	3	79.24 A B
Quitosán	3	1093.08	3	79.24 A B C
Quitosán	2	1026.48	3	79.24 A B C
Celulosa	3	978.57	3	79.24 B C
Quitosán	1	946.00	3	79.24 B C
Celulosa	2	859.35	3	79.24 C
Celulosa	1	801.78	3	79.24 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.9.2 ANOVA para Ácido Málico

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
MALICO	27	0.40	0.14	9.79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2920.45	8	365.06	1.52	0.2172
TRATAMIENTO	2521.04	2	1260.52	5.26	0.0159
MUESTREO	127.78	2	63.89	0.27	0.7688
TRATAMIENTO*MUESTREO	271.62	4	67.91	0.28	0.8848
Error	4311.20	18	239.51		
Total	7231.65	26			

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=44.27558

Error: 239.5111 gl: 18

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.
Control	3	169.40	3	8.94 A
Control	2	168.76	3	8.94 A
Celulosa	1	168.01	3	8.94 A
Celulosa	3	165.09	3	8.94 A
Control	1	160.62	3	8.94 A
Celulosa	2	157.83	3	8.94 A
Quitosán	3	149.00	3	8.94 A
Quitosán	1	143.09	3	8.94 A
Quitosán	2	141.65	3	8.94 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.9.3 ANOVA para Ácido Ascórbico

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ASCORBICO	27	0.79	0.69	7.01

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	827.03	8	103.38	8.37	0.0001
TRATAMIENTO	672.67	2	336.33	27.24	<0.0001
MUESTREO	65.03	2	32.51	2.63	0.0993
TRATAMIENTO*MUESTREO	89.33	4	22.33	1.81	0.1711
Error	222.23	18	12.35		
Total	1049.26	26			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=10.05238

Error: 12.3463 gl: 18

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.
Control	3	57.94	3	2.03 A
Control	2	57.40	3	2.03 A
Control	1	53.93	3	2.03 A B
Quitosán	2	51.59	3	2.03 A B
Quitosán	1	51.53	3	2.03 A B
Celulosa	2	46.95	3	2.03 B C
Quitosán	3	46.08	3	2.03 B C
Celulosa	1	45.16	3	2.03 B C
Celulosa	3	40.53	3	2.03 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.10 Análisis de varianza para recuento de bacterias aerobias

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
AEROBIOS	45	0.97	0.96	5.50

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	146.04	14	10.43	71.04	<0.0001
TRATAMIENTO	48.43	2	24.21	164.89	<0.0001
MUESTREO	84.78	5	16.96	115.47	<0.0001
TRATAMIENTO*MUESTREO	12.83	7	1.83	12.49	<0.0001
Error	4.41	30	0.15		
Total	150.45	44			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.15296

Error: 0.1468 gl: 30

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.																	
Control	5	sd	0	sd	A																
Control	6	sd	0	sd		B															
Quitosán	6	sd	0	sd			C														
Celulosa	5	9.04	3	0.22				D													
Control	3	8.81	3	0.22				D	E												
Celulosa	4	8.66	3	0.22				D	E												
Celulosa	3	8.15	3	0.22				D	E	F											
Celulosa	6	8.13	3	0.22				D	E	F											
Quitosán	5	7.88	3	0.22					E	F	G										
Control	4	7.84	3	0.22					E	F	G	H									
Control	2	7.51	3	0.22						F	G	H									
Celulosa	2	6.93	3	0.22							G	H	I								
Quitosán	3	6.89	3	0.22							G	H	I								
Quitosán	4	6.70	3	0.22								H	I	J							
Control	1	6.31	3	0.22									I	J							
Celulosa	1	5.63	3	0.22											J						
Quitosán	2	3.28	3	0.22																	K
Quitosán	1	2.78	3	0.22																	K

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.1.11 Análisis de varianza para recuento de mohos y levaduras

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
HONGOS	45	0.87	0.81	13.54

Datos desbalanceados en celdas.

Para otra descomposición de la SC

especifique los contrastes apropiados.. !!

