



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

“Efecto de cubiertas de Quitosano obtenido en condiciones óptimas de fermentación láctica de cabezas de camarón sobre el comportamiento poscosecha de papaya (*Carica papaya* L.) procesada mínimamente”

TESIS

Que presenta

IQ. Luis Angel Cabanillas Bojórquez

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIA
Y
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**

Directores de tesis

MC Marco Antonio Parra Inzunza

Dr. Roberto Gutiérrez Dorado

Culiacán Rosales, Sinaloa, México

Diciembre de 2016

El presente trabajo de investigación, titulado **“Efecto de cubiertas de Quitosano obtenido en condiciones óptimas de fermentación láctica de cabezas de camarón sobre el comportamiento poscosecha de papaya procesada mínimamente”**, se llevó a cabo en el laboratorio de Tecnología Poscosecha y Fermentaciones, el laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha y en el laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa, bajo la dirección del MC Marco Antonio Parra Inzunza y Dr. Roberto Gutiérrez Dorado, contó además con la asesoría del Dr. Héctor Samuel López Moreno, Dr. Julio Montes Ávila y el Dr. Misael Odín Vega García. El tesista Luis Angel Cabanillas Bojórquez recibió beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Culiacán de Rosales, Sinaloa el día 2 del mes Diciembre del año 2016, el (la) que suscribe IQ Luis Angel Cabanillas Bojórquez alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos con número de cuenta 0915503-1, de la Unidad Académica Facultad de Ciencias Químico-Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dr. Roberto Gutiérrez Dorado y MC Marco Antonio Parra Inzunza y cede los derechos del trabajo titulado “Efecto de cubiertas de quitosano obtenido en condiciones óptimas de fermentación láctica de cabezas de camarón sobre el comportamiento poscosecha de papaya (*Carica papaya* L.) procesada mínimamente”, a la Universidad Autónoma de Sinaloa para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

IQ Luis Angel Cabanillas Bojórquez

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Luis Angel Cabanillas Bojórquez", is written over a horizontal line.

DEDICATORIAS

A mis padres, por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo incondicional y sus consejos que han hecho de mí una persona de bien, los cuales me han ayudado a salir adelante en los momentos más difíciles.

A mi hermano, por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo y comprensión.

A mis tíos (Monchi y Trini) y abuela (Lupe) por regalarme momentos llenos de alegría e inolvidables recuerdos, así como palabras de apoyo.

Al MC Marco Antonio Parra Inzunza, por ser una fuente de inspiración para mí, brindándome siempre su apoyo, confianza, amistad y sus sabios consejos que me han llevado a superarme día con día.

Al Dr. Roberto Gutiérrez Dorado por aceptar el reto y poder desarrollar este proyecto, brindarme su amistad, apoyo y conocimientos.

A los doctores, Héctor Samuel López Moreno, Julio Montes Ávila y Misael Odín Vega García, por su amistad y apoyo incondicional en la realización de este proyecto.

Al Dr. José Luis Cristerna González por su apoyo, confianza y consejos.

Al Dr. Ramón Ignacio por su apoyo y amistad.

A todos mis amigos (as) y conocidos (as) por su apoyo y amistad durante mi estancia en el posgrado (Josesón, Lalo, Martín, Demis, Sonia, Yeni, Jessica, Iván, Melissa, Fernando, Sarahi, Gabriel (El Jety), Alma, Crock, Maritza).

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Sinaloa, por medio de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, que me permitió realizar mis estudios de licenciatura y posgrado.

A todos y a cada uno de los maestros y doctores que a lo largo del posgrado aportaron en diferente medida a mi formación, en especial a los de ingeniería, por aceptarme en dicha optativa, compartir sus conocimientos, su amistad y su apoyo a lo largo de la realización de este proyecto.

A todos los laboratorios en los que tuve el privilegio de participar, primero al laboratorio de Productos Naturales y a todos sus alumnos, al laboratorio de Mediciones Termo-físicas en especial a los maestros César, Rosalina y Yesi, al laboratorio de Bioprocesos de alimentos y todos sus alumnos, al laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha por brindarme asesoría en la última parte del proyecto, en especial a las maestras Lidia y Martha. Por último, quisiera hacer un agradecimiento especial al laboratorio de Biomedicina Molecular por permitirme realizar la última parte del proyecto, además de hacerme parte de su grupo de trabajo, a todos sus alumnos (Ceci, Alma, Maleni, Fanny, Rodrigo, Cruz, Priscila, Carito y Kenia).

A todos mis compañeros de generación por brindarme su amistad, confianza, apoyo y por regalarme incontables experiencias y momentos inolvidables, en especial a David, Alfa, Lupita, Bianca y Celeste.

A todos y cada uno de las personas que estuvieron trabajando a lo largo de mi estancia en el laboratorio de Tecnología Poscosecha y Fermentaciones, gracias por su amistad, compañerismo y apoyo.

“El éxito, no es una casualidad, es producto de un esfuerzo constante”

R. Angel

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
I RESUMEN	1
ABSTRACT	3
II INTRODUCCIÓN	5
III REVISIÓN DE LITERATURA	10
A QUITINA	11
1 Obtención de Quitina	14
a Método químico	14
1) Desproteínización química	16
2) Desmineralización química	17
3) Decoloración	17
b Método biológico	18
1) Ensilaje	18
2) Hidrólisis enzimática	19
3) Fermentación láctica	19
B QUITOSANO	22
1 Obtención de Quitosano	25
a Método biológico	25
b Método químico	25
1) Desacetilación homogénea	26

2) Desacetilación heterogénea	26
2 Propiedades físico-químicas de Quitosano	27
a Grado de desacetilación	27
1) Espectroscopía H-RMN	28
2) Titulación potenciométrica	28
3) Espectroscopía UV	29
4) Espectroscopía de infrarrojo (IR)	29
b Solubilidad	30
c Toxicidad	31
d Peso molecular	31
3 Propiedades biológicas	33
a Actividad antimicrobiana	33
4 Aplicaciones	34
a Tratamiento de agua	34
b Ciencia de los materiales	36
c Ciencia médica y farmacéutica	36
d Microbiología	38
e Inmunología	38
f Agricultura	38
g Alimentos	39
1) Mecanismo	41
C ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
1 Metodología de superficie respuesta	42

a	Gráfica de contornos	43
D	PRODUCTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS	45
1	Definición	47
2	Ventajas de los productos mínimamente procesados	48
3	Proceso de preparación	49
4	Factores que afectan la calidad	50
a	Materia prima	52
b	Estado de madurez	52
c	Troceado y pelado	53
d	Temperatura y humedad relativa (HR)	53
e	Ataque microbiano	54
5	Cambios producidos durante el procesamiento mínimo	54
a	Cambios fisiológicos	55
b	Cambios físicos	55
1)	Color	56
2)	Firmeza	56
3)	Pérdida de peso	57
c	Cambios químicos	57
1)	Concentración de sólidos solubles totales	57

2) pH y acidez total titulable	58
3) Sabor y aroma	58
6 Métodos de conservación	59
a Refrigeración	59
b Atmósferas modificadas	60
c Recubrimientos con películas comestibles	61
E PAPAYA	61
1 Generalidades	61
a Origen y distribución	62
b Variedades	62
2 Aspectos bioquímicos y fisiológicos	63
a Fruto	63
b Composición química y nutrimental	63
c Maduración y senescencia	66
3 Importancia económica	69
a Producción mundial	69
b Producción nacional	69
Importancia en el Estado	71
IV JUSTIFICACIÓN	73
V HIPÓTESIS	74
VI OBJETIVOS	75
A GENERAL	75

B	ESPECÍFICOS	75
VII	MATERIALES Y MÉTODOS	76
A	MATERIALES	76
B	MÉTODOS	77
1	Fermentación	77
2	Obtención de quitina	77
a	Desproteínización	80
b	Desmineralización	80
c	Despigmentación	80
3	Obtención de Quitosano	80
a	Caracterización de Quitosano	81
1)	Contenido de cenizas (%C)	81
2)	Rendimiento (%R)	81
3)	Grado de desacetilación	82
4)	Peso molecular	82
b	Optimización	83
4	Análisis de calidad	84
a	Color	84
b	Firmeza	84
c	Concentración de sólidos solubles totales	85
d	pH	85
e	Acidez total titulable	85
5	Análisis microbiológico	85

a	Preparación de la muestra	85
b	Mesófilos y psicrófilos	86
c	Hongos y levaduras	86
6	Análisis Estadístico	87
VIII	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	88
A	MEJORES CONDICIONES DE FERMENTACIÓN LÁCTICA DE CABEZAS DE CAMARÓN PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO	88
1	Modelos experimentales de predicción	88
a	Contenido de cenizas	90
b	Rendimiento	94
c	Grado de desacetilación	98
2	Optimización	103
B	ANÁLISIS DE CALIDAD	106
1	Color	107
a	Valor L	107
b	Valor b	111
2	Firmeza	114
3	Concentración de sólidos solubles totales	117
4	pH	121
5	Acidez total titulable	124
C	ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO	127
1	Bacterias mesófilas	128
2	Bacterias psicrófilas	135

	3 Hongos y levaduras	140
IX	CONCLUSIONES	146
X	BIBLIOGRAFÍA	148
	ABREVIATURAS	165
	ANEXOS	167

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Estructura de Quitina	13
2	Esquema de fermentación láctica, en el cual se muestra los dos tipos de reacciones, energética y química que ocurren en la misma	21
3	Estructuras químicas de a) Quitina y b) Quitosano	24
4	Gráfica de superficie de respuesta, en la cual se muestran las diferentes secciones y nombres de las mismas	44
5	Gráfica de contornos y las diferentes secciones de la misma y qué representa cada una de ellas	46
6	Diagrama de proceso de productos vegetales cortados	51
7	Visualización de cada estado de madurez de papaya “Maradol”	68
8	Diagrama de flujo del desarrollo del experimento (ATT = Acidez total titulable, CSST = Concentración de sólidos solubles totales)	78
9	Diagrama ilustrativo del desarrollo del experimento	79
10	Gráfica de contornos (A) y de superficie de respuesta (B) que muestra el efecto del tiempo (t) y concentración de azúcar (C) sobre el contenido de cenizas (%C) del Quitosano obtenido por fermentación ácido láctica de cabezas de camarón	92
11	Gráfica de contornos (A) y de superficie de respuesta (B) que muestra el efecto del tiempo (t) y concentración de azúcar (C) sobre el rendimiento (%R) de Quitosano obtenido por fermentación ácido láctica de cabezas de camarón	96
12	Gráfica de contornos que muestra el efecto del tiempo (t) y concentración de azúcar (C) sobre el grado de desacetilación del Quitosano obtenido por fermentación ácido láctica de cabezas de camarón	100
13	Gráfico mostrando la región con la mejor combinación de variables del proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón [tiempo de fermentación [(t)=108 h / concentración de azúcar	104

(C)=8.74%] para la producción de Quitosano con rendimiento y grado de desacetilación altos y contenido de cenizas bajo

- 14 Cambios en el parámetro L^* de la escala de color CIE durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican LSD = 1.484 ($\alpha=0.05$) 108
- 15 Cambios en el parámetro b^* de la escala de color CIE durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican LSD = 1.791 ($\alpha=0.05$) 112
- 16 Pérdida de firmeza (N) durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican LSD = 1.153 ($\alpha=0.05$) 115
- 17 Contenido de sólidos solubles totales (°Brix) durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de 119

Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican $LSD = 0.644$ ($\alpha=0.05$)

- 18 Cambios en el pH durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican $LSD = 0.059$ ($\alpha=0.05$) 122
- 19 Cambios en la acidez total titulable (% ácido cítrico) durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican $LSD = 0.0031$ ($\alpha=0.05$) 125
- 20 Recuento de bacterias mesófilas aerobias durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 9 repeticiones \pm la desviación estándar 130

21	Fotografías que muestran el efecto de los diferentes tratamientos (Control, Quit Com y Quit Opt) aplicados en trozos de papaya “Maradol” almacenada a 5°C por 10 días sobre el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica	132
22	Recuento de bacterias psicrófilas aerobias durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 9 repeticiones \pm la desviación estándar	136
23	Fotografías que muestran el efecto de los diferentes tratamientos (Control, Quit Com y Quit Opt) aplicados en trozos de papaya “Maradol” almacenada a 5°C por 10 días sobre el crecimiento de bacterias psicrófilas aerobias. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica	138
24	Recuento de hongos y levaduras durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido	142

con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 9 repeticiones \pm la desviación estándar

- 25 Fotografías que muestran el efecto de los diferentes tratamientos (Control, Quit Com y Quit Opt) aplicados en trozos de papaya “Maradol” almacenada a 5°C por 10 días sobre el crecimiento de hongos y levaduras. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica
- 143

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Descripción	Página
1.	Aplicaciones y usos de Quitosano	35
2.	Composición en fresco del fruto de papaya	65
3.	Características de los índices de madurez del fruto de papaya Maradol	67
4.	Producción mundial de papaya durante 2013	70
5.	Producción nacional de papaya durante 2014	72
6	Diseño experimental empleado para obtener diferentes combinaciones de tiempo de fermentación y concentración de azúcar (t, C) para la producción de Quitosano por fermentación ácido láctica de cabezas de camarón, y resultados experimentales de las variables de respuesta (Cenizas, Rendimiento, Grado de desacetilación)	90

I RESUMEN

El derivado más importante de los desechos de camarón es la Quitina, esta es tradicionalmente obtenida mediante un proceso termoquímico, en donde se utilizan grandes volúmenes de reactivos y agua, un método alternativo que se ha reportado es un proceso biológico-químico, en donde se utiliza fermentación láctica que reduce el consumo de agua, energía y reactivos. La Quitina es precursora de otro biopolímero de gran interés en la industria, llamado Quitosano. En los últimos años se ha estudiado el efecto de cubiertas a partir de dicho biopolímero (Quitosano) en distintos frutos, como papaya. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de cubiertas de Quitosano obtenidas por medio del proceso biológico-químico de cabezas de camarón de desecho empleando condiciones optimizadas de fermentación ácido-láctica, sobre el comportamiento poscosecha y la inhibición de microorganismos en papaya procesada mínimamente. Para llevar a cabo la optimización del proceso de fermentación se seleccionó un diseño experimental central compuesto rotatable de la metodología de superficie de respuesta. Se utilizó suero de leche, así como melaza de caña para realizar la fermentación, la cual se llevó a cabo en un reactor por lotes. Se mantuvo relación peso/volumen de 1/5. Las variables de proceso fueron tiempo de fermentación (t, h) y concentración de sacarosa (C, °Brix) presente en la melaza. La Quitina parcialmente purificada producto de la fermentación fue sometida a tratamiento químico moderado, utilizando NaOH 1M en una proporción 1/10 (p/v) para desproteínizar, HCl 1N en relación 1/10 (v/v) para desmineralizar e Hipoclorito de Sodio al 10% en una proporción 1/10 (v/v) para despigmentar, con lo cual se obtuvo Quitina. Ésta fue tratada con NaOH en proporción 1/15 (p/v) a 115 °C durante 4 horas para desacetilar y obtener Quitosano. Las variables de respuesta empleadas para optimizar

fueron las siguientes propiedades del Quitosano obtenido: contenido de cenizas, rendimiento y grado de desacetilación (GD). Se utilizó la técnica de superposición de gráficas de contornos para la optimización del proceso. La combinación óptima de variables de proceso para producir Quitosano con valores altos de rendimiento y grado de desacetilación, y valores bajos de cenizas fue: tiempo de fermentación (t)= 108 h /concentración de azúcar (C)= 8.74%. Los valores predichos de cenizas, rendimiento y grado de desacetilación fueron 0.29%, 2.02% y 86.30%, respectivamente. Los valores experimentales de cenizas, rendimiento y grado de desacetilación del Quitosano obtenido con condiciones óptimas (0.23%, 2.03% y 83%, respectivamente) fueron similares a los valores predichos, mencionados anteriormente. El Quitosano optimizado fue aplicado en papaya procesada mínimamente. Los frutos fueron previamente pelados, rebanados y a su vez divididos en tres lotes, uno fue sumergido en solución de Quitosano comercial (Quit Com), otro en solución de Quitosano optimizado (Quit Opt) y el tercero en agua (Control), los cuales se almacenaron a 5°C por 10 días. Cada 2 días se evaluó el color de la pulpa, la firmeza, el pH, la acidez titulable y la concentración de sólidos solubles totales, mientras que el contenido microbiológico (mesófilos, psicrófilos, hongos y levaduras) se evaluó cada 5 días. El tratamiento con Quitosano optimizado retardó la pérdida de color y acidez titulable, el crecimiento de bacterias mesófilas y psicrófilas, hongos y levaduras, y aumentó el pH de rebanadas de papaya procesadas mínimamente y no presentó diferencias significativas con el Quitosano comercial. Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, el tratamiento con Quitosano optimizado podría aplicarse en otros frutos como recubrimiento para mantener sus características de calidad y retardar el crecimiento microbiano durante el almacenamiento de los frutos procesados mínimamente.

ABSTRACT

The most important derived from shrimp waste is Chitin, this is traditionally obtained by a thermochemical process, large volumes of water and reagents are used, an alternative method has been reported is a biological-chemical process, in which lactic acid fermentation reduces the consumption of water, energy and reagents. Chitin is a precursor of another biopolymer with great interest in the industry, called Chitosan, which has interesting properties and applications. In recent years, has been studied the effect of coatings of Chitosan in fruits, such as papaya. The objective of this work is study the effect of Chitosan coatings obtained from biological-chemical process of waste shrimp heads using optimized lactic acid fermentation conditions on postharvest behavior and inhibition of microorganisms in minimally processed papaya. To perform the optimization of the fermentation process a central rotatable experimental design of response surface methodology was selected. Whey and molasses was used for fermentation, which is carried out in a batch reactor maintained 1/5 weight/volume ratio. Process variables were fermentation time (f, h) and concentration of sucrose (C, °Brix) present in molasses. Fermentation product Chitin partially purified was subjected to chemical treatment using 1 M NaOH in 1/10 (w/v) ratio for desproteination, 1 N HCl in 1/10 (w/v) ratio to demineralize and 10% sodium hypochlorite in 1/10 (v/v) for despigmenting, and Chitin was obtained. Chitin subsequently was treated with NaOH in 1/15 (w/v) ratio at 115°C for 4 hours to obtain Chitosan. The response variables used to optimize were the following properties of Chitosan obtained: ash content, yield and deacetylation degree (DD). Contour graphics overlay technique was used for optimization process. The optimal combination of process variables to produce Chitosan with high yield and deacetylation degree, and low ash values were:

fermentation time (t) = 108 h/sugar concentration (C) = 8.74%. Experimental values of ash, yield and deacetylation degree of Chitosan obtained with optimal conditions (0.23%, 2.03% and 83%, respectively) were similar to the predicted values previously reported. Optimized Chitosan was applied in minimally processed papaya. The fruits were peeled, sliced and divided in three lots, one was immersed in commercial Chitosan (Quit Com) solution, another with optimized Chitosan (Quit Opt) solution and third in distilled water (Control), and then were stored at 5°C for 10 days. Every 2 days was evaluated the color pulp, firmness, pH, titratable acidity and total soluble solids concentration, and microbial content (mesophilic, psychrophilic, fungi and yeasts) was assessed every 5 days. Chitosan optimized treatment decreased the loss of color and acidity, the growth of mesophilic and psychrophilic bacteria, fungi and yeasts, and increased the pH of minimally processed papaya slices and no significant differences with the commercial Chitosan. Based on the results obtained in this study, treatment with optimized Chitosan could be applied in other fruits as a coating to maintain its quality characteristics and inhibit microbial growth during storage of minimally processed fruits.

II INTRODUCCIÓN

Debido a que los consumidores son cada vez más conscientes de la relación entre la dieta y la salud, el consumo de alimentos de origen marino ha estado creciendo continuamente. Los consumidores identifican mariscos como alimentos nutritivos y completos. Por lo tanto, se les percibe como una excelente fuente de proteínas y lípidos de alta calidad, conteniendo además presentan cantidades importantes de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA). Estos compuestos son bien conocidos por contribuir a la mejora de la salud humana a través de diferentes mecanismos, coadyuvando a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares, enfermedades coronarias, hipertensión. Además, los alimentos de origen marino son fácilmente digeridos y constituyen una excelente fuente de minerales esenciales. Recientemente los mariscos han sido reconocidos como productos nutracéuticos o alimentos funcionales. Los alimentos funcionales, primero identificados en Japón en 1980, se definen como alimentos que demuestran un efecto beneficioso sobre una o más funciones específicas del organismo humano (Ross 2000). Alimentos funcionales o nutracéuticos basados en alimentos marinos, incluyen ácidos grasos omega-3, hidrolizados de proteínas de pescado, algas constituyentes, carotenoides, antioxidantes, espina de pescado, cartílago de tiburón, taurina, compuestos bioactivos, Quitina y Quitosano (Alishahi y Aïder 2012).

El aumento en la distribución y consumo de mariscos en años recientes conlleva a un aumento en la cantidad de desechos producidos. La composición de estos desechos varía con la especie, pero en general contienen: Quitina, proteínas, sales minerales, pigmentos y lípidos (Franco 2010). La Quitina además de formar parte de

la estructura de crustáceos y artrópodos, está presente en la pared celular de hongos y levaduras; es el segundo polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa (Ahmed y col 2014). En las cutículas de los crustáceos, la Quitina se encuentra fuertemente asociada con sales inorgánicas, tales como carbonato de calcio, proteínas, pigmentos y lípidos. De ahí que el proceso convencional utilizado en la industria para la obtención de Quitina a partir de esqueletos de crustáceos, consiste en una desproteinización con álcali, seguida de una desmineralización con ácidos diluidos y finalmente, la eliminación de lípidos con solventes orgánicos (Juárez 2012).

Los métodos convencionales empleados para la obtención de la Quitina requieren el consumo de grandes cantidades de reactivos y agua, se producen grandes volúmenes de efluentes, los cuales al ser tratados elevan los costos de producción y causan daños ambientales (Hernández y col 2009). En la actualidad se han buscado alternativas para el tratamiento de los desechos y de esta manera se ha empleado la fermentación láctica para su aprovechamiento integral. Este proceso, además de purificar parcialmente a la quitina, permite la recuperación de otras sustancias de alto valor agregado (Lárez-Velásquez 2006).

El Quitosano es un polímero natural que se obtiene por desacetilación de la Quitina, y en comparación con otros polisacáridos, éste cuenta con varias ventajas, tales como biocompatibilidad con otros compuestos incorporados, alta biodegradabilidad y nula toxicidad, además que presenta algunas propiedades funcionales tales como bacteriostático y fungistático debido a la presencia de altas densidades de grupos amino e hidroxilo en la estructura del polímero. Materiales a base de Quitosano se pueden utilizar como películas o recubrimientos comestibles debido a su propiedad única de aumento de la viscosidad después de la hidratación.

Por otra parte, las películas de Quitosano son resistentes, duraderas, flexibles, y difíciles de romper. Dichas películas poseen baja permeabilidad al oxígeno y a otros gases (Hosseini y col 2013; van den Broek y col 2015; Zhu y col 2015).

Películas de Quitosano pueden obtenerse por medio de su disolución en agua acidificada. Sin embargo, existen otras técnicas de obtención, tales como la mezcla de disolvente, la mezcla de extrusión y extrusión reactiva, las cuales provocan diferentes morfologías, por ejemplo, matriz homogénea en donde el polímero está disuelto, o no homogénea (como un relleno). Debido al enlace de hidrógeno que se encuentra en la extensa cadena polimérica de Quitosano, éste se degrada antes de la fusión. La disolución de Quitosano en un disolvente apropiado es necesaria para impartir funcionalidad. Sin embargo, para cada sistema de disolvente, deben ser conocidas concentración de polímero, concentración de ion, temperatura y pH (van den Broek y col 2015).

En la actualidad las recomendaciones sobre las dietas saludables tienen cierto común denominador dentro de los esquemas de diferentes países, reconociéndose el consumo de frutas y vegetales como un beneficio a la salud, ya que son una fuente excelente de vitaminas, minerales y fibra, igualmente aportan un contenido calórico bajo (Ayón-Reyna y col 2015).

La introducción en los mercados de productos frescos cortados es una forma de incrementar el consumo de frutas y hortalizas hasta los niveles recomendables en una dieta saludable (López-Mata y col 2012).

Actualmente, los frutos frescos cortados (FFC) más comunes en el mercado son piña, melón, sandía, manzana, pera y uva. Frutos tropicales como el mango, la papaya y el plátano están llamados a formar parte del mercado de los FFC, dada su alta

preferencia por parte del consumidor y su disponibilidad. Dentro de éstos, sobresale por su importancia alimenticia y económica en nuestro país la papaya (Sánchez y col 2007).

Carica papaya L. es una fruta cultivada ampliamente en ambientes tropicales y subtropicales; pertenece a la familia *Caricaceae*, se consume tanto en fresco como procesada. Es considerada una especie nativa de Centroamérica y su origen probablemente está entre el sur de México y el norte de Nicaragua (Ayón-Reyna y col 2015; Dotto y col 2015).

Para consumirla se necesita pelar, remover las semillas y rebanar, lo cual es una actividad que ocupa tiempo y esfuerzo. Además, la variedad "Maradol", al ser una fruta muy grande, no es conveniente para su uso individual o consumo personal. Al ser un fruto tropical, el almacenamiento tiene serias limitaciones, que da lugar a su rápido deterioro y la alta incidencia a la pudrición (Bautista-Baños y col 2013).

Se han reportado algunos métodos a fin de evitar las pérdidas posteriores a la cosecha, tanto de papaya como de otras frutas, y en consecuencia, extendiendo su vida útil. Entre estos métodos se encuentran tratamientos térmicos, irradiación, aplicación de fungicidas, uso de agentes de control biológico y uso de recubrimientos naturales a base de aceites esenciales y Quitosano (Dotto y col 2015).

El empleo de recubrimientos a base de Quitosano para el procesamiento de rebanadas de papaya ha mostrado excelentes resultados para mantener por más tiempo las características de calidad de este fruto, así como inhibir el crecimiento de microorganismos (Ayón-Reyna y col 2015). Sin embargo, el Quitosano empleado como recubrimiento para alargar la vida poscosecha de frutos en la mayoría de los trabajos de investigación reportados se ha obtenido a partir de quitina producida por métodos

convencionales (químico) que producen grandes cantidades de efluentes contaminantes, con altos costos de producción. Existen pocos trabajos donde se haya empleado Quitosano obtenido a partir de quitina producida por fermentación ácido láctica de residuos de crustáceos para la elaboración de recubrimientos para alargar la vida poscosecha de frutos procesados mínimamente (Du y col 2009; Gamal y col 2016). No hemos encontrado reportes donde se hayan obtenido condiciones óptimas de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón para la obtención de Quitosano con características similares al Quitosano comercial, producido a partir de Quitina obtenida por el método biológico-químico. Es por ello que el objetivo de este trabajo de investigación fue estudiar el efecto de cubiertas de Quitosano obtenidas por medio del proceso biológico-químico de cabezas de camarón de desecho empleando condiciones optimizadas de fermentación ácido-láctica, y residuos de las industrias láctea y azucarera (suero de leche y melaza de caña) como fuentes de inóculo (bacterias ácido lácticas) y energía (azúcar) sobre el comportamiento poscosecha y la inhibición de microorganismos en papaya procesada mínimamente.

III REVISIÓN DE LITERATURA

El advenimiento de la biotecnología moderna ha transformado radicalmente la opinión de los científicos acerca de los organismos y de los materiales que se producen mediante el aprovechamiento de las enzimas en la naturaleza o de la materia prima marina y agrícola para la transformación de una nueva clase de materiales biodegradables, biocompatibles y renovables (Juárez 2010; Chatterjee y Guha 2014).

Las razones que en la actualidad conducen a la sociedad a volver a utilizar los polímeros naturales que se venían usando desde hace cientos de años, son el creciente interés por compatibilizar la generación de productos manufacturados con la sostenibilidad del medio ambiente y el alto costo de algunos materiales sintéticos. Además, el problema de una alta acumulación de residuos en los últimos tiempos ha promovido el uso de éstos reciclándolos como materia prima (López 2012).

En la naturaleza existen polisacáridos de estructuras y formas diferentes que funcionan como materiales estructurales o proveedores de agua y energía, tipo de polisacáridos naturales que se denominan biopolímeros, pueden ser usados como adhesivos, absorbentes, lubricantes, cosméticos, como aditivos en el área farmacéutica, materiales estructurales, etc., el uso de varios de estos materiales se encuentra todavía en desarrollo aunque ya se tienen conocimientos de importantes aplicaciones en alimentos y medicina. Entre los biopolímeros más concurrentes se encuentran la Celulosa y la Quitina (del griego χιτών chitón - túnica, envoltura), considerados los compuestos orgánicos más abundantes sobre la tierra, la celulosa refuerza la pared celular de plantas mientras que la Quitina forma parte del

exoesqueleto de artrópodos y la fuerza mecánica de la pared celular de hongos (Pacheco y col 2011).

A Quitina

La quitina fue aislada por primera vez por Braconnot en 1811, a partir de hongos superiores, y por su origen se denominó fungina (Velásquez 2003).

La Quitina es un polisacárido muy abundante en la naturaleza, que se encuentra principalmente en crustáceos, insectos y hongos. En los crustáceos aparece asociada a otros constituyentes, tales como proteínas, lípidos, pigmentos y carbonato de calcio. En general, la Quitina es obtenida por métodos químicos a partir de conchas de crustáceos que incluyen tratamientos con álcalis y ácidos, con modificación de condiciones como la temperatura, tiempo de reacción, concentración de álcalis y ácidos, entre otros (Mármol y col 2011; Zou y col 2016).

Los esqueletos de camarón y cangrejo son las principales fuentes para la producción de la Quitina a nivel comercial asociada con proteínas, minerales, lípidos y pigmentos; estos tienen que ser removidos para alcanzar el grado de pureza adecuado para diferentes aplicaciones tanto biológicas como tecnológicas. En el procesamiento industrial, la Quitina se extrae mediante tratamiento con ácido para disolver el carbonato de calcio seguido de una solución alcalina para disolver las proteínas. Además, a menudo se añade un paso de decoloración con el fin de eliminar pigmentos y obtener una Quitina pura incolora (Younes y Rinaudo 2015; Chien y col 2016).

Residuos biológicos de camarón crudo contienen Quitina unida en un complejo de 10-20% de calcio y de 30 a 45% de proteína. Se utilizan para la extracción de Quitina residuos biológicos de la industria del camarón, una mezcla de cáscaras, gambas y cabezas (Chatterjee y col 2005; Rao y Stevens 2005).

La Quitina ha despertado gran interés en los investigadores debido a que anualmente se obtienen en el mundo grandes volúmenes (120,000 TM) de desechos de crustáceos, los cuales contienen entre 14 y 35% de Quitina asociada con proteínas; por otro lado, la Quitina es de lenta degradación en el medio ambiente, por lo que estos desechos representan un gran problema de contaminación (Can y col 2013).

La Quitina posee una estructura lineal de peso molecular alto constituida por unidades de N-acetil-glucosamina unidas por enlaces β -D, se utiliza principalmente como materia prima para producir productos derivados, tales como Quitosano, quito-oligosacáridos y glucosamina (**Figura 1**). Este biopolímero aún permanece sin explotar industrialmente debido a que es altamente insoluble en disolventes acuosos y orgánicos y presenta baja reactividad, la cuestión de su solubilidad es un problema importante en el desarrollo tanto de procesamiento y uso de Quitina, así como su caracterización (Mármol y col 2011; Zhang y col 2014; Younes y Rinaudo 2015).

La Quitina es un polisacárido cristalino que cuenta con tres diferentes formas cristalográficas: α -, β -, y γ -quitinas. La α -quitina es la isoforma más abundante, se encuentra compactada dando una estructura cristalina donde sus cadenas se encuentran antiparalelas, favoreciendo los enlaces de hidrógeno. Se presenta en paredes de hongos, langosta y cangrejo, en tendones y en el exoesqueleto de camarones, así como en la cutícula de los insectos. Además de la Quitina nativa, α -quitina se forma sistemáticamente por recristalización a partir de solución de Quitina por la biosíntesis in vitro o polimerización enzimática debido a la alta estabilidad

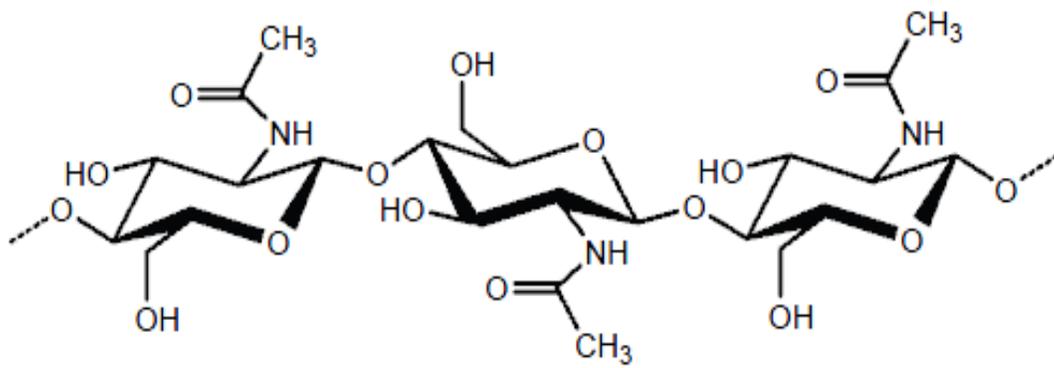


Figura 1. Estructura de Quitina (de Alvarenga 2011).

termodinámica de esta isomorfa (Younes y Rinaudo 2015). La β -quitina tiene un arreglo paralelo con una fuerza intermolecular más débil, dando una molécula menos estable de Quitina, se encuentra asociada con proteínas y en las plumas de calamar. La γ -quitina es una mezcla de las dos anteriores (Ramírez-Coutiño y col 2006).

Comparando la abundancia natural de las formas polifórmicas, encontramos que la α -quitina es la más abundante y estable mientras que las otras dos se presentan en pequeñas proporciones y tienden a ser transformadas en α -quitina (Hirano 1999).

1 Obtención de Quitina

La interacción entre Quitina y proteínas es muy íntimo y también hay una pequeña fracción de proteína que participa en un complejo proteína-polisacárido. Por lo tanto, el aislamiento de Quitina de crustáceos requiere la eliminación de los dos principales constituyentes de la cáscara, proteínas por desproteización y carbonato de calcio inorgánico por la desmineralización, junto con pequeñas cantidades de pigmentos y lípidos que se eliminan generalmente durante los dos pasos anteriores. En algunos casos, se aplica una etapa adicional de decoloración para eliminar pigmentos residuales. Muchos métodos se han propuesto y utilizado durante años para preparar Quitina, sin embargo no se ha adaptado algún método estándar. Diversos procesos de obtención de Quitina se han empleado, destacando los métodos químicos y biológicos (Teli y Sheikh 2012; Younes y Rinaudo 2015).

a Método químico

Los procesos químicos involucran la desmineralización y desproteización (DP) con ácidos y bases fuertes y temperaturas moderadas. Sin embargo, el tratamiento

químico puede causar la desacetilación parcial de la Quitina e hidrólisis del polímero dando como resultado una Quitina con propiedades físicas variables en el mismo proceso de obtención. Además, por medio de esta técnica, la extracción de Quitina, es muy baja ya que solamente se logra una recuperación del 58.6% (Marcia y col 2011).

Este método utiliza gran cantidad de agua y energía además da lugar a desechos corrosivos, los cuales son depositados en los ecosistemas acuáticos dañando la flora y fauna de los mismos, por lo que resulta un proceso agresivo para el medio ambiente, que requiere la implementación de etapas posteriores en el proceso para su necesaria neutralización, incrementando los costos totales (Radwan y col 2012). La mayoría de las industrias prefieren la extracción química debido al procesamiento constante y rápido y el producto final limpio, libre de impurezas que se requiere para aplicaciones sensibles, por ejemplo, en la medicina (Marcillo y Vélez 2011). Sin embargo la desventaja de este método es la utilización de condiciones químicas duras como es el uso de químicos peligrosos a altas temperaturas, que causan corrosión del equipo y la formación de subproductos indeseables tales como polímeros desacetilados de manera irregular (de Alvarenga 2011). Igualmente, el uso de ácidos químicos fuertes causa la hidrólisis de la Quitina y la inconsistencia de algunas de sus propiedades físicas, resultando en la reducción de su peso molecular y grado de acetilación (de la Paz y col 2012). Adicionalmente, el uso de grandes concentraciones de ácidos minerales y álcalis conduce a la contaminación ambiental (Gortari y Hours 2013). Este método causa un incremento de costos de procesamiento debido a problemas ambientales de disposición final de los residuos, entre otros factores. El método químico involucra además el uso de gran cantidad de agua y un consumo

relativamente alto de energía y la liberación de grandes corrientes de efluentes que contienen ácido corrosivo altamente concentrado y residuos alcalinos, así como una gran pérdida de compuestos bioactivos que pueden ser aislados del desecho de camarón tales como proteínas, pigmentos y ácidos grasos (Heidary-Vinche y col 2013).