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	129.39	14	9.24	14.74	<0.0001
TRATAMIENTO	17.53	2	8.77	13.98	0.0001
MUESTREO	93.21	5	18.64	29.72	<0.0001
TRATAMIENTO*MUESTREO	18.65	7	2.66	4.25	0.0023
Error	18.82	30	0.63		
Total	148.21	44			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=2.38281

Error: 0.6272 gl: 30

TRATAMIENTO	MUESTREO	Medias	n	E.E.									
Control	5	sd	0	sd	A								
Control	6	sd	0	sd		B							
Quitosán	6	sd	0	sd			C						
Quitosán	5	7.99	3	0.46				D					
Control	4	7.73	3	0.46				D	E				
Control	3	7.23	3	0.46				D	E				
Celulosa	5	7.11	3	0.46				D	E				
Quitosán	3	6.85	3	0.46				D	E	F			
Celulosa	6	6.79	3	0.46				D	E	F			
Control	2	6.62	3	0.46				D	E	F			
Celulosa	4	6.60	3	0.46				D	E	F	G		
Quitosán	4	5.80	3	0.46				D	E	F	G		
Celulosa	3	5.72	3	0.46				D	E	F	G	H	
Control	1	5.39	3	0.46					E	F	G	H	
Celulosa	2	4.68	3	0.46						F	G	H	
Celulosa	1	4.24	3	0.46							G	H	
Quitosán	2	3.36	3	0.46								H	I
Quitosán	1	1.59	3	0.46									I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

9.2 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron calculados a partir del análisis de regresión lineal de las curvas de calibración por medio de las siguientes ecuaciones (Miller & Miller, 2005):

$$LOD = b + 3S_{y/x}$$

$$LOQ = b + 10S_{y/x}$$

Dónde,

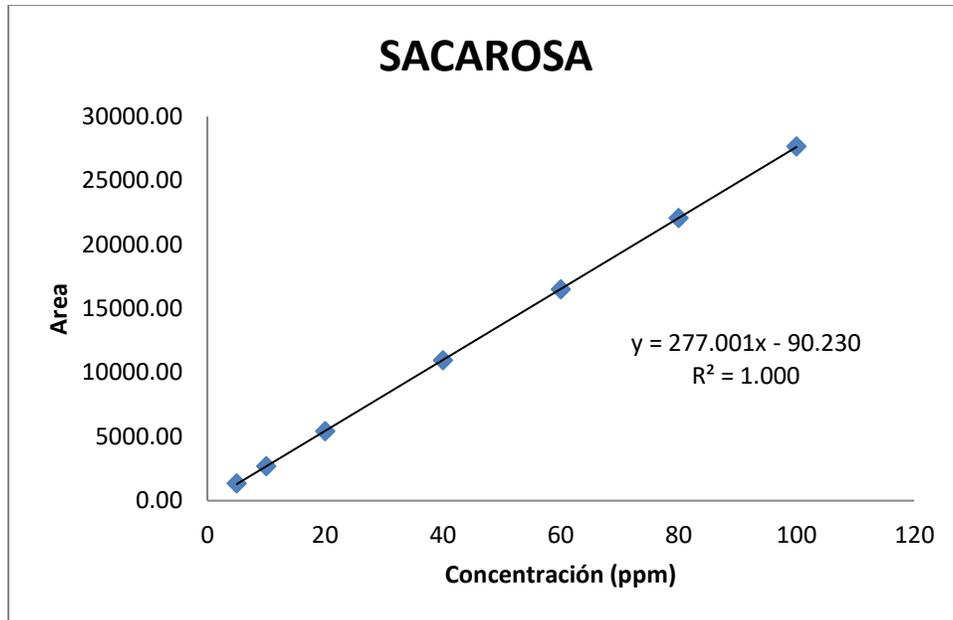
b = intercepto

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} = \text{error aleatorio del intercepto}$$