Por ejemplo, la astaxantina es degradada bajo tales condiciones operacionales. Con el fin de superar los inconvenientes de los tratamientos químicos, se han estudiado métodos de aprovechamiento alternativos como algunos procesos biológicos, incluyendo el enzimático, microbiológico, así como la combinación de procesos químicos-biológicos (Younes y col 2014).

1) Desproteínización química

La desproteínización es un paso difícil debido a la interrupción de los enlaces químicos entre quitina y proteínas. Éste se realiza de forma heterogénea utilizando productos químicos que también despolimerizan el biopolímero. Una amplia gama de productos químicos han sido probados para la desproteínización incluyendo NaOH, Na₂CO₃, NaHCO₃, KOH, K₂CO₃, Ca(OH)₂, Na₂SO₃, NaHSO₃, CaCO₃, Na₃PO₄ y Na₂S. Las condiciones de reacción varían considerablemente en cada estudio. El NaOH es el reactivo preferencial y se aplica a una concentración que oscila entre 0.125 a 5.0 M, variando la temperatura (por encima de 160°C) y la duración del tratamiento (de unos minutos hasta unos pocos días). Además de la desproteínización, el uso de NaOH invariablemente resulta en desacetilación parcial de la Quitina y la reducción de su peso molecular por la hidrólisis del biopolímero (Younes y Rinaudo 2015).

2) Desmineralización química

La desmineralización consiste en la remoción de minerales, principalmente carbonato de calcio. Se lleva a cabo generalmente por tratamiento con ácido usando HCl, HNO₃, H₂SO₄, CH₃COOH y HCOOH. Entre estos ácidos, el reactivo preferente es ácido clorhídrico diluido (Mohammed y col 2013). La desmineralización se logra fácilmente, ya que implica la descomposición de carbonato de calcio en las sales de calcio solubles en agua con la liberación de dióxido de carbono como se muestra en la siguiente ecuación:



Los tratamientos para desmineralizar son a menudo empíricos y varían con el grado de mineralización de la muestra, tiempo de extracción, temperatura, tamaño de partícula, concentración de ácido y proporción soluto / disolvente. Esta última depende de la concentración de ácido, ya que necesita dos moléculas de HCl para convertir una molécula de carbonato de calcio (Younes y Rinaudo 2015).

3) Decoloración

La coloración de los caparzones de crustáceos se debe fundamentalmente a la presencia de pigmentos tales como la astaxantina, la cantaxantina, el astaceno, la luteína y el β- caroteno. Los tratamientos anteriores generalmente no son capaces de eliminar estos pigmentos, los que suelen extraerse a temperatura ambiente con acetona, cloroformo, éter, etanol, acetato de etilo o mezcla de disolventes. También se han empleado agentes oxidantes tradicionales, como el H₂O₂ (0.5–3%) y el NaClO (0,32%), aunque debe tenerse presente que éstos suelen atacar los grupos aminos libres e introducir modificaciones en el polímero. En caparzones fuertemente

coloreados, como el de la langosta común, se ha reportado la utilización exitosa de tratamientos con mezclas de acetona y NaClO a temperatura ambiente (Colina y col 2014). La calidad de la Quitina recuperada está influenciada principalmente por la concentración de álcali, la relación cáscara de camarón/álcali, tiempo de incubación y temperatura. La viscosidad de la Quitina incrementa con el aumento de las temperaturas de desproteización que van de 65°C a 100°C (Thakhiew y col 2013).

Los procedimientos químicos para la desproteización y descalcificación del caparazón del camarón para obtener Quitina pura siguen siendo los preferidos por la industria. Sin embargo, se requiere la optimización de la desproteización y descalcificación para ahorrar energía y costos de proceso (Teli y Sheikh 2012).

b Método Biológico

1) Ensilaje

El ensilado se define como un proceso de conservación en el cual los ácidos adicionados o producidos inhiben el crecimiento de patógenos, presenta ciertas ventajas respecto a los otros, como el permitir la recuperación de productos con valor agregado. El ensilaje de los caparazones y una producción ácido láctica por las bacterias ácido-lácticas induce la licuefacción del residuo semisólido y conducen a una disminución del pH y la activación de proteasas. Un efecto secundario del ensilado es la producción de ácido láctico por la fermentación de carbohidratos, que produce una desmineralización de los residuos y una precipitación parcial de los iones de calcio como lactato de calcio (Xia y col 2011). De hecho, bajo este método, el ácido láctico elimina la mayor parte de los minerales de los residuos de camarón, lo que presenta una ventaja con respecto a la desproteización proteolítica. Además, la Quitina

obtenida de esta manera tiene mayores peso molecular y cristalinidad que la extraída químicamente (Chatterjee y Guha 2014).

2) Hidrólisis enzimática

La hidrólisis enzimática está compuesta por un conjunto de tres reacciones simultáneas de ruptura de enlaces. Primero, la formación de un complejo enzima-sustrato (proteína), y posteriormente la ruptura del enlace peptídico dando como resultado la liberación de un péptido. Finalmente, el péptido restante se separa de la enzima después de un ataque nucleofílico de una molécula de agua (Hamer y col 2015). Un método alternativo para la hidrólisis de proteína y la obtención de Quitina es la hidrólisis enzimática, utilizando enzimas comerciales. Este método, en conjunto con la FAL, podría potencialmente usarse para hidrolizar la proteína residual presente en la Quitina obtenida del proceso fermentativo. Uno de los efectos que tiene el uso de enzimas para la obtención de Quitina es el impacto ambiental comparado con el método químico ya que no se utilizan reactivos químicos que dañan el medio ambiente (Kurek y col 2014; Aljawish y col 2015).

También se han probado procesos más amigables con el ambiente para el procedimiento de extracción de los residuos de camarón mediante el método químico usando la denominada química verde, la cual constituye una de las alternativas a los procesos que generan un deterioro del ambiente y tiene como objetivo lograr la sostenibilidad ambiental (Pacheco y col 2011).

3) Fermentación láctica

La fermentación láctica es un proceso celular anaeróbico donde se utiliza glucosa para obtener energía y donde el producto es el ácido láctico. Este proceso lo realizan

muchas bacterias (llamadas lácticas), hongos y algunos protozoos. En condiciones de ausencia de oxígeno (anaerobias), la fermentación responde a la necesidad de la célula de generar la molécula de NAD^+ , que ha sido consumida en el proceso energético de la glucólisis. En la glucólisis la célula transforma y oxida la glucosa en un compuesto de tres átomos de carbono, el ácido pirúvico, obteniendo dos moléculas de ATP; sin embargo, en este proceso se emplean dos moléculas de NAD^+ que actúan como aceptores de electrones y se reducen a NADH. Para que puedan tener lugar las reacciones de la glucólisis productoras de energía es necesario reoxidar el NADH; esto se consigue mediante la cesión de dos electrones del NADH al ácido pirúvico, que se reduce a ácido láctico. En la **Figura 2** se muestra el esquema de la fermentación láctica, que da una idea más clara de cada una de las etapas que tienen lugar en este proceso (Ramírez y col 2011).

La fermentación ácido láctica ofrece atractivas ventajas tales como bajos costos de inversión, y uso integral de los desechos, ya que se pueden separar productos de alto valor comercial (Zhang y col 2014). La fermentación se realiza en un reactor tipo columna con temperatura controlada y agitación ocasional, usando bacterias lácticas, dando como resultado una fracción sólida conteniendo la Quitina cruda y una fracción líquida (licor) rica en proteína natural de camarón, minerales y pigmentos (Cira y col 2002). En este proceso con microorganismos, las proteasas de los mismos provocan la hidrólisis de las proteínas (desproteínización) y la producción de ácido láctico de los microorganismos durante la fermentación, este ácido contribuye a la desmineralización al atacar al CaCO_3 . La fermentación láctica incrementa la estabilidad del desecho de

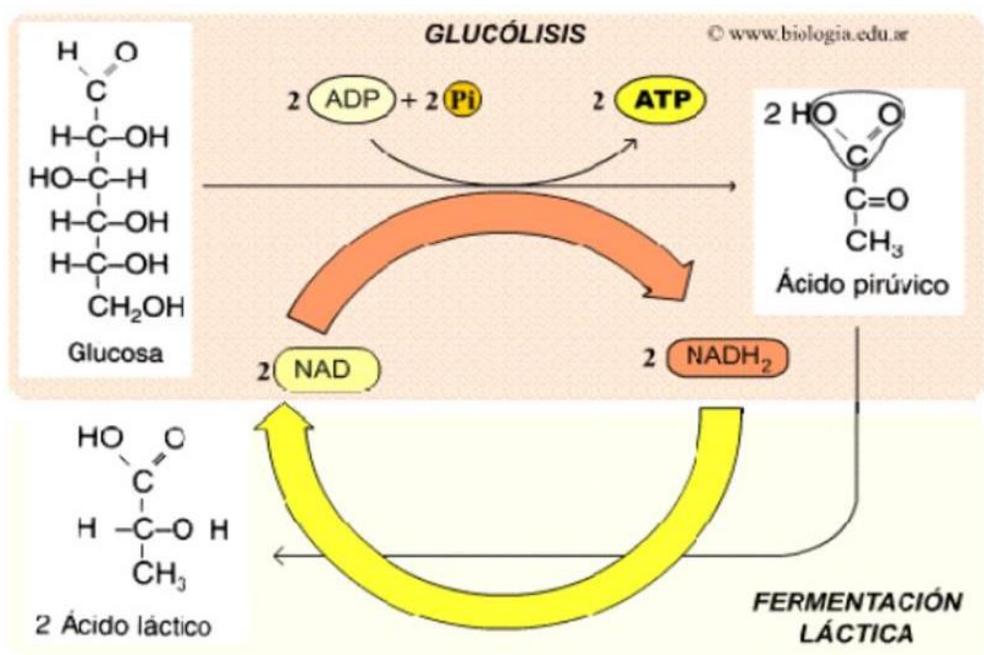


Figura 2. Esquema de fermentación láctica, en el cual se muestra los dos tipos de reacciones, energética y química que ocurren en la misma (Marcia y col 2011).

camarón. Este proceso combinado con el tratamiento termoquímico constituye un método para la purificación de la Quitina, reduciendo así la cantidad de ácidos y álcali requeridos en el tratamiento, conocido como proceso biológico-químico (B-Q) (Juárez 2010).

B QUITOSANO

El término Quitosano generalmente se refiere a una familia de polímeros obtenida después de la desacetilación de la Quitina en diversos grados. Fue descubierto en 1859 por Rouget al hervir quitina con KOH, convirtiéndose en una sustancia soluble en ácidos orgánicos. Le llamó Quitina modificada. El Quitosano es obtenido comercialmente mediante desacetilación alcalina de la Quitina. Es un biopolímero natural con propiedades funcionales importantes, el cual se extrae principalmente de las cáscaras de crustáceos y que constituye un desecho importante procedente de la industria pesquera (Chatterjee y col 2005; Bof y col 2015). Se han propuesto muchos métodos, pero el que más se ha reportado es aquel donde la Quitina es sometida a la acción del NaOH al 50% a temperatura de ebullición por un periodo de 3 horas. La calidad del Quitosano es determinada por las condiciones de desacetilación empleadas (Ahmed y col 2014).

Cuando la desacetilación del material de partida es incompleta se crea una mezcla de cadenas que tienen distintas proporciones de unidades $\beta(1-4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glucosa y $\beta(1-4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glucosa, dependiendo de diferentes factores, como la concentración de álcali, el tiempo de incubación, la relación de Quitina a los álcalis, temperatura, atmósfera, tipo de fuente de Quitina (incluyendo el tipo de polimorfismo), tamaño de partícula, desacetilación heterogénea / homogénea,

y el proceso simple o múltiple en la desacetilación alcalina de Quitosano juegan un papel importante ya que afectan las propiedades del mismo, generando materiales distintos. La diferencia en las propiedades de estos materiales puede llegar a ser notoria, como por ejemplo la diferencia en solubilidad acuosa (van den Broek y col 2015; Wang y col 2015).

El contenido de nitrógeno del Quitosano puro es aproximadamente del 6.89%, el grupo amino libre en la estructura del mismo proporciona un comportamiento marcadamente básico, además le confiere ciertas características fisicoquímicas de gran interés industrial. Este biopolímero adquiere el nombre de Quitosano cuando el grado de desacetilación de la Quitina es mayor o igual al 50%, y Quitano cuando es del 100%. Sus grupos amino permiten que se solubilice fácilmente en medios ácidos, confiriéndole una innumerable cantidad de aplicaciones (Park y col 2012; Li y col 2016).

El Quitosano puede disolverse en ácido acético al 1 a 2%, una viscosidad alta de esta solución es indicativa de un Quitosano bien preparado. Si se aplican condiciones muy rigurosas durante la desacetilación, la cadena principal de la Quitina se rompe y esto resulta en baja viscosidad del Quitosano disuelto en el ácido acético. Además, las moléculas rotas causan decoloración y condensación, resultando en una solubilidad y transparencias reducidas. Un Quitosano preparado adecuadamente tiene un contenido de cenizas bajo (<1%) y se disuelve bien en ácido acético dando una transparencia elevada (>90% de transmisión) (Rodríguez y Monserrat 2013).

En la **Figura 3** se muestra la estructura de quitina y Quitosano.

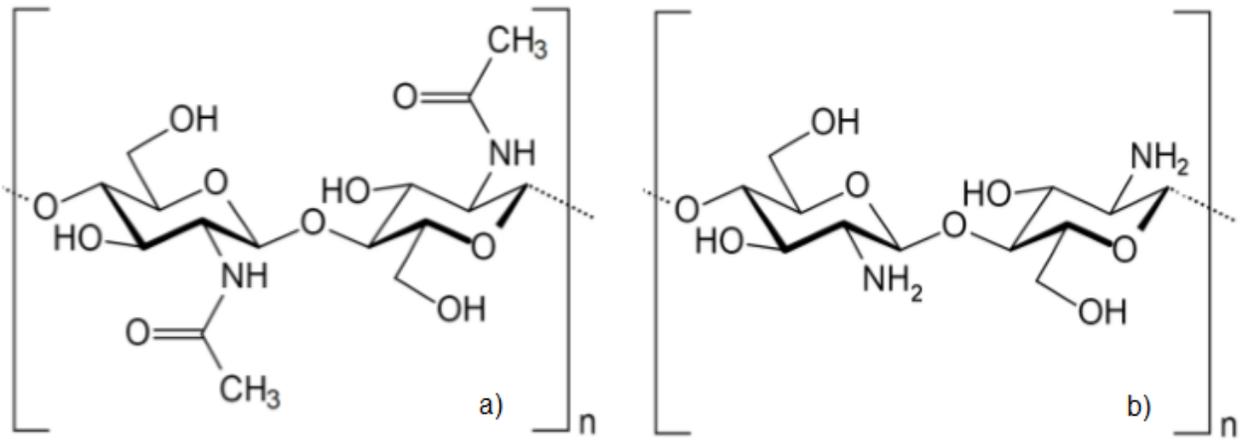


Figura 3. Estructuras químicas de a) Quitina y b) Quitosano (Younes y Rinaudo 2015).

1 Obtención de Quitosano

a Método biológico

Un método que permite la recuperación de todos estos elementos es el método enzimático, el cual ofrece una ventaja con respecto al método químico, que es la obtención de un material uniforme en sus propiedades físicas y químicas, hecho muy apreciado para aplicaciones biomédicas. La Quitina desacetilasa es la enzima que cataliza la conversión de Quitina a Quitosano por la desacetilación de los residuos N-acetil-D-glucosamina. La limitación de este método es que la enzima no es muy efectiva en la desacetilación de Quitina insoluble y por lo tanto es necesario un pre-tratamiento (Aljawish y col 2015; Hamer y col 2015).

b Método químico

Los métodos tradicionales de purificación de este biopolímero involucran el uso de altas concentraciones de ácidos y álcalis que producen corrosión y son agresivos con el ambiente. Es por ello que la fermentación es ideal para purificar los desperdicios de crustáceos ya que prácticamente no se produce contaminación y además se recuperan otros componentes de alto valor (Younes y Rinaudo 2015). La desacetilación de la Quitina se lleva a cabo mediante un método termoquímico, y de manera natural, se produce sólo con ciertos hongos (*Mucoraceae*). La Quitina se trata con solución alcalina concentrada (40% a 45% de hidróxido de sodio) y temperatura de 120°C/1-3 horas, sin embargo esta N-desacetilación casi nunca es completa y el Quitosano es considerado como un derivado de Quitina parcialmente N-desacetilada. Las condiciones usadas para la desacetilación determinan el peso molecular del polímero y el grado de desacetilación (Heidary-Vinche y col 2013).

1) Desacetilación homogénea

Consiste en la suspensión de la Quitina en el álcali y su refrigeración con hielo para disolver la Quitina en la solución. Luego se somete a desacetilación a temperaturas cercanas a la del ambiente durante largos periodos de tiempo. Esto permite que la reacción no se localice en determinados lugares de la cadena y que el ataque a los grupos amidas sea más uniforme (Czechowska-Biskup y col 2012; Giraldo 2015).

2) Desacetilación heterogénea

Consiste en la dispersión de las moléculas de Quitina en una solución alcalina caliente, generalmente de hidróxido de sodio. Las condiciones en las que se lleva a cabo la desacetilación heterogénea pueden reducir la longitud de la cadena, por este motivo es conveniente repetir varias veces el tratamiento alcalino por cortos periodos de tiempo y aislar el producto en cada etapa. Para evitar la disminución de peso molecular del polímero es conveniente la ausencia de oxígeno o la presencia de un antioxidante para evitar la despolimerización (Giraldo 2015). Dependiendo de la fuente de Quitina se utiliza NaOH acuoso al 30-60% (peso/volumen) o KOH a 60-140°C. Para prevenir la degradación del polímero se puede añadir NaBH₄ y tiofenol y la extracción se hace preferentemente en presencia de Nitrógeno. También es posible obtener Quitosano al tratar la Quitina con NaOH acuoso al 50% (peso/volumen) y 15 psi/121°C por 15 minutos (Luna-Estrada 2012; Rodríguez y Monserrat 2013)

El grado de desacetilación y el grado de polimerización, que a su vez determina el peso molecular (PM) del polímero, son dos parámetros importantes que permiten el uso de Quitosano en diversas aplicaciones. El grado de desacetilación varía de 40%

a 98% y el peso molecular oscila entre 5×10^4 y 2×10^6 KDa. Es importante destacar que pKa del Quitosano está cerca de la neutralidad (6.3). A pH <6.3, los grupos amino libres son protonados y cargados positivamente, por lo que el Quitosano se convierte en un polielectrolito catiónico soluble en agua. A pH > 6,3, los grupos amino libres se desprotonan y el Quitosano pierde su carga por lo que se convierte en insoluble (Bof y col 2015; Younes y Rinaudo 2015; Li y col 2016).

2 Propiedades físico-químicas de Quitosano

Las condiciones de temperatura, presión, concentración y tiempo determinan el grado de desacetilación y peso molecular del polímero (de Alvarenga 2011).

a Grado de desacetilación

El grado de desacetilación permite diferenciar el Quitosano de la Quitina y determina las propiedades químicas, físicas y biológicas del primero. Este parámetro refleja el balance entre las unidades repetitivas 2-acetilamina-2-desoxi- α -D-(+)-glucopiranososa y el 2-amino-2-desoxi- α -D-glucopiranososa, normalmente el Quitosano comercial tiene un grado de desacetilación del 70 al 90% y en algunas aplicaciones biomédicas se utiliza con un grado de desacetilación mayor al 95% (Wang y col 2015).

Una precisa determinación del grado de desacetilación es uno de los temas clave de la química de la Quitina. Durante los últimos 40 años se han empleado diferentes métodos tales como espectroscopía-IR (IR del inglés Infrared o del español Infra rojo), espectroscopía H-RMN (Resonancia Magnética Nuclear), titulación potenciométrica y espectroscopía-UV (UV del inglés Ultraviolet o del español Ultravioleta) (Zimmerman 2014).

1) Espectroscopía H-RMN

El cálculo del grado de acetilación (GA) se realiza de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$GA = \left[\left(\frac{1}{3} H_{AC} \right) / H_2 \right] 100 \quad (1)$$

Donde: GA: grado de acetilación, en porcentaje. H_{AC} : área del pico a 1.88-1.91 ppm asignada a los 3 protones del grupo metilo del acetilo. Se divide por este número de protones para normalizar. H_2 : área del pico a 3.00 ppm asignada al protón unido al carbono 2 correspondiente a la unidad monomérica del Quitosano desacetilado (Younes y col 2014).

2) Titulación potenciométrica

Se disuelve el Quitosano (100 mg) en un volumen conocido de HCl (0.1 mol L^{-1}), dicha solución es titulada con NaOH (0.01 mol L^{-1}), mientras se mide el pH de la solución a una fuerza iónica constante. El gráfico con la variación de pH en comparación con el volumen añadido de base tiene dos puntos de inflexión: la primera corresponde a la neutralización de HCl y la segunda a la neutralización de los iones de amonio de Quitosano. La diferencia entre los dos puntos de inflexión da la cantidad de grupos amino en el Quitosano (de Alvarenga 2011; de la Paz y col 2012).

El grado de desacetilación (GD) se obtiene con la siguiente fórmula:

$$GD (\%) = 100 - 16.1 \frac{V_2 - V_1 M}{W} \quad (2)$$

En esta ecuación, V_2 es el punto de inflexión mayor, V_1 corresponde al punto de inflexión menor, expresados como volúmenes de NaOH, M es la molaridad de la

solución de NaOH (mol/L), W es el peso del Quitosano empleado (expresado en g) y 16.1 es un valor relacionado al peso del grupo amino (-NH₂) (Hernández y col 2009; Giraldo 2015).

3) Espectroscopía-UV

Este método fue propuesto en 1985 por Muzzarelli y Rochetti y hace uso de la primera derivada de los espectros UV de la N-acetil-D-glucosamina (NAG), del Quitosano y de disoluciones de ácido acético. El grado de acetilación se calcula haciendo uso de la ecuación siguiente, que relaciona la concentración de NAG determinada por medio de la curva patrón y la concentración de Quitosano empleada en el ensayo (Hajji y col 2014):

$$\%GA = \frac{[NAG]}{[Quitosano]} \times 100 \quad (3)$$

4) Espectroscopia de infrarrojo (IR)

Debido a su simplicidad es uno de los métodos más empleados. Este método se aplica especialmente cuando se tienen muestras que no pueden formar soluciones acuosas ácidas, como es el caso de las Quitinas, para ello se prepara una solución al 2%, con 100 mg de KBr. Este método consiste en correlacionar la relación de absorbancias entre dos bandas de absorción determinadas, con el porcentaje de acetilación de Quitina. La selección de las bandas de absorción involucra una señal que depende del grado de N-acetilación (normalmente una de las bandas amida) y otra que sirve de referencia interna para corregir las diferencias de grosor de las películas o de concentración en las pastillas de KBr.

$$GA(\%)=31.92\left(\frac{A_{1320}}{A_{1420}}\right) \quad (4)$$

$$GD(\%)=100-GA \quad (5)$$

En todas las determinaciones por IR, es muy importante la selección adecuada de las líneas base en el cálculo de la absorbancia para alcanzar buenos resultados (Colina y col 2014).

b Solubilidad

El Quitosano tiene una pobre solubilidad en disolventes orgánicos y la insolubilidad completa en soluciones acuosas por encima de pH 7 debido a la alta cristalinidad y la capacidad de enlaces de hidrógeno entre las macromoléculas de Quitosano. La reducción del peso molecular y la cristalinidad mejora su solubilidad en ácidos diluidos por debajo de pH 5, donde los grupos amino libres son protonados, los factores que se deben tener en cuenta cuando se solubiliza son el grado de desacetilación y la distribución de los grupos acetilos y aminos a lo largo de la cadena del biopolímero (Aljawish y col 2015).

El grado de ionización es importante también y generalmente el Quitosano se disuelve a alrededor de un valor del 50% (Rêgo y col 2013). El mejor solvente para solubilizar el Quitosano es el ácido fórmico, el más utilizado es el ácido acético, también es soluble en ácido clorhídrico, ácido nítrico y ácido cítrico, es insoluble en ácido sulfúrico y fosfórico (Puga-López y col 2013).

c Toxicidad

El Quitosano es considerado no tóxico y como un polímero biológicamente compatible con los seres vivos (Dragostin y col 2016). Se ha establecido que este polisacárido no puede ser digerido por los humanos, por lo que se considera como una fibra con cero calorías (Hernández 2013).

d Peso molecular

Para cualquier polímero, la solubilidad y la viscosidad dependen de su peso molecular, pero para el Quitosano su efecto se extiende a sus propiedades biológicas, por lo que la determinación de su masa atómica adquiere una gran importancia. Si se logra conocer el peso molecular y la conformación de las moléculas del biopolímero, se puede estimar una gran cantidad de propiedades reológicas y mecánicas, como su coeficiente de fricción y de sedimentación, su volumen hidrodinámico, entre otras (Dragostin y col 2016). Para la determinación del peso molecular de los polímeros, existen varios métodos. El más empleado es el método por viscosimetría capilar (Niu y col 2013).

Por medio de un ensayo de viscosimetría se puede calcular el peso molecular del Quitosano. Para implementar dicha técnica es necesario utilizar diferentes definiciones de viscosidad para transformar la viscosidad cinemática (medida) en la viscosidad reducida, ya que a partir de esta última se puede determinar la viscosidad intrínseca y el peso molecular (Sun y col 2014).

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (6)$$

Dónde: η_r es la viscosidad relativa, η es la viscosidad de la solución y η_0 es la viscosidad del solvente puro.

Viscosidad específica:

$$\eta_{SP} = \eta_r - 1 \quad (7)$$

Viscosidad reducida:

$$\eta_{red} = \left(\frac{\eta_{SP}}{C} \right) \quad (8)$$

Viscosidad intrínseca:

$$[\eta] = \left(\frac{\eta_{SP}}{C} \right)_{C \rightarrow \infty} \quad (9)$$

Conociendo la viscosidad intrínseca se puede determinar el peso molecular en las muestras analizadas, siempre y cuando el polímero obedezca la ecuación de Huggins; esto es, si presenta un comportamiento lineal entre la concentración y la viscosidad reducida:

$$\frac{\eta_{SP}}{C} = [\eta] + K[\eta]^2 C \quad (10)$$

En las ecuaciones (8), y (10) el parámetro C hace referencia a la concentración de Quitosano en la solución.

La viscosidad intrínseca mide el volumen específico efectivo de un polímero aislado, razón por la que su determinación se realiza extrapolarlo a concentración nula. Su valor depende del tamaño y forma de la molécula de soluto, así como de su interacción con el solvente y de la temperatura de trabajo. Para un sistema polímero-

solvente puede utilizarse la expresión de Mark-Houwink para determinar el peso molecular promedio del polímero (Zhang y col 2014).

$$\bar{M}_v = \left(\frac{[\eta]}{1.81 \times 10^{-3}} \right)^{\frac{1}{0.93}} \quad (11)$$

3 Propiedades biológicas

La Quitina y el Quitosano son biopolímeros no tóxicos, biocompatibles y biodegradables que presentan propiedades biológicas y farmacéuticas. Su bioactividad incluye la estimulación en procesos de cicatrización, actividad hemostática, actividad inmune, mucoadhesión, actividad antimicrobiana, bacteriostática y fungistática (Dutta y col 2009; Dragostin y col 2016).

a. Actividad antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana del Quitosano es útil en la medicina, la agricultura y en conservación de alimentos, los usos y el modo de acción han sido ampliamente estudiados. Esta actividad depende de las propiedades del biopolímero (Ahmed y col 2014). Se ha demostrado que inhibe el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacilo subtilis*, y *Staphylococcus aureus*, El Quitosano también ha mostrado actividad fungistática inhibiendo el crecimiento de hongos como *Botritis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera sorokina*, *Micronectriella nivalis*, *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Trichophyton equinum* (Pacheco 2010). La acción antimicrobiana está influenciada por factores intrínsecos como el tipo de Quitosano, el grado de despolimerización, el hospedero, la composición nutritiva y química del sustrato, pH del medio de cultivo, condiciones ambientales y la presencia o ausencia de sustancias que interfieran, como lípidos y proteínas. A pesar de que el

Quitosano y sus derivados son efectivos como agentes antimicrobianos, existe una clara diferencia entre ellos. La actividad inhibitoria del Quitosano ha sido demostrada contra hongos fitopatógenos, siendo más alta a pH 6.0 que a pH 7.5 (Tayel y col 2014; Dragostin y col 2016)

4 Aplicaciones de Quitosano

Entre las numerosas propiedades funcionales que se le han comprobado están: biodegradabilidad, biocompatibilidad, actividad antimicrobiana, actividad antifúngica, actividad hipocolesterolémica, actividad antioxidante, mucoadhesión, hemostático y promotor de absorción (Younes y Rinaudo 2015; Dragostin y col 2016). Estas propiedades funcionales del biopolímero han promovido su utilización a lo largo de los años en varios campos como son la agricultura, la industria alimentaria y farmacéutica y la medicina. La carga positiva que inducen los grupos amino da al Quitosano la capacidad de atrapar sustancias como macromoléculas, proteínas, lípidos, metales, etc., cargados negativamente. Esta propiedad junto con las anteriores hace que éste tenga un gran potencial para diferentes aplicaciones (**Cuadro 1**).

a Tratamiento de agua

Ésta es una de las áreas de mayor importancia, ya que la Quitina y el Quitosano son materiales ambientalmente amigables, entre los principales usos en esta área está como coagulante primario para aguas residuales de alta turbidez y de alta alcalinidad; como floculante para la remoción de partículas coloidales sólidas y aceites, y para la captura de metales pesados y pesticidas en soluciones acuosas (Lárez-Velásquez 2006).

Cuadro 1. Aplicaciones y usos de Quitosano

APLICACIONES	USOS
Tratamiento de aguas y efluentes industriales	Remoción de iones metálicos y pesticidas: remoción de fenoles, radioisótopos, PCBs y colorantes, recuperación de materiales sólidos de la industria alimenticia (proteínas, polisacáridos, etc.), agente coagulante.
Ciencia de los materiales	Elaboración de microesferas, recubrimientos, fibras, nanofibras, películas, polvos, esponjas, soluciones, geles, tabletas, cápsulas, entre otros.
Medicina	Gasas, algodón, contenedor artificial de sangre, control de colesterol, inhibidor tumoral, membranas, inhibición de placas dentarias, cicatrización de heridas, piel artificial, tratamientos de enfermedades óseas, lentes de contacto, membranas de diálisis, anticoagulante, implantes, suturas, ortopedia, anticoagulante, tratamiento de tumores(leucemia), liberación de insulina.
Agricultura	Recubrimientos de semillas y frutas (films), sistemas liberadores de fertilizantes, fungicida, antivirósico, aditivo para alimento de animales, formulación de pesticidas.
Alimenticia	Remoción de colorantes, conservantes, estabilizante de color, exaltador del sabor natural, preservante, antioxidante, emulsionante, aditivo de alimentos para animales.

Fuentes: Caprile 2005; Younes y Rinaudo 2015.

El Quitosano ha mostrado ser un buen coagulante en la potabilización de aguas, ya que la presencia de grupos aminos en su estructura le confieren capacidad para coagular sustancias coloidales, además de que su uso permite aumentar la acción de coagulantes inorgánicos convencionales. Razón por la cual resulta muy atractivo su uso como coagulante en el tratamiento de aguas industriales. Algunos estudios vinculan al aluminio y sus derivados usados como agentes floculantes en el tratamiento de aguas para consumo humano con enfermedades tan graves como el mal del Alzheimer, por lo que actualmente se están desarrollando múltiples investigaciones, en las cuales la Quitina y el Quitosano han sido ensayados para estos fines y los resultados están siendo aplicados en algunos procesos de desmetalización, coagulación y floculación (Mármol y col 2011).

b Ciencia de los materiales

Las características de estructura química y las propiedades físicas son especialmente importantes, ya que abre un gran campo de aplicaciones. En los últimos años se han elaborado biomateriales derivados de la Quitina y Quitosano, como microesferas, recubrimientos, fibras, nanofibras, películas, polvos, esponjas, soluciones, geles, tabletas, cápsulas, entre otros, muchos de estos biomateriales son usados en el área de alimentos, de cosméticos, farmacia y biomedicina (Juárez 2012; Ahmed y col 2014).

c Ciencia médica y farmacéutica

El Quitosano y sus formas derivadas son empleadas con éxito en diversos ámbitos de la medicina y en otros su aplicación está en fase de estudio y desarrollo.

- Por sus propiedades antimicrobianas (activa Quitanasa y β -gluconasa): su histocompatibilidad y su capacidad de retención de humedad y de liberación controlada de sustancias así como de sus propiedades mecánicas (elasticidad), las moléculas de Quitosano forman parte de vendajes, lentes de contacto, gotas oftalmológicas, cremas y recubrimientos para quemaduras, heridas y úlceras, suturas quirúrgicas reabsorbibles, implantes y cultivos de tejido (eliminando la contaminación por microorganismos) (Honary y col 2011).
- Control de colesterol sanguíneo: en los últimos años algunos estudios han demostrado la capacidad del Quitosano para reducir de forma efectiva la absorción de la grasa de la dieta, reducir la presión sanguínea y disminuir los niveles de colesterol sérico. Todo ello gracias a un mecanismo formador de enlaces iónicos con los que se fija a los diferentes tipos de aniones, tales como ácidos biliares o ácidos grasos libres, y a su capacidad para formar micelas con el colesterol, con lo que disminuye la absorción del ácido cólico y su aporte al hígado (Zimmerman 2014).
- En sistemas de liberación controlada, debido a la capacidad del Quitosano de poder formar membranas interpenetradas lo que hace posible su utilización en sistemas de liberación controlada de fármacos, membranas para la ultrafiltración y actualmente como matriz orgánica parcial o totalmente biodegradable (Hernández 2013).

d Microbiología

El Quitosano y sus derivados tienen actividad antimicrobiana contra bacterias, hongos y levaduras. El mecanismo exacto de la acción antimicrobiana del Quitosano y sus derivados es todavía desconocido, si bien se han propuesto diferentes hipótesis. Todas estas teorías están relacionadas con su naturaleza catiónica que le permite reaccionar con moléculas y superficies cargadas negativamente como las paredes celulares microbianas. El Quitosano tiene la habilidad de producir fitoalexina, fenoles y callosa, promoviendo su característica antimicrobiana frente a diversos microorganismos (Hernández 2013; Zhu y col 2015).

e Inmunología

La Quitina y sus derivados son efectivos en el control de enfermedades y plagas vegetales. Sus mecanismos de acción están vinculados a su estructura química. Pueden actuar sobre el organismo patógeno, o inducir mecanismos defensivos en las plantas, contra varias enfermedades vegetales antes y después de la cosecha (Dutta y col 2009).

f Agricultura

El Quitosano modifica la respuesta que la planta presenta hacia ciertos agentes externos como las plagas, así como estimula el crecimiento de las plantas, permitiendo un mayor desarrollo de elementos como raíces y extremidades. También su aplicación en semillas ayuda a la germinación y un sano desarrollo de las plántulas (Tayel y col 2014). La adición de Quitosano al suelo, favorece el crecimiento y actividad de muchos microorganismos quitinolíticos, por un efecto sinérgico. Éstos constituyen controles biológicos y son enemigos naturales de muchos agentes causantes de plagas y

enfermedades vegetales. Además, favorecen el crecimiento de microorganismos beneficiosos que establecen relaciones simbióticas con las plantas, tales como micorrizas o especies del género *Rhizobium*. A su vez incrementa la población y actividad microbiana en el suelo, lo que mejora la disposición de nutrientes y sus propiedades. Como reguladores del crecimiento, acelera la germinación de las semillas, el vigor de las plantas y el rendimiento agrícola. Por tanto, por su gran potencial de aplicación en la agricultura, podemos decir que en un tiempo futuro este tipo de biopolímeros, se utilizarán con mayor extensión, principalmente como sustitutos de los actuales plaguicidas químicos o como reguladores de crecimiento de las plantas (Mármol y col 2011).

g Alimentos

El Quitosano ofrece un amplio espectro de aplicaciones. La mayoría se relaciona con su actividad antimicrobiana, por ejemplo, su uso como conservante en el empaquetamiento y en películas comestibles que recubren alimentos, y su empleo también como conservante en emulsiones. La capacidad de unirse a grasas permite su utilización como agente hipocolesterolémico en productos dietéticos. Por otro lado, se han estudiado las propiedades tecnológicas como espesante, gelificante y emulgente. Al formar emulsiones con las proteínas del suero lácteo mejora su estabilidad. Además se emplea como agente quelante y floculante para tratamiento de aguas residuales resultantes del procesamiento de alimentos y para clarificación de bebidas (López 2012).