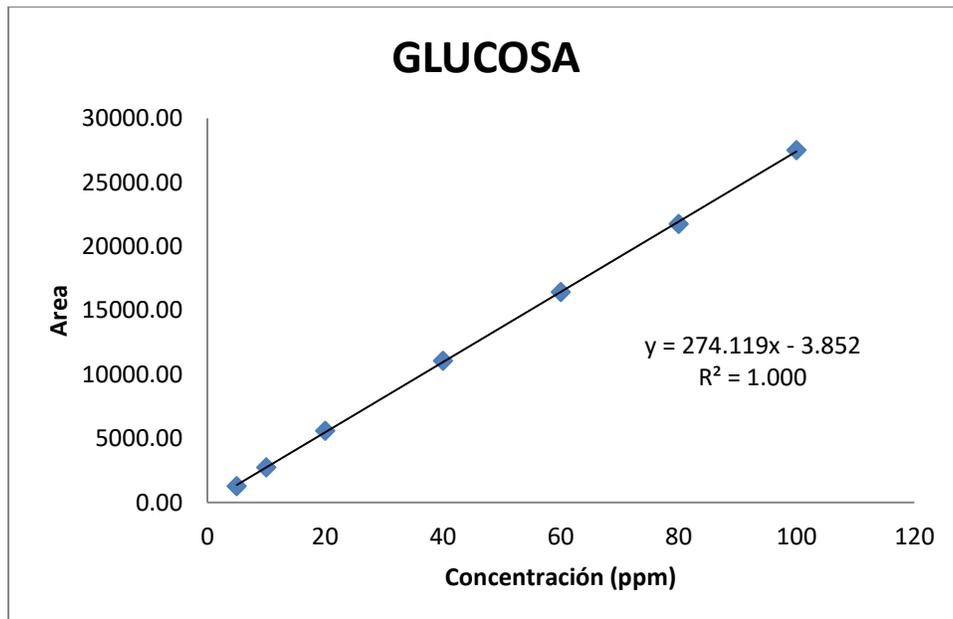
\hat{y}_i = son los valores de "y" sobre la línea de regresión calculada correspondientes a los valores de "x".

9.3 Análisis de azúcares por HPLC

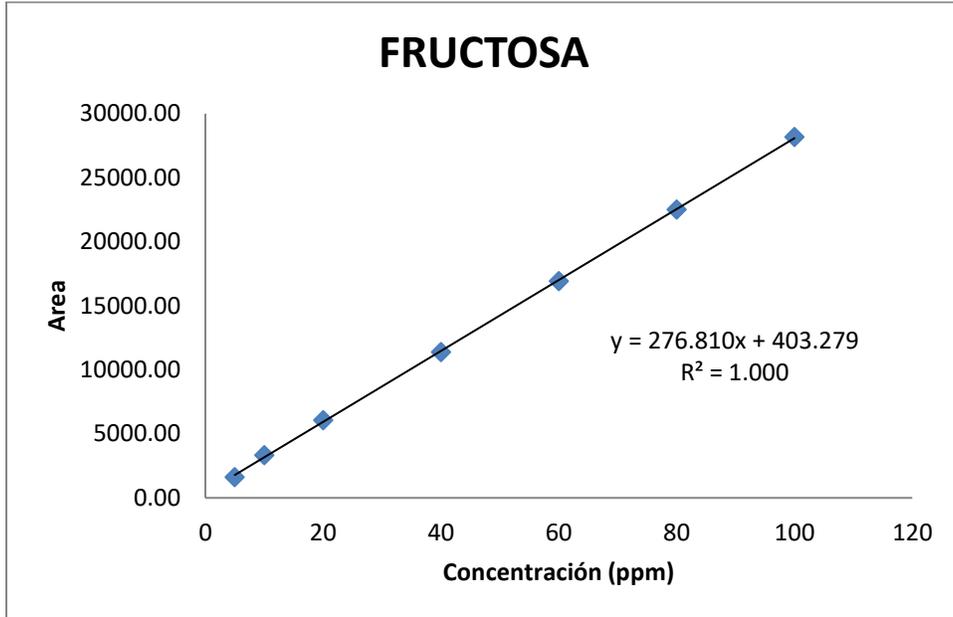
9.3.1 Curva de calibración para el análisis por HPLC de Sacarosa