- Aditivo en los alimentos: por sus propiedades como espesante, gelificante y emulsificante se emplean como mejoradores de textura, ya que fijan agua y

grasa. También se emplean como estabilizantes de color, como agente que previene la precipitación en el vinagre, como aditivos con características nutricionales (fibra dietética, ingrediente funcional), en galletas y pan (previene la disminución del volumen de la masa), como aditivo para la alimentación animal (hasta el 10% en alimentación en pollos) aumenta el crecimiento, el vigor y el incremento de bifidobacterias en el buche que bloquean el desarrollo de otros microorganismos y generan lactasa. También son utilizadas en harinas de mariscos las cuales contienen proteína, Quitina y Astaxantina, y se emplean en la alimentación de salmón (Wang y col 2015).

- Envoltura y recubrimiento protector de alimentos: los recubrimientos con Quitosano son resistentes, duraderos y flexibles con propiedades mecánicas similares a los polímeros comerciales de fuerzas medias. Las películas comestibles también son empleadas junto con otros elementos en recubrimientos para frutas (N, O-carboximetilquitina) retrasando el envejecimiento, disminuyendo la oxidación, las pérdidas por transpiración y protegiendo contra el ataque de hongos (Islam y col 2011).
- Su acción como protector de alimentos frente a microorganismos (concentraciones de 0 a 0.02% protegen frente *E. coli*) como bacterias, levaduras y hongos. Es interesante para la obtención de alimentos mínimamente procesados y para retrasar la aparición de sabores extraños en la carne (Cardoso y col 2012).

1) Mecanismo

Los mecanismos de actividad antimicrobiana no han sido explicados completamente. Se han propuesto seis mecanismos importantes en la literatura,

1. El carácter antimicrobiano se le atribuye a la presencia de grupos amino con carga positiva que interaccionan con las cargas negativas de los fosfolípidos formadores de membrana celular de bacterias y hongos; al adherirse el Quitosano a la membrana, provoca alteraciones en proteínas y diversos compuestos y causa una filtración a través de ella hasta llegar al citosol; éste utiliza energía para atravesar la membrana, sin embargo, este proceso no involucra la endocitosis. Las bacterias y hongos normalmente mantienen en su citosol niveles muy bajos de Ca^{2+} , esto es gracias a la barrera que forma la membrana plasmática, la cual posee reguladores herméticos que impiden el paso libre de gradientes de Ca^{2+} , este proceso en el que también se involucra al mecanismo homeostático, donde en el interior del citosol se regula la concentración de este ion, enviando fuera de la célula al exceso, o los almacena en organelos de la propia célula. Por lo tanto, al introducirse el Quitosano al interior del citosol se transforma drásticamente el mecanismo homeostático, ya que al formar canales en la membrana permite el paso libre de gradientes de calcio, además de causar la fuga de otros componentes intracelulares, ocasionando una inestabilidad en la célula hasta su muerte (Cardoso y col 2012).
2. Interacciones entre los grupos amino de Quitosano con carga positiva y las membranas de las células microbianas con carga negativa, que conduce a la

fuga de los componentes proteicos intracelulares y otros (Alishahi y Aïder 2012).

3. La acción de Quitosano como un agente quelante, se une selectivamente a metales y posteriormente inhibe la producción de toxinas y el crecimiento microbiano (Ramos-García y col 2010).
4. La formación, generalmente por Quitosano de alto peso molecular, de una capa polimérica impermeable en la superficie de la célula, alterando de este modo la permeabilidad celular y bloqueando la entrada de los nutrientes en la célula (Alishahi y Aïder 2012).
5. La penetración de Quitosano de peso molecular bajo, principalmente en el citosol del microorganismo a unirse al ADN, lo que resulta en la interferencia con la síntesis de ARNm y proteínas (Kim y col 2011).
6. La adsorción y la floculación de sustancias electronegativas en la célula por Quitosano, distorsionando las actividades fisiológicas de los microorganismos, provocando su muerte. Sin embargo, es muy importante mencionar que el Quitosano es soluble sólo en medios ácidos y por lo tanto, el efecto del pH sobre los microorganismos debe ser considerado junto con el efecto del biopolímero. Así, el efecto sinérgico de Quitosano / pH juntos es probablemente la explicación más evidente del efecto antimicrobiano (Arancibia y col 2014).

C ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

1 Metodología de superficie respuesta (MSR)

La Metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas utilizadas en el tratamiento de problemas en los que una respuesta de

interés está influida por varios factores de carácter cuantitativo. El propósito inicial de estas técnicas es diseñar un experimento que proporcione valores razonables de la variable de respuesta y, a continuación, determinar el modelo matemático que mejor se ajusta a los datos obtenidos (Ghorbel-Bellaaj y col 2013). El objetivo final es establecer los valores de los factores que optimizan el valor de la variable de respuesta. Cuando decimos que el valor real esperado, η , que toma la variable de interés considerada está influido por los niveles de k factores cuantitativos, X_1, X_2, \dots, X_k , esto significa que existe alguna función de X_1, X_2, \dots, X_k (que se supone continua en $X_i = 1, \dots, k$) que proporciona el correspondiente valor de η para alguna combinación dada de niveles:

$$\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k) \quad (12)$$

De tal forma que la variable respuesta puede expresarse como:

$$Y = \eta + \varepsilon = f(X_1, X_2, \dots, X_k) + \varepsilon \quad (13)$$

Donde ε es el error observado en la respuesta. La relación $\eta = f(X_1, X_2, \dots, X_k)$ existente entre η y los niveles de los k factores puede representarse a través de una hipersuperficie (subconjunto de un espacio euclídeo $[(k+1) - \text{dimensional}]$) a la que llamaremos superficie de respuesta (**Figura 4**) (Godoy 2008).

a. Gráfica de contornos

Una técnica utilizada para ayudar a visualizar la forma que puede tener una superficie de respuesta tridimensional consiste en representar la gráfica de contornos de la superficie, en la que se trazan las denominadas líneas de contornos, que son

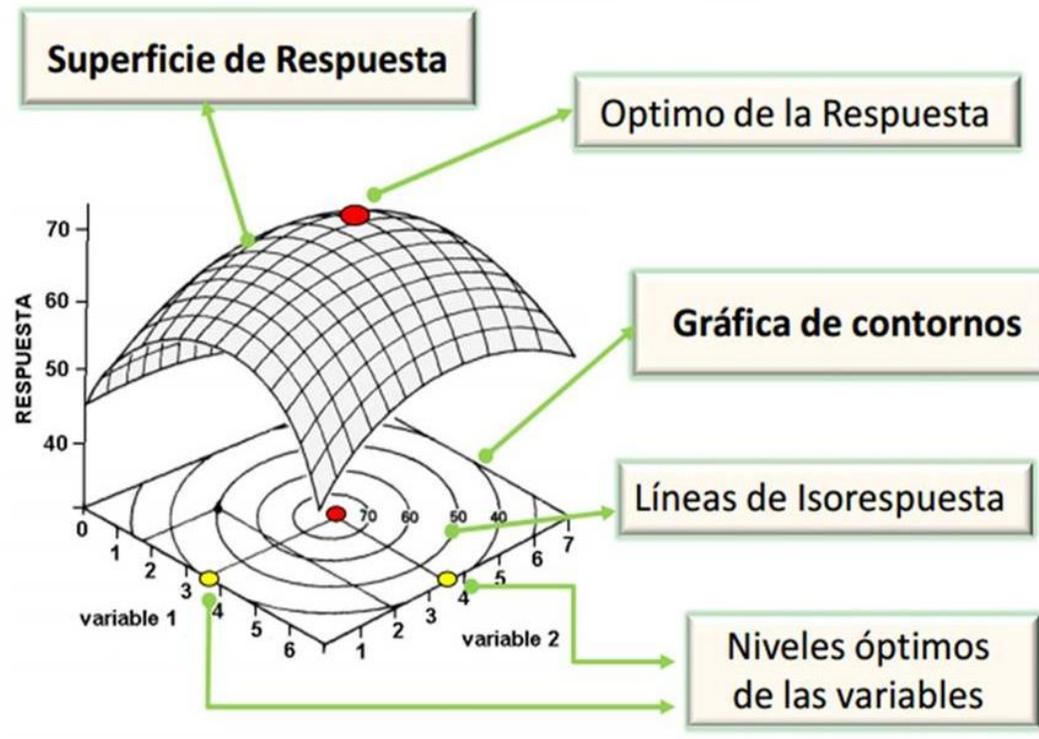


Figura 4. Gráfica de superficie de respuesta, en la cual se muestran las diferentes secciones y nombres de las mismas (Bezerra y col 2008).

curvas correspondientes a valores constantes de la respuesta sobre el plano X_1X_2 (plano cuyos ejes coordenados vienen dados por los niveles X_1 y X_2 de los factores). Geométricamente, cada línea de contorno es una proyección sobre el plano X_1X_2 de una sección de la superficie de respuesta al intersectar con un plano paralelo al X_1X_2 . La gráfica de contornos resulta útil para estudiar los niveles de los factores en los que se da un cambio en la forma o altura de la superficie de respuesta. La existencia de gráficas de contornos no está limitada a 3 dimensiones a pesar de que en el caso en que haya más de 3 factores de influencia no es posible la representación geométrica. No obstante, el hecho de poder representar gráficas de contornos para problemas en que haya 2 ó 3 factores permite visualizar más fácilmente la situación general. Para generar la gráfica de contornos correspondiente se secciona la superficie de respuesta usando planos paralelos al X_1X_2 en ciertos valores de respuesta considerados. En la **Figura 5** se muestra un ejemplo de una gráfica de contornos (Bezerra y col 2008).

D Productos mínimamente procesados

Las frutas y hortalizas frescas son componentes esenciales de la dieta humana. Existen evidencias de beneficios nutricionales y a la salud, asociados al consumo de estos alimentos. En USA, Canadá, Nueva Zelanda y varios países de la Unión Europea, Instituciones de Salud Pública han desarrollado campañas recomendando el consumo diario de, por lo menos, cinco frutas u hortalizas. Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de frutas tiene un efecto benéfico para la salud y

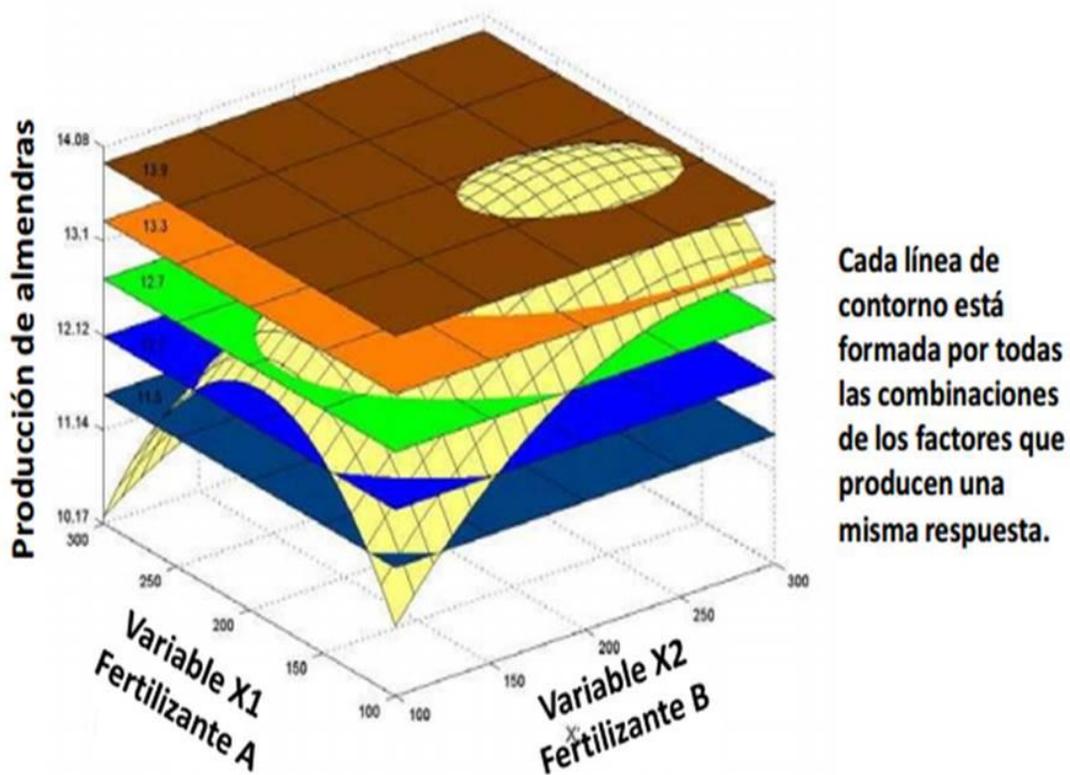


Figura 5. Gráfica de contornos y las diferentes secciones de la misma y qué representa cada una de ellas (Bezerra y col 2008).

contribuye a la reducción de riesgo de enfermedades degenerativas, particularmente aterosclerosis y cáncer. Esta prevención de enfermedades posiblemente se debe a la presencia de carotenoides, compuestos fenólicos, flavonoides y vitamina C, que promueven la buena salud, mediante la inhibición de la iniciación o impedimento de la propagación de las reacciones que causan daño oxidativo (Bierhals y col 2011).

En los últimos años un gran cambio en los patrones de consumo viene ocurriendo en la sociedad, en respuesta a la demanda del mercado. Los consumidores piden productos de alta calidad, listos para su consumo, semejantes a los frescos y conteniendo ingredientes naturales. Así, la tecnología de alimentos con procesamiento mínimo surge tratando de satisfacer la necesidad del consumo de vegetales frescos, adaptándose a la tendencia contemporánea en que el tiempo disponible para la preparación de las comidas es limitado. Por otro lado, el procesamiento mínimo de frutas y hortalizas se muestra como una alternativa tecnológica, aumentando el valor agregado de los productos y contribuyendo para un mayor desarrollo de la agroindustria (Sanjinez-Argandoña y col 2010).

1 Definición

El procesamiento mínimo describe tecnologías para procesar alimentos, que garantizan su seguridad y conservación, así como, el mantenimiento de la fresca característica de las frutas y hortalizas. Los vegetales mínimamente procesados son definidos como cualquier fruta u hortaliza que ha sido alterada físicamente (selección, lavado, pelado, deshuesado y/o cortado) a partir de su forma original pero que mantiene su estado fresco, sin procesamiento riguroso, tratados con agentes desinfectantes, estabilizadores de color, retenedores de firmeza y envasados en

bolsas o bandejas creando una atmósfera modificada en su interior. Otros términos para tales productos son: ligeramente procesado, parcialmente procesado, procesado en fresco, precortado, IV gama y listo para consumirse. Son conservados, distribuidos y comercializados bajo refrigeración (2–5 °C) y están listos para ser consumidos durante 7 a 14 días, según el producto y técnica de conservación empleada (Bierhals y col 2011; Ayón-Reyna y col 2015). Sin embargo, las operaciones del procesamiento mínimo dañan la integridad del tejido de las frutas y hortalizas, lo que desencadena procesos deteriorativos como pardeamiento enzimático, ablandamiento del tejido, pérdida de peso, desarrollo indeseable de olores y sabores. Adicionalmente, la remoción de la epidermis protectora natural y el incremento de humedad y azúcares disueltos en la superficie proveen las condiciones ideales para el crecimiento microbiano. El siglo XXI está siendo testigo de las innovaciones y técnicas que se han introducido en el campo de la conservación de los alimentos. Estas innovaciones son el resultado de la demanda de los consumidores de todo el mundo por alimentos de alta calidad, con mayor énfasis en los atributos de calidad y seguridad. Una de las principales demandas de los consumidores es por un mínimo proceso, alta nutrición y baja energía en los alimentos naturales, con conservantes químicos mínimos o nulos.

El reciente interés en estas tecnologías no es sólo para obtener alimentos de alta calidad con características frescas, sino también, para proporcionar alimentos con funcionalidades mejoradas (Villacorta y col 2015).

2 Ventajas de los productos mínimamente procesados

Los vegetales mínimamente procesados poseen componentes esenciales que representan en la dieta humana beneficios para la salud, además de los nutricionales;

algunas de estas sustancias son conocidas como antioxidantes y en general se denominan fitoquímicos. Los cambios en el consumo alimenticio han producido la demanda de una gama más amplia de vegetales mínimamente procesados, debido a que dichos productos ayudan a hacer la vida más fácil, permitiendo preparar comidas saludables y agradables, con ahorro de tiempo significativo y con una reducción en la producción de residuos, ya que el consumidor se lleva a casa sólo la parte comestible del producto. Estas tendencias han llevado a la aparición de nuevas presentaciones de los vegetales cuarta gama (mezclas de hortalizas cortadas o frutas mínimamente procesadas), en las cuales lo que se busca es complementar nutrientes como las vitaminas, minerales y antioxidantes aportados por los diferentes vegetales que conforman la mezcla (Hernández y col 2014; Molina y col 2015).

Según informaciones de algunas cocinas industriales, las principales ventajas de las frutas y hortalizas mínimamente procesadas son el menor costo final de la producción, la estandarización del producto y la menor generación de residuos dentro de la cocina. El precio de compra superior del vegetal mínimamente procesado, en relación al producto en fresco, absorbe los costos que la cocina industrial no tendrá como: almacenaje, mano de obra, basura, pérdidas, desperdicios y hasta mantenimiento. La cuestión del espacio también es un punto a favor de los vegetales mínimamente procesados (Ayón-Reyna y col 2015).

3 Proceso de preparación

La obtención de un producto mínimamente procesado de calidad radica en la adecuada selección de la materia prima y en la optimización de todas las etapas tecnológicas necesarias para su elaboración y mantenimiento de la calidad sensorial,

higiénico-sanitaria y nutricional (Ayón-Reyna y col 2015). Por lo general requiere para su procesamiento de operaciones tales como limpieza, corte, lavado, secado y envasado, higienizados mediante derivados clorados, peróxido de hidrógeno, ozono, compuestos antimicrobianos naturales y otros; tratados con agentes estabilizadores de color tales como ácido ascórbico y eritórbito, retenedores de firmeza (sales de calcio) y envasados en bolsas o charolas con la inyección de distintos sistemas gaseosos que permitan mantener una atmósfera modificada en su interior (Hernández y col 2014). En la **Figura 6** se muestra el diagrama de flujo del procesado de productos vegetales cortados.