9.3.2 Curva de calibración para el análisis por HPLC de Glucosa

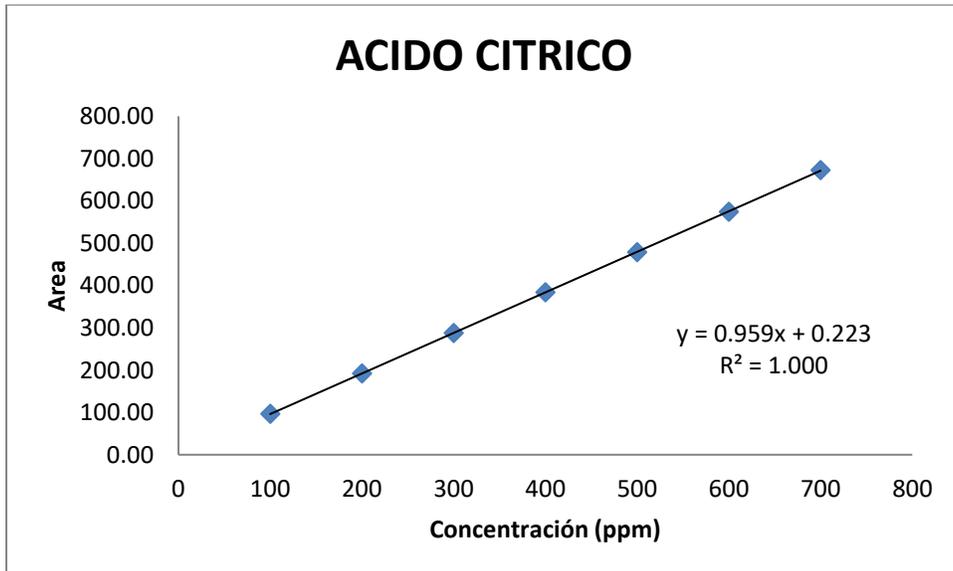


9.3.3 Curva de calibración para el análisis por HPLC de Fructosa

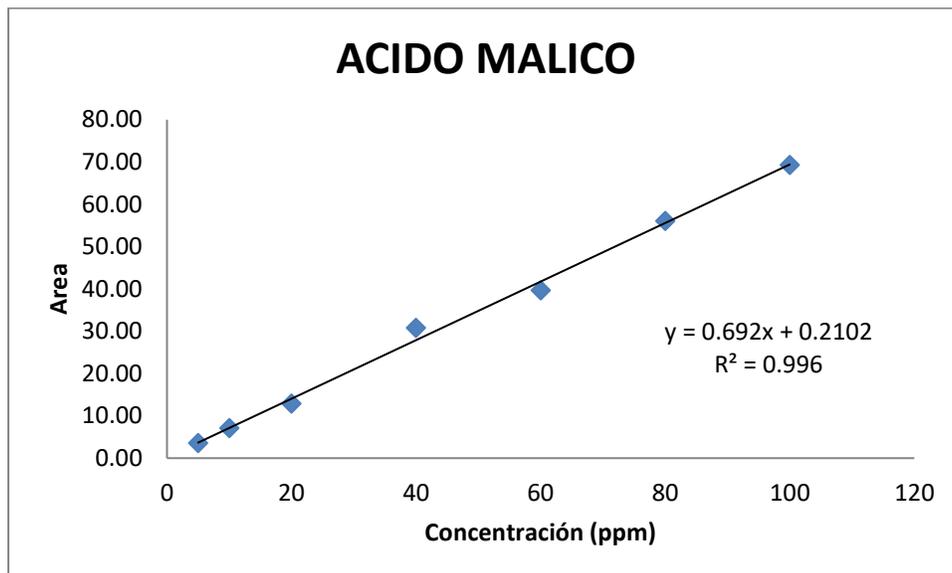


9.4 Análisis de ácidos orgánicos por HPLC

9.4.1 Curva de calibración para el análisis por HPLC de Ácido Cítrico



9.4.2 Curva de calibración para el análisis por HPLC de Ácido Máfico



9.4.3 Curva de calibración para el análisis por HPLC de Ácido Ascórbico