Los frutos y vegetales frescos cortados son procesados en instalaciones refrigeradas, es decir, en un ambiente donde se mantiene una temperatura entre 0° y 7° Celsius con el objetivo de mantener las características del producto fresco (Tirkey y col 2014). Además, una vez procesados deben continuar la cadena de frío conservándolos a temperatura baja durante su distribución y comercialización, ya que en su forma cortada no sufren daño por frío cuando se almacenan a 4°C (Bierhals y col 2011).

4 Factores que afectan la calidad

La velocidad de deterioro después del procesamiento depende de muchos factores relacionados con el producto, el procesamiento y las condiciones de almacenamiento (Argañosa y col 2008).

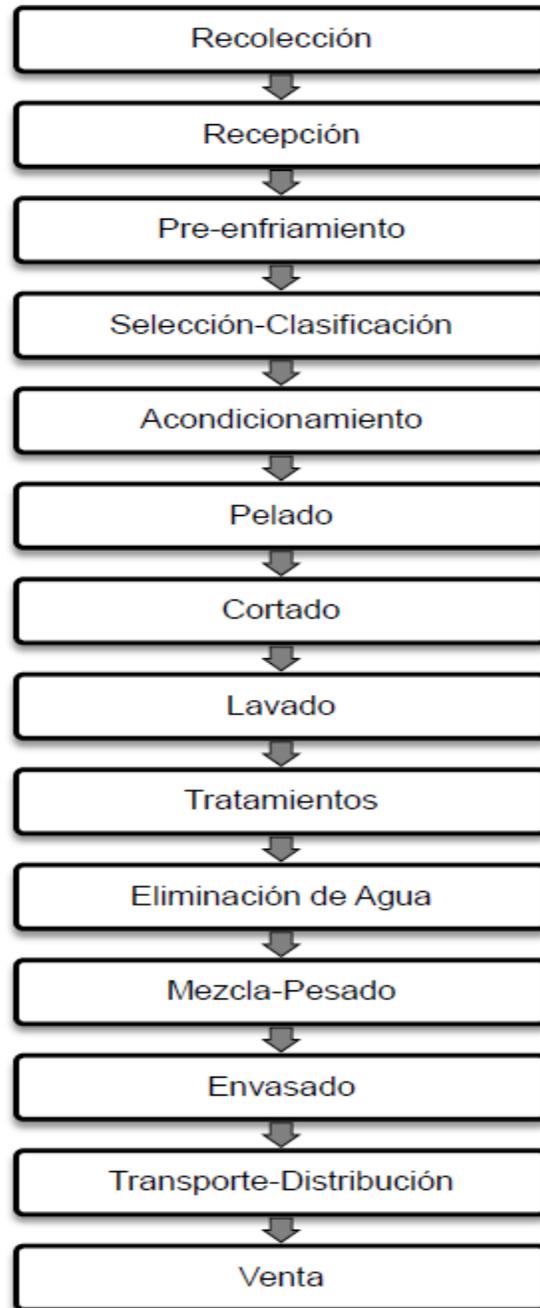


Figura 6. Diagrama de proceso de productos vegetales cortados (González y Lobo 2005; Ayón-Reyna y col 2015).

Operaciones que involucran la preparación de productos mínimamente procesados causan lesiones y daños a los tejidos, lo que afecta las actividades fisiológicas como la respiración de los tejidos y dan lugar a diversas rutas bioquímicas, lo que resulta en pérdidas de atributos sensoriales, crecimiento microbiano, pérdida de humedad, etc. Otros factores que influyen en el deterioro del producto, son la forma y el grosor de corte adoptada durante el procesamiento mínimo (Danyen y col 2012).

Las prácticas poscosecha, así como el tiempo que pasa desde el momento de recolección hasta que es mínimamente procesado, van a influir en la calidad tanto del producto entero como del cortado (Ayón-Reyna y col 2015).

a Materia prima

La obtención de frutas y hortalizas mínimamente procesadas comienza con una buena selección de la materia prima. Para asegurar la calidad que demanda el consumidor, debe usarse sólo materia prima de alta calidad para la preparación de productos cortados, ya que la calidad final, dependerá de la inicial utilizada. Éstos deben seleccionarse sin daños fisiológicos ni patológicos, libres de golpes, residuos de pesticidas u otros daños, ya que incidirán directamente sobre la calidad y vida útil del producto. Una pobre calidad en la materia prima producirá productos mínimamente procesados de baja calidad (Montero-Calderón 2011; Ayón-Reyna y col 2015).

b Estado de madurez

El estado de madurez del fruto es de particular importancia, ya que tendrá efecto en la calidad después del corte y vida de anaquel. El grado de madurez es uno de los factores más importantes a tener en cuenta tanto en el momento de la recolección

como del procesado, ya que tiene una gran influencia sobre la calidad del producto final (Argañosa y col 2008).

c Cortado y pelado

Los frutos al ser pelados y cortados sufren el rompimiento de tejidos y exponen una mayor área a las condiciones ambientales externas, favoreciendo la pérdida de humedad, el ablandamiento de los tejidos, la pérdida de aromas, los cambios de color y la entrada de microorganismos indeseables. Se han reportado diferentes formas de corte en papaya, las cuales incluyen cubos, rodajas, cilindros, mitades y trozos. La relación de área de superficie/volumen de un producto es un factor importante que incide en la evaporación. Como consecuencia del cortado y pelado, se ha observado un decrecimiento acelerado de firmeza, así como el contenido de azúcares (Argañosa y col 2008; Montero-Calderón 2011).

d Temperatura y humedad relativa (HR)

Los procesos metabólicos están en función de la temperatura y la humedad relativa. La respuesta de los productos frescos cortados, dependerá del tipo de producto, grado de madurez y prácticas antes y después de la cosecha, pero en todos los casos, deben ir acompañadas por un buen control de la temperatura durante toda la cadena de producción y comercialización del producto, siendo la temperatura ideal de 5 °C. Temperaturas mayores aceleran el deterioro y minimizan el efecto beneficioso de cualquier tratamiento estabilizante (Montero-Calderón 2011). Las temperaturas bajas reducen la respiración, inhiben el crecimiento microbiano y retardan la actividad metabólica, maduración y senescencia (Argañosa y col 2008), minimizando las

diferencias de respiración entre un producto cortado y uno entero, retardando además el crecimiento microbiano (Ayón-Reyna y col 2015).

e Ataque microbiano

Las frutas y hortalizas están constituidas principalmente de agua, por lo que al pelarse y/o trocearse resulta en una alta actividad de agua (>0.99), aunado a la presencia de nutrientes que permiten el crecimiento de microorganismos (Ragaert y col 2007).

La mayoría de los frutos presentan pH's ácidos (bajos), lo cual supone un factor que los protege contra el ataque de microorganismos; sin embargo, el fruto de papaya posee un pH alto lo cual lo hace más susceptible al ataque microbiano (Ayón-Reyna y col 2015).

5 Cambios producidos durante el procesamiento mínimo

Las operaciones que intervienen en la preparación de alimentos frescos cortados inducen un rápido agotamiento enzimático de antioxidantes naturales en respuesta a la lesión. Cuando los tejidos son cortados, se tiene una menor barrera a la difusión de gases, esto es debido al rápido deterioro, al incremento de la respiración y producción de etileno en comparación con el producto intacto (Argañosa y col 2008). Estos cambios fisiológicos pueden ser acompañados por decoloración de la superficie cortada, incremento en la velocidad de pérdida de vitaminas, rápido ablandamiento, cambios en la textura, encogimiento, pérdida de sabor y producción de malos sabores. Las operaciones de pelado y troceado así como la manipulación del producto procesado previo al envasado y almacenamiento, influyen significativamente en los

distintos mecanismos de alteración al provocar cambios físicos, químicos y fisiológicos (Ayón-Reyna y col 2015).

a Cambios fisiológicos

Los tejidos de las frutas y hortalizas frescas cortadas están vivos y por ello, responden a los cortes realizados durante su preparación con un aumento en su actividad fisiológica y una mayor susceptibilidad al deterioro, el daño físico ocurre en respuesta al procesamiento del fruto iniciando una serie de eventos incluyendo un incremento en la velocidad de respiración y producción de etileno, y un incremento en la actividad de un gran número de hidrolasas de la pared celular y lipasas de la membrana. La respiración es un proceso fisiológico mediante el cual el material orgánico acumulado (hidratos de carbono, proteínas, grasas), y particularmente los azúcares, son oxidados, liberando energía que puede ser utilizada por la célula para desempeñar sus funciones y puede ser liberada en forma de calor. Durante la respiración se consume oxígeno (O_2) y se libera dióxido de carbono (CO_2) y vapor de agua. El procesamiento mínimo provoca el incremento en la tasa de respiración y producción de etileno del producto en minutos y puede reducir la vida media de 1-2 semanas a tan solo 1-3 días, aun cuando las temperaturas sean las óptimas (Montero-Calderón 2011; Ayón-Reyna y col 2015).

b Cambios físicos

El oscurecimiento de la superficie cortada es la principal preocupación relacionada con la corta vida de anaquel de frutas y vegetales frescos cortados. Estos productos son vulnerables a la pérdida de color debido al daño causado a las células, los tejidos y a la falta de una cubierta de protección (Ayón-Reyna y col 2015). La

enzima polifenol oxidasa (PPO) es la responsable del oscurecimiento del tejido, además disminuye la actividad antioxidante por la pérdida de compuestos (Sillani y Nassivera 2015).

1) Color

La pérdida de color en la superficie cortada es la principal preocupación relacionada con la corta vida de anaquel de frutas y vegetales frescos cortados. Estos productos son vulnerables a la pérdida de color debido al daño causado a las células, los tejidos y a la falta de una cubierta de protección. El oscurecimiento del tejido debido a la degradación de fenoles, catalizada por la enzima polifenol oxidasa (PPO) (Montero-Calderón 2011; Dotto y col 2015).

2) Firmeza

La textura es un atributo importante de las frutas frescas cortadas que determina la aceptación o rechazo por los consumidores. El procesamiento mínimo provoca una pérdida de firmeza en el tejido de las frutas como resultado del estrés ocasionado por el corte (Montero-Calderón 2011). El ablandamiento del fruto de papaya, derivado de la acción de hidrolasas inducidas por etileno, es un factor de calidad difícil de controlar durante poscosecha. La papaya es un fruto que muestra una rápida disminución de la firmeza después del corte. Esto puede ser debido a la herida inducida incrementándose la actividad de las enzimas de la pared celular y membranas, contribuyendo a la rápida deterioración de la papaya fresca cortada (comparándola con fruta intacta almacenada bajo las mismas condiciones) (Dotto y col 2015).

3) Pérdida de peso

La pérdida de peso en frutos frescos cortados se le atribuye a la transferencia de agua de las células dañadas, ya que éstos, están constituidos principalmente de agua, y durante el procesamiento, se pierde agua a través de la superficie del tejido que ha sido cortada (Sillani y Nassivera 2015)

c Cambios químicos

La acidez de los frutos se expresa normalmente en términos de pH y acidez total titulable (ATT), mientras que la concentración de azúcares es reportada como concentración de sólidos solubles totales (CSST) o °Brix. Estos valores difieren entre variedades de papaya, además de influir en algunos factores como el estado de madurez, los tratamientos aplicados y las condiciones de almacenamiento (Gayosso-García Sancho y col 2010).

1) Concentración de sólidos solubles totales

La concentración de sólidos disueltos en frutos, está compuesta principalmente por azúcares, sin embargo, cuando el fruto comienza a sobremadurarse el contenido de azúcares disminuye debido a éstos azúcares son utilizados para la respiración del fruto y las reservas de almidón están agotadas. Al momento de procesar los frutos, deben de tener una madurez adecuada para el consumo. El daño causado por el corte aumenta su velocidad de respiración requiriendo mayor consumo de energía (azúcares) para llevar a cabo las diferentes reacciones metabólicas (Sillani y Nassivera 2015).

2) pH y acidez total titulable

La acidez titulable representa el contenido de ácidos orgánicos en cualquier fruta u hortaliza. Debido a que los ácidos orgánicos (predominando ácido cítrico y ácido málico en papaya) son los sustratos de reacciones enzimáticas durante la respiración o son convertidos en azúcares, se produce un incremento en el pH durante el almacenamiento. El contenido de ácido en papaya es muy bajo y contiene casi la misma cantidad de ácido cítrico y de ácido málico, los cuales disminuyen sus concentraciones durante la maduración (Argañosa y col 2008; Sillani y Nassivera 2015).

3) Sabor y aroma

Los cambios en el aroma y sabor de frutas y hortalizas constituyen el tercer factor de importancia en la aceptación de las mismas por parte del consumidor, sin embargo, una buena apariencia del fruto no necesariamente implica que éste sea de buena calidad, ya que pueden tener olor y sabor desagradables (Ayón-Reyna y col 2015). El sabor está determinado por el contenido de azúcares, ácidos orgánicos, componentes fenólicos y volátiles. Los compuestos volátiles son principalmente ésteres, alcoholes, cetonas y aldehídos que confieren el aroma de los frutos, y los ácidos orgánicos contribuyen con el sabor creando un balance con los azúcares en frutos específicos (Sillani y Nassivera 2015). Los frutos al madurar producen compuestos responsables del aroma. Estos compuestos volátiles son liberados al ocurrir una ruptura de las células, y las enzimas se ponen en contacto con los sustratos (Montero-Calderón 2011).

6 Métodos de conservación

El mercado de frutas y hortalizas mínimamente procesadas está creciendo sostenidamente, sin embargo, están bajo constante estudio debido a las dificultades que se presentan para preservar su calidad como producto fresco por periodos prolongados. Se han realizado estudios enfocados en el uso de diversos tratamientos para extender la vida de anaquel, por ejemplo, la adición de antioxidantes (ácido ascórbico), agentes para la firmeza (derivados del calcio), almacenamiento en atmósfera modificada con reducción en los niveles de oxígeno y la inhibición de la actividad de enzimas degradativas (Montero-Calderón 2011; Ayón-Reyna y col 2015).

a Refrigeración

La técnica más utilizada durante el almacenamiento de frutas, es la refrigeración, la cual tiene mayor efecto sobre la calidad del producto al reducir la velocidad de deterioro, mantener la apariencia, el sabor y valor nutricional; permitiendo un mayor tiempo del producto en el mercado. El almacenamiento a temperaturas bajas es el método primario para controlar la velocidad de deterioro de productos frescos, ya que reduce la velocidad de respiración (Sillani y Nassivera 2015). La reducción de la temperatura puede sustancialmente reducir la velocidad de muchos procesos metabólicos que conducen a la deterioración y la pérdida de la calidad, además el crecimiento y dispersión de los patógenos se reduce al minimizarse el metabolismo de los mismos. La temperatura recomendada para la distribución y comercialización de los productos frescos cortados oscila entre 0 y 4°C hasta el momento de ser consumidos (Bojórquez Gálvez y col 2010).

b Atmósferas modificadas

Para conservar los productos mínimamente procesados es necesario el uso de un envase apropiado con el fin de proteger al producto contra daños físicos a la vez de ofrecer una barrera a la entrada de microorganismos indeseables y la salida de compuestos volátiles aromáticos. Actualmente, existe en el mercado una gran variedad de materiales poliméricos con distintas características de permeabilidad al oxígeno y al dióxido de carbono, con los cuales puede alcanzarse una correcta modificación de la composición de los gases dentro del envase. La modificación de la atmósfera puede hacerse pasiva o activamente. En el primer caso, los envases se llenan y se cierran, atrapando el aire, de modo que la composición inicial en el interior de los envases es similar a la del aire, y ésta cambia durante el almacenamiento como resultado de la respiración del producto envasado y el intercambio de gases a través de la superficie del envase. En el segundo caso, se sustituye el aire por una mezcla de gases antes de sellar los envases. El uso de atmósferas modificadas ayuda a retardar la aparición de síntomas de deterioro como la pérdida de firmeza, cambios en el color y apariencia del producto y reducción en la tasa respiratoria, con lo cual la vida útil puede prolongarse significativamente. Sin embargo, el efecto difiere según el tipo de producto, la composición de los gases y las características de los envases. Atmósferas con bajo contenido de oxígeno (1 a 5%) y alto contenido de dióxido de carbono (5-10%) pueden reducir significativamente la actividad metabólica de frutos como manzana y pera, hasta pueden retardar el crecimiento de microorganismos indeseables (Montero-Calderón 2011).

c Recubrimientos con películas comestibles

Actualmente, el uso de recubrimientos comestibles es quizás la técnica más novedosa y prometedora para alargar la vida útil de este tipo de productos, por los beneficios que aporta como barrera a los gases y al vapor de agua, además de la posibilidad de utilizarlo como vehículo de sustancias activas en el alimento, permitiendo conservar la calidad de los trozos de frutas y hortalizas frescas cortadas. Generalmente, el recubrimiento comestible se forma directamente sobre la superficie de los trozos de frutas y hortalizas, como una capa uniforme muy fina. Estos recubrimientos pueden ser de origen proteico (caseína, proteínas de suero, colágeno, zeína de maíz y proteína de soja) o de origen polisacáridos (como celulosa, pectinas, almidón y Quitosano (Montero-Calderón 2011)).

E PAPAYA

1 Generalidades

Papaya es una fruta tropical nativa de América y está ampliamente distribuida en el mundo. Es principalmente producida para consumo en fresco, mermeladas o zumos. Se considera uno de los frutos más importantes en el mundo debido a su alto rendimiento y valor nutricional, ya que posee vitaminas y minerales, que son elementos fundamentales en los procesos bioquímicos y metabólicos que tienen lugar en el cuerpo humano, además, por su contenido de antioxidantes y fibra, ofrece un efecto favorable en la digestión, asimilación de alimentos y en el funcionamiento del organismo (Ayón-Reyna y col 2015; Dotto y col 2015).

a Origen y distribución

La papaya se considera originaria de Centro América a pesar de no haberse encontrado en forma silvestre, sin embargo, se han observado especies afines como *Carica peltata* y otras formas primitivas de frutos pequeños, que aparecen en poblaciones espontáneas ubicadas desde el sur de América Central hasta el Noreste de América del Sur (Ayón-Reyna y col 2015).

Actualmente esta fruta es cultivada a pequeña escala en casi todos los países tropicales y subtropicales del mundo y a mayor escala se cultiva en países como India, Brasil, Indonesia, Sudáfrica, Ceilán, Islas Canarias, Archipiélago Malayo y Australia (Valdes Arevalo y Valdez Aguirre 2014).

En México se cultiva principalmente en los Estados de Veracruz, Chiapas, Michoacán y Oaxaca, sin embargo, también es cultivado en los Estados de Baja California, Guerrero, Jalisco, Nayarit y Sinaloa (Jiménez y col 2010).

b Variedades

Gracias a que el papayo se reproduce por semilla, se ha desarrollado un gran número de variedades, empleándose en cada zona de cultivo las mejor adaptadas a sus condiciones climatológicas (INFOAGRO 2016).

Destacan las variedades Solo, Bluestem, Graham, Betty, Fairchild, Rissimee, Puna, Hortusgred, Sunrise, Sunset y Maradol. Las variedades más aceptadas son la Solo, cuyo fruto, en plantas hermafroditas, pesa unos 450 gramos; la forma es de pera, la cáscara dura y el sabor dulce; y la variedad Maradol, la cual tiene un color externo amarillo-naranja-brillante y presenta un intenso color interior rojo-salmón, color que se

atribuye a la presencia de criptoxantina β , licopeno y caroteno α y β (Ayón-Reyna y col 2015).

En la Maradol certificada prevalecen las frutas alargadas y su peso oscila entre 1.5 a 2.6 kg (3.3 a 5.7 libras por fruta). México, como quinto productor mundial, ha logrado con este tamaño buen mercado de exportación hacia Estados Unidos y Europa (Propapaya 2012; INFOAGRO 2016).

Papaya Maradol representa un producto rentable para la producción, además, cuenta con múltiples aplicaciones, sin embargo, no recibe valor agregado de forma importante; tan sólo se produce, distribuye y consume en fresco (Ayón-Reyna y col 2015; INFOAGRO 2016).

2 Aspectos bioquímicos y fisiológicos

a Fruto

Es una baya grande que varía ampliamente en tamaño, alargado a globoso en la cavidad central, semillas negras, tuberculosas y encerradas en un arilo transparente (Krishna y col 2008). El color de la pulpa varía de amarillo oro hasta rojo salmón, y el látex de la fruta inmadura posee una enzima, la papaína, de naturaleza proteolítica, utilizada para ablandar carnes, para aclarar bebidas y para fines medicinales e industriales (Ayón-Reyna y col 2015).

b Composición química y valor nutrimental

La papaya es una fruta que contiene un alto valor nutritivo. Es baja en calorías y rica en vitaminas y minerales, además por su alto contenido ocupa los primeros lugares entre los frutos, se destaca una composición rica en vitamina C, vitamina A, riboflavina, ácido fólico, calcio, tiamina, hierro, niacina, potasio y fibra. El bajo

contenido de ésta comparada con las demás frutas, la convierte en una de las favoritas de las personas que están en régimen de reducción de peso. Contiene más carotenoides comparadas con otras frutas como manzanas, guayabas y plátanos, lo cual, ayuda a prevenir el daño causado por el ataque de radicales libres (Krishna y col 2008).

Su valor nutritivo es alto: cien gramos de pulpa, suministran los requerimientos mínimos diarios de vitamina C y la mitad de la vitamina A. El contenido de vitamina C se incrementa gradualmente durante el desarrollo y maduración de la fruta a diferencia de las demás frutas cuyos niveles de vitamina C disminuyen a medida que maduran (Arango-Wiesner 2012).

La composición típica de la papaya se muestra en el **Cuadro 2**. La fruta madura contiene alrededor de 85 % de agua, 10 a 13 % de azúcares, 0.6 % de proteínas y es baja en calorías. Además prácticamente no contienen almidón. Cien gramos de pulpa contiene entre 2000 a 3000 unidades de vitamina A y 33 a 55 mg de vitamina C, y cantidades variables de vitamina B. El contenido de azúcares en la papaya varía considerablemente, dependiendo de la variedad y de las condiciones de cultivo. La composición de azúcares en papaya madura es de 48.3% de sacarosa, 29.8% de glucosa y 21.9% de fructosa. Contiene unos 106 compuestos volátiles siendo el linalol el compuesto mayoritario y el causante del olor característico de la papaya fresca (Ceballos-Chan 2005; Ayón-Reyna y col 2015).

Cuadro 2. Composición en fresco del fruto de papaya.

Componentes por porción comestible de 100 g	
Humedad	85.9-92.6 g
Calorías	23.1-25.8 cal
Grasa	0.05-0.96 g
Proteína	0.081-0.34 g
Carbohidratos	6.17-6.75 g
Fibra	0.51-1.3 g
Potasio	183.0 mg
Sodio	4.0 mg
Fósforo	12.0 mg
Cenizas	0.31-0.66 g
Hierro	0.25-0.78 mg

Fuentes: Ceballos-Chan 2005; Ayón-Reyna y col 2015.

c Maduración y senescencia

El color de la cáscara es la característica más utilizada para evaluar el estado de maduración de los frutos de papaya. Las recomendaciones para la cosecha se basan en el cambio del color verde oscuro a verde claro y la aparición de tonos amarillos en el extremo distal. La comercialización se realiza desde el estado de rompimiento del color verde a $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$ de madurez, mientras que el consumo se recomienda cuando la cáscara de los frutos presenta 75% o más de color amarillo. El patrón de coloración en papaya no está restringido a las franjas amarillas y pueden aparecer sitios de color amarillo en casi cualquier parte de la cáscara del fruto (Santamaría Basulto y col 2009).

Frutos climatéricos tales como papaya se caracterizan por un incremento en la velocidad de respiración y en la biosíntesis de etileno durante el proceso de maduración. En esta etapa de maduración ocurren una serie de eventos y reacciones, donde las moléculas de alto peso molecular (tales como el almidón) son degradadas, resultando en moléculas con bajo peso molecular (tales como azúcares y ácidos orgánicos) (Gayosso-García Sancho y col 2010), ocurren cambios de color, aroma, síntesis de proteínas y cambios de textura del fruto, provocando un ablandamiento progresivo que disminuye la vida de anaquel y reduce la calidad comercial de los frutos. El ablandamiento del mesocarpio y el endocarpio se debe a la actividad de enzimas que degradan la pared celular (Ayón-Reyna y col 2015).

Aproximadamente el 95% de la producción nacional de papaya corresponde a la variedad Maradol, por lo que debido a su importancia se han desarrollado los índices de madurez no objetivos para esta variedad (**Cuadro 3, Figura 7**) basados en el cambio de color externo. Este parámetro es ampliamente usado como un índice de madurez visual en muchos frutos, mientras que sólidos solubles totales y firmeza

Cuadro 3. Características de los índices de madurez del fruto de papaya Maradol.

Estado de madurez	Descripción
Fruto verde	Piel verde sin rayas amarillas; pulpa muy dura y de color blanca; semillas bien formadas pero de color blanco o ligeramente oscuras.
1	Piel verde con ligeras rayas amarillas; la pulpa presenta algunas áreas con color naranja; es muy dura y contiene grandes cantidades de látex.
2	Piel verde con rayas de color amarillo bien definidas; la pulpa cercana a la cavidad de las semillas es de color naranja y ligeramente verde la cercana a la piel aunque todavía dura y con grandes cantidades de látex.
3	Una o más rayas de color naranja en la piel; la pulpa casi completamente de color naranja, excepto cerca de la piel; todavía dura pero contiene menos látex.
4	Piel claramente de color naranja con algunas áreas ligeramente verdes; pulpa completamente naranja, excepto cerca del pedúnculo, más blando que en estado 3, pero sigue estando dura para consumo, bajo contenido de látex.
5	La piel muestra el color naranja característico de la variedad maradol, la pulpa se encuentra firme apropiada para el consumo; ya no presenta látex.
6	Condiciones similares al estado 5, pero con un color naranja más intenso en la piel y la pulpa todavía más blanda adecuada para el consumo.

Fuentes: Santamaría Basulto y col 2009; Ayón-Reyna y col 2015.

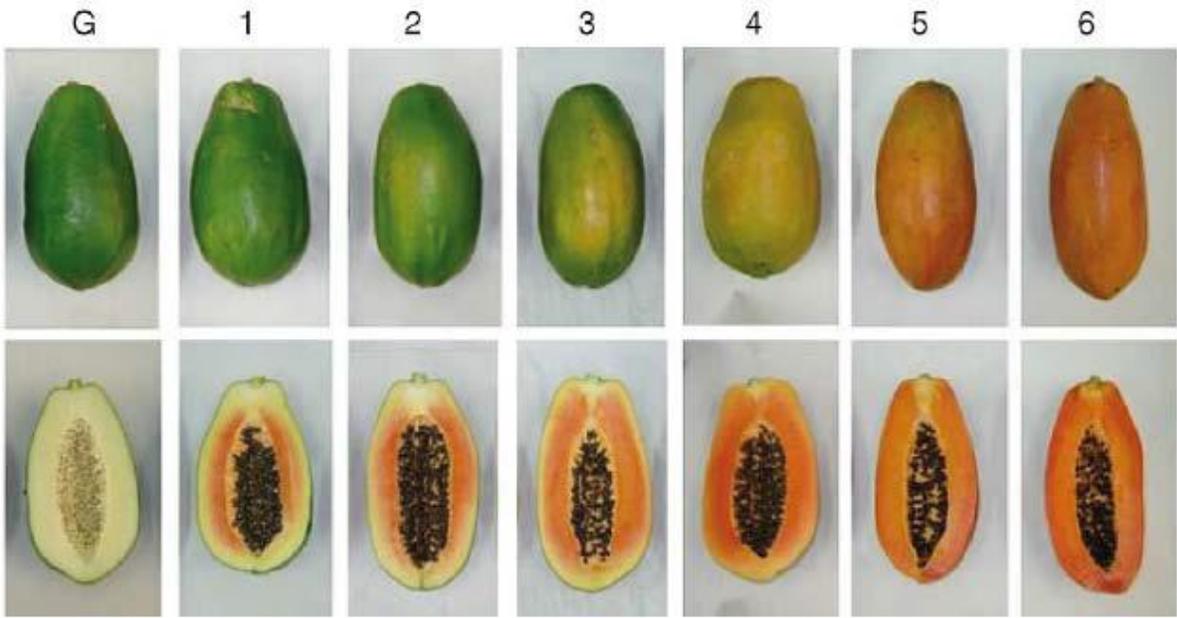


Figura 7. Visualización de cada estado de madurez de papaya “Maradol” (Hernández y col 2014).

pueden ser usados como estándares de calidad. Estos cambios de color envuelven la pérdida de clorofila, síntesis de nuevos pigmentos como carotenoides y desenmascaramiento de otros pigmentos previamente formados durante el desarrollo del fruto (Santamaría Basulto y col 2009).

3 Importancia económica

a Producción mundial

Las regiones de Centro, Sudamérica, África y parte de Asia, se han convertido en las principales regiones productoras del mundo; debido a diversos factores como clima y suelo. Los principales países productores son India, Brasil, Indonesia, Nigeria, y México, mismos que en conjunto aportan alrededor del 81 por ciento de la producción mundial. En la actualidad, India se posiciona como principal país productor de papaya con alrededor del 50 por ciento de lo producido, equivalente a 5,544,000 toneladas; mientras que Brasil ocupa el segundo lugar con 1,582,638 toneladas producidas y México el quinto lugar con 764,514 toneladas (**Cuadro 4**), lo cual indica su importancia económica en el mercado internacional (FAO 2016).

b Producción nacional

Con respecto a México, la producción ha observado desde 1999 una acelerada expansión, lo que se explica por los importantes flujos de inversión en tecnología, así como al crecimiento natural en la superficie cultivada al ser un área de oportunidad para el sector primario (Ayón-Reyna y col 2015).

Para diciembre del 2014 se reportó una producción nacional de 836,370 toneladas con una superficie de 16 000 hectáreas sembradas, siendo Oaxaca el principal Estado productor con 273,280 toneladas aportando el 28.2% de la

Cuadro 4. Producción mundial de papaya durante 2013.

País	Producción (toneladas)
India	5,544,000
Brasil	1,582,638
Indonesia	871,275
Nigeria	773,000
México	764,514
República Dominicana	531,601
Cuba	197,842
Colombia	187,707
Filipinas	166,261
Perú	149,776

Fuente: FAO 2016.

producción, seguido de Chiapas y Colima con 159,564 y 98,499 toneladas, respectivamente (SAGARPA 2016).

En el **Cuadro 5** se muestran los principales Estados productores de papaya en México.

c Importancia en el estado

Según datos de SAGARPA en 2014, El Rosario fue el principal municipio productor de Sinaloa, con un poco más del 52 % de la producción a nivel Estado. Sinaloa, aporta apenas el 1.3% de la producción de papaya a nivel nacional (SAGARPA 2016), sin embargo, es una entidad con amplias perspectivas de desarrollo en el cultivo de esta fruta, debido a la situación geográfica y a las condiciones climatológicas adecuadas para su propagación (Ayón-Reyna y col 2015).

Cuadro 5. Producción nacional de papaya durante 2014.

Estado	Producción (toneladas)
Oaxaca	273, 280
Chiapas	159, 564
Colima	98, 499
Veracruz	81, 803
Michoacán	48, 046
Guerrero	40, 461
Campeche	25, 596
Jalisco	22, 779
Yucatán	20, 057
Quintana Roo	15, 720

Fuente: SAGARPA 2016.

IV JUSTIFICACIÓN

La producción de crustáceos, apoyada fuertemente por el crecimiento de la acuicultura, es cada vez mayor en los países en desarrollo. Subproductos derivados de camarón si no son tratados adecuadamente se convierten en un grave problema de contaminación. Comercialmente, los subproductos de camarón son tratados esencialmente para la extracción y aislamiento de Quitina y su derivado el Quitosano, por el método tradicional ácido-alcalino. No hemos encontrado información en la literatura sobre la optimización de fermentación ácido láctica, utilizando residuos de la industria como cabezas de camarón, suero de leche y melaza; así como, la caracterización del Quitosano obtenido a partir de la quitina obtenida con condiciones optimizadas de fermentación. El interés de dicho biopolímero (Quitosano) es debido a sus aplicaciones potenciales en diversas áreas; en años recientes se ha empleado como película comestible y recubrimiento en alimentos procesados mínimamente, ya que éstos se están volviendo cada vez más populares, debido a su conveniencia, facilidad de uso y los beneficios que traen a la salud. Sin embargo, es necesario estudiar el efecto de cubiertas de Quitosano obtenido en las mejores condiciones de proceso de fermentación láctica de cabezas de camarón sobre el comportamiento poscosecha de un fruto modelo procesado mínimamente. Papaya es un fruto de importancia comercial en Sinaloa, el cual ya ha sido caracterizado en su vida poscosecha después de haber sido procesado mínimamente empleando cubiertas de Quitosano obtenido por el método químico convencional, representado un buen modelo de estudio para contrastar con el Quitosano obtenido a partir del proceso biológico-químico de cabezas de camarón.

V HIPÓTESIS

El Quitosano obtenido por el proceso biológico-químico de cabezas de camarón empleando condiciones optimizadas de fermentación ácido-láctica, y residuos de las industrias láctea y azucarera (suero de leche y melaza de caña) como fuentes de inóculo (bacterias ácido lácticas) y energía (azúcar) al aplicarse como recubrimiento en rebanadas de papaya procesadas mínimamente mantiene sus características de calidad y retarda el crecimiento microbiano durante su almacenamiento poscosecha, de manera similar al Quitosano obtenido por el método químico convencional.

VI OBJETIVOS

A GENERAL

Evaluar el efecto de cubiertas de Quitosano obtenido en las mejores condiciones del proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón sobre el comportamiento poscosecha de papaya procesada mínimamente.

B ESPECÍFICOS

1. Optimizar el proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón de desecho empleando suero de leche y melaza como fuentes de inóculo y energía, para conocer las mejores condiciones para producir Quitosano con valores altos de rendimiento y grado de desacetilación, y valores bajos de cenizas.
2. Evaluar el comportamiento poscosecha de papaya procesada mínimamente empleando cubiertas de Quitosano obtenido en las mejores condiciones del proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón.
3. Evaluar el efecto antimicrobiano del Quitosano obtenido en las mejores condiciones del proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón.

VII MATERIALES Y MÉTODOS

A MATERIALES

Se utilizaron cabezas de camarón (*Litopenaeus vannamei*) de desecho, obtenidos en el mercado Garmendia, localizado en la ciudad de Culiacán, Sinaloa. Las cabezas de camarón fueron transportadas al Laboratorio de Tecnología Poscosecha y Fermentaciones de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde fueron lavadas y trituradas con un extractor eléctrico, posteriormente pesadas y congeladas para su conservación hasta su uso. Suero de leche fue proporcionado por una empresa quesera de la localidad, el cual fue colocado en refrigeración y utilizado hasta alcanzar un pH entre 5 y 4.5. Melaza fue proporcionada por el ingenio azucarero de Eldorado, Sinaloa, se colocó en recipientes y fue almacenada a temperatura ambiente hasta su utilización.

Papaya (*Carica papaya* L.) variedad Maradol fue adquirida en el mercado de Abastos, localizado en Culiacán, Sinaloa. Los frutos se seleccionaron con base en libertad de defectos, uniformidad de color y tamaño. Los frutos fueron trasladados al Laboratorio de Fisiología y Tecnología Poscosecha de la Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Sinaloa, donde fueron sometidos a un lavado con hipoclorito de sodio usando una solución de 200 ppm. Los frutos fueron pelados, se les removió la semilla y se cortaron transversalmente para obtener rebanadas de 1 cm de espesor. Enseguida, las rebanadas fueron divididas en 3 lotes, uno fue sumergido en agua, otro se sumergió en una solución de Quitosano comercial (1%, p/v) y un tercero fue sumergido en una solución que contenía Quitosano (1%, p/v) obtenido en las mejores condiciones de fermentación ácido láctica

de cabezas de camarón, las inmersiones fueron de 3 min (relación 1/15 peso/volumen). Cada lote correspondió a un tratamiento: T1, inmersión en agua (Control); T2, inmersión en Quitosano comercial (Quit. Com.); T3, inmersión en Quitosano optimizado (Quit Opt.). Una vez aplicados los tratamientos, las rebanadas se colocaron en charolas de plástico, se envolvieron con película adherible y se almacenaron a 5°C por 10 días. Las evaluaciones se realizaron cada dos días para los análisis de calidad y cada 5 días para el análisis microbiológico (**Figuras 8 y 9**).

B MÉTODOS

1 Fermentación

Las cabezas de camarón fueron descongeladas y lavadas con abundante agua, posteriormente se colocaron en un reactor por lotes, se les añadió suero de leche y melaza, la mezcla se homogenizó y se colocó a fermentar a temperatura ambiente. Se llevó a cabo el proceso de fermentación, debido a la acción de las bacterias ácido-lácticas (BAL) presentes en el suero, tomando como sustrato los azúcares del mismo y la melaza, produciendo ácido láctico. La relación de cabezas de camarón/solución de fermentación se mantuvo constante en 1/5 (p/v).

2 Obtención de Quitina

Después del periodo de fermentación, las cabezas de camarón se pasaron por un colador y se lavaron con abundante agua fría para remover todo el residuo de solución (Niu y col 2013).

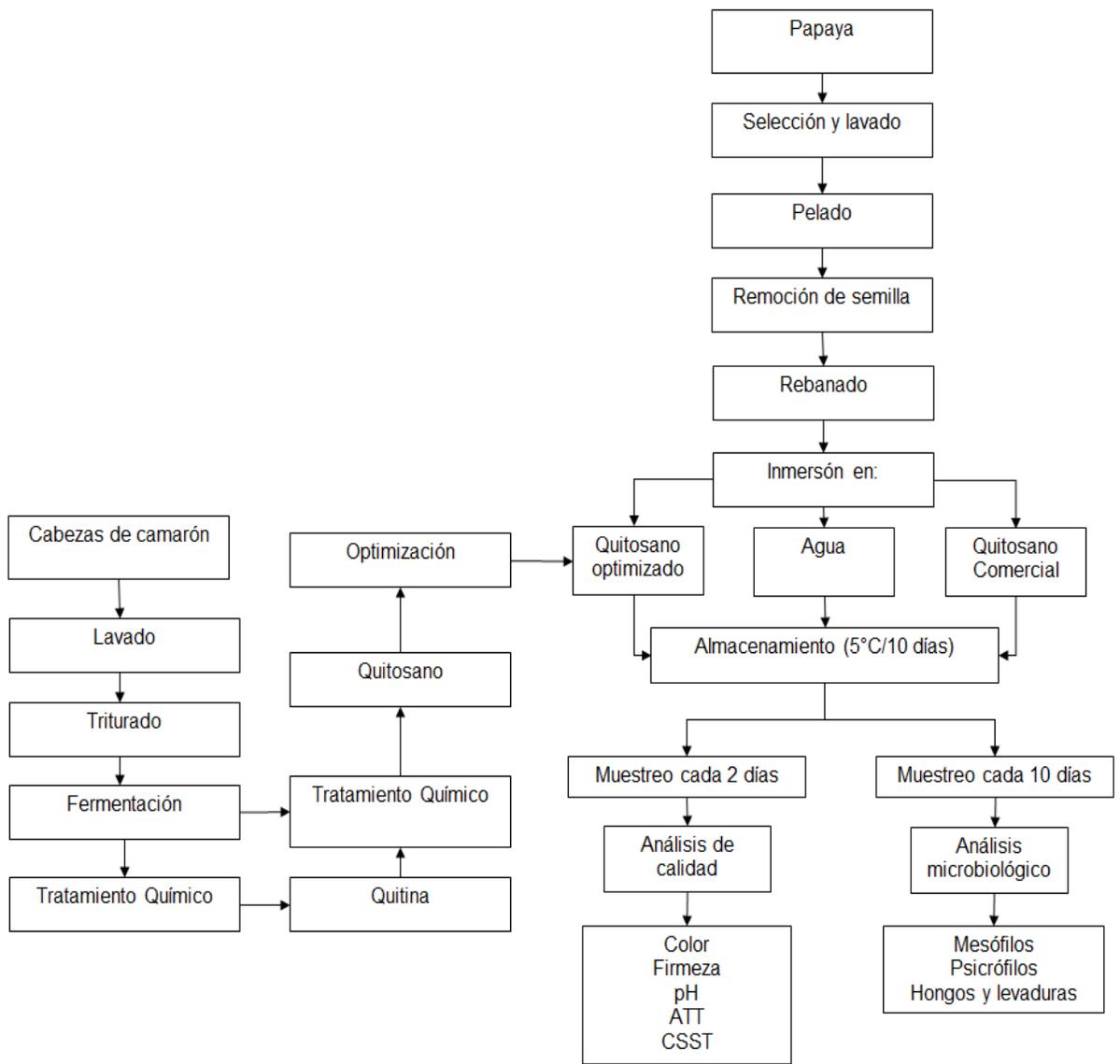


Figura 8. Diagrama de flujo del desarrollo del experimento (ATT = Acidez total titulable, CSST = Concentración de sólidos solubles totales).

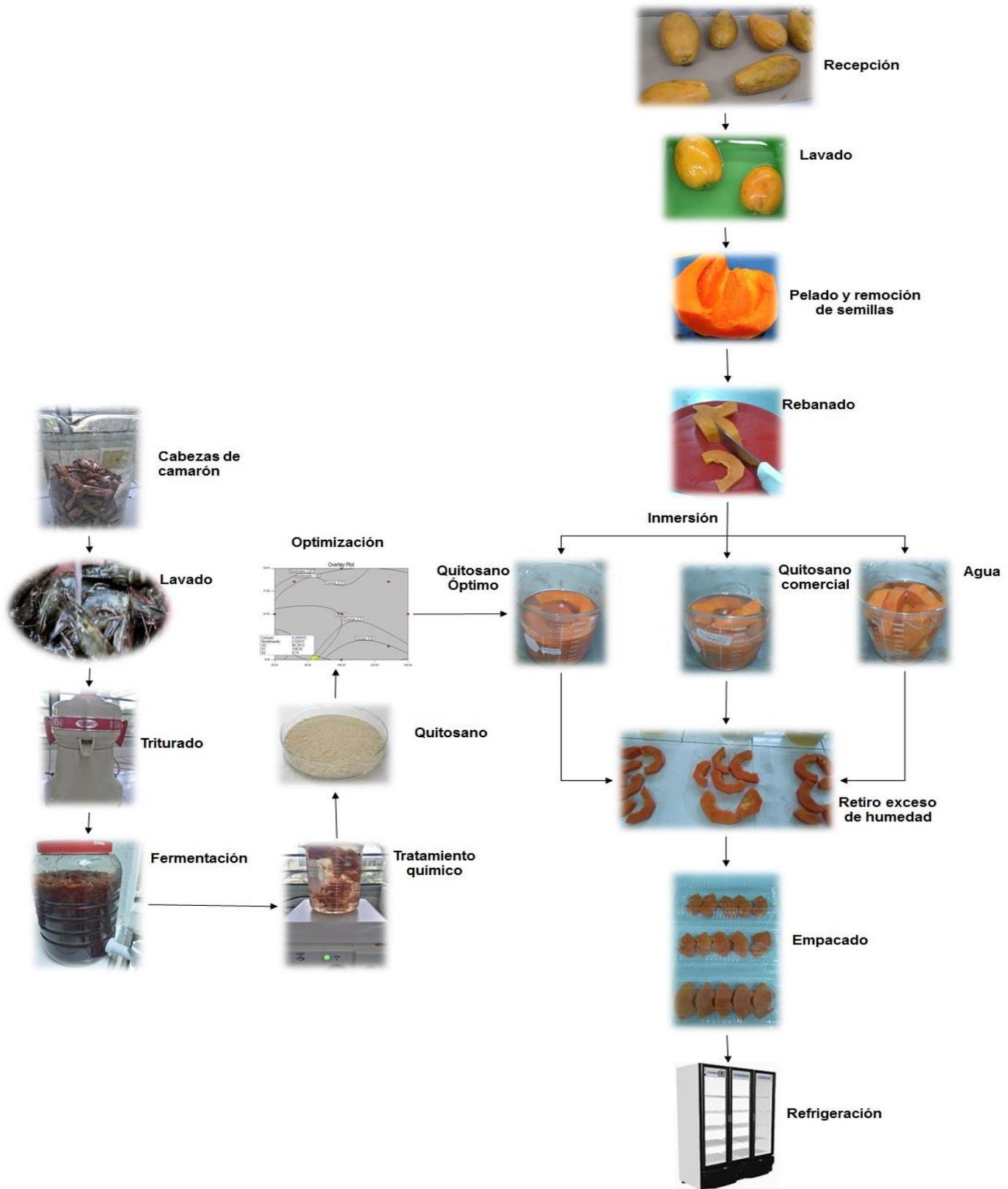


Figura 9. Diagrama ilustrativo del desarrollo del experimento.

a Desproteínización

Este procedimiento se realizó con una solución de hidróxido de sodio 1 M, en relación de 1/10 (p/v) durante un periodo de 1 h. Al finalizar este periodo la materia sólida se lavó con abundante agua hasta que alcanzó un pH de 7.0 (Colina y col 2014).

b Desmineralización

La parte sólida se hizo reaccionar con una solución de ácido clorhídrico 1N, en relación de 1/10 (p/v) durante un periodo de 1 h. Al finalizar dicho periodo la materia sólida se lavó con abundante agua hasta que alcanzó un pH de 7.0 (Juárez 2010).

c Despigméntación

La materia sólida se hizo reaccionar con una solución de Hipoclorito de Sodio al 10% en relación 1/10 (p/v), durante un periodo de 1 h. Al finalizar este periodo la parte sólida se lavó con abundante agua. El producto fue secado a 65°C durante 24 h, denominando a este producto Quitina (Franco 2010).

3 Obtención de Quitosano

La desacetilación de la Quitina se llevó a cabo por método heterogéneo en un reactor por lotes, con una solución acuosa de NaOH a una concentración de 50% a 115°C, con un tiempo de reacción de 4 horas y una relación de 1/15 (p/v). El producto fue enjuagado con agua corriente hasta neutralidad, secado a 65°C durante 24 h para su posterior análisis y caracterización (Kaya y col 2015; Younes y Rinaudo 2015).

a Caracterización de Quitosano

El primer paso en la caracterización de Quitosano fue purificar la muestra: se disolvió en un exceso de ácido y se filtró en membranas porosas (con diferentes diámetros de poro hasta 0.45 mm). Se ajustó el pH de la solución a 7.5 mediante la adición de NaOH, lo cual provocó la floculación debido a la desprotonación y la insolubilidad del polímero a pH neutro. El polímero se lavó con abundante agua y posteriormente fue secado (Blanco y col 2013).

1) Contenido de Cenizas (%C)

El porcentaje de cenizas fue determinado siguiendo la metodología de la AOAC (2012), la muestra fue pesada antes y después de la combustión de aproximadamente 2 g en crisoles a peso constante, en una mufla a 550°C, durante 4 h, obteniendo así la diferencia de pesos, el porcentaje de cenizas se calculó con la siguiente ecuación:

$$\%C = \left[\frac{(\text{Peso crisol con cenizas} - \text{Peso crisol})}{\text{Peso muestra}} \right] * 100 \quad (14)$$

El proceso final de enfriado se llevó a cabo en un desecador.

2) Rendimiento (%R)

El rendimiento (%R) del proceso se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Hernández y col (2009), se calculó utilizando la siguiente expresión:

$$\%R = \frac{RR}{RT} * 100 \quad (15)$$

donde:

RT: Cantidad en gramos de la muestra con la que se comenzó el proceso.

RR: Cantidad en gramos del producto final (Quitosano).

3) Grado de desacetilación

Para obtener el grado de desacetilación se utilizó la técnica de caracterización mediante espectroscopía de absorción infrarroja, la cual se emplea en análisis cuantitativo y para determinación de la estructura de los compuestos. Se utilizó un Espectrómetro FTIR marca Agilent Cary modelo 600 (USA). Los espectros de Quitosano se tomaron preparando películas disolviendo 250 mg de Quitosano en 50 mL de ácido acético al 6% (v/v) formándose un gel transparente y viscoso, este gel se colocó en moldes plásticos con un área de 13 cm de diámetro y luego se secaron a temperatura ambiente en ausencia de luz hasta la obtención de la película. El grado de desacetilación (GD) se determinó utilizando las ecuaciones propuestas por Brugnerotto (Colina y col 2014).

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0.3822 + 0.03133 \cdot GA \quad (16)$$

$$\% GD = 100 - GA \quad (17)$$

4) Peso molecular

El peso molecular de los polímeros está relacionado con la viscosidad intrínseca, o índice de viscosidad límite, se utilizó para esto un viscosímetro Cannon Fenske Routine 150 (USA). El peso molecular viscosimétrico se calculó de acuerdo a la metodología reportada por Zhang y col (2014). La viscosidad intrínseca se determinó mediante un gráfico que relaciona la viscosidad reducida y la concentración, en el sitio

en el cual la extrapolación de la recta obtenida se intersecta con el eje de las ordenadas:

$$\frac{\eta_{SP}}{C} = [\eta] + K[\eta]^2 C \quad (18)$$

La viscosidad intrínseca se calculó por medio de los parámetros $K=1.81 \times 10^{-3}$ y $a=0.93$, los cuales dependen del intervalo de grado de acetilación, del solvente usado y de la temperatura. Conociendo la viscosidad intrínseca se determinó el peso molecular de las muestras utilizando la ecuación de Mark-Houwink (Zhang y col 2014):

$$[\eta] = K_m * M_v^a \quad (19)$$

donde:

η = Viscosidad intrínseca (mL/g)

K_m = Constante característica del sistema polímero-solvente.

a = Constante que depende de la configuración de la cadena polimérica, varía de 0 a 1.

M_v = Peso molecular viscosimétrico promedio del polímero (g/mol).

b Optimización

Se utilizó la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) para optimizar las condiciones de procesamiento (concentración de azúcar en la solución/tiempo de fermentación) para la obtención de Quitina y Quitosano, teniendo como variables de respuesta porcentaje de cenizas, rendimiento y grado de desacetilación. Se seleccionó diseño experimental central compuesto rotatable (DCCR) con dos variables de proceso y cinco niveles de variación. Para establecer la relación entre las variables de proceso y de respuesta se aplicó análisis de regresión múltiple a los datos experimentales

obtenidos en las corridas. Los términos no significativos ($P > 0.1$) se eliminaron. Los modelos de regresión obtenidos se utilizaron para crear gráficas de superficie de respuesta y de contornos para cada variable de respuesta (de la Paz y col 2012).

Para optimizar las condiciones de proceso, se utilizó la técnica de superposición de la metodología de superficie de respuesta. Los gráficos de contornos de las variables de respuesta se sobrepusieron con lo cual se generó la región donde se encontró la mejor combinación de las variables de proceso. Se seleccionó un punto central como la mejor combinación. Se utilizó el software Design-Expert (Versión 7.01) STAT-EASE (de la Paz y col 2012).

4 Análisis de calidad

a Color

La determinación de color se realizó de acuerdo a la metodología reportada por Ayón-Reyna y col (2015), utilizando un colorímetro Minolta CR 200 (Minolta Chromameter, Japón), registrando los parámetros L^* , a^* y b^* de la escala de color CIELAB, en el cual L^* define la luminosidad y a^* y b^* son dos componentes cromáticos y son de verde a rojo, y de azul a amarillo, respectivamente. Se tomaron dos lecturas diferentes de cada rebanada (Ayón-Reyna y col 2015).

b Firmeza

La medición de firmeza de las rebanadas de papaya se determinó utilizando un penetrómetro digital Chatillon DFE Ametek modelo E-DFE-100 (North California, USA) equipado con una punta plana de 11 mm de diámetro. Se reportó la fuerza de

compresión máxima en Newtons (N). Se tomaron dos lecturas por cada rebanada (Saborío y col 2000).

c Concentración de sólidos solubles totales

El contenido de sólidos solubles totales se determinó de acuerdo al método oficial 22.014 de la AOAC (2012), utilizando un refractómetro digital (Hanna instruments, HI 96801, Rhode Island, USA). La evaluación se realizó por triplicado colocando una gota de jugo de papaya directamente sobre el refractómetro. Los resultados se reportaron como porcentaje de azúcar (°Brix).

d pH

Se determinó utilizando el método 981.12 de la AOAC (2012) que consiste en homogenizar 10 g de muestra con agua destilada neutra, posteriormente se filtró en tela de organza y se aforó a 50 mL. El pH se evaluó mediante la inmersión directa del electrodo de vidrio de un potenciómetro Orion (Orion research Inc, Boston, MA USA) en la solución aforada. Las determinaciones se realizaron por triplicado, expresándose los resultados como iones hidrógeno.

e Acidez total titulable

La acidez titulable se determinó de acuerdo al método oficial 942.15 de la AOAC (2012). A partir de la solución aforada para la determinación del pH, se tomaron alícuotas de 20 mL y se titularon con NaOH 0.1 N hasta un pH de 8.1 ± 0.2 . Se realizó por triplicado y se reportó como porcentaje de ácido cítrico.

5 Análisis microbiológico

a Preparación de la muestra

La muestra a analizar fue preparada de acuerdo a la metodología reportada por Ayón-Reyna y col (2015). 50 gramos de pulpa se mezclaron con 450 mL de agua peptonada (1 %) y se homogeneizaron por 1 minuto en una licuadora (Osterizer M4108 10 VEL) bajo condiciones estériles, obteniéndose una dilución 1:10. A partir de esta dilución se preparó la dilución 1:100, mezclando 1 mL de la dilución con 9 mL del medio BHI (Infusión Cerebro Corazón, BD Bioxon) en un tubo falcon de 15 mL estéril (Ayón-Reyna y col 2015).

b Mesófilos y psicrófilos

Para el recuento de mesófilos y psicrófilos aerobios se tomaron 100 μ L de las diluciones preparadas (10^{-1} y 10^{-2}) por duplicado y se pipetearon asépticamente en placas con agar para cuenta estándar (PCA, por sus siglas en inglés). Se utilizaron asas de plástico estériles para distribuir uniformemente el inóculo en las placas. Para el caso de mesófilos las placas se incubaron por 24-48 h a 37°C y para psicrófilos se incubaron por 13-15 días a 5°C (Ruiz-Cruz y col 2010; NOM-092). El conteo microbiológico de mesófilos y psicrófilos fueron reportados como UFC/g (unidades formadoras de colonia por gramo de muestra) (Ayón-Reyna y col 2015).

c Hongos y levaduras

Para la determinación de hongos y levaduras se tomaron 100 μ L de las diluciones preparadas (10^{-1} y 10^{-2}) y se inocularon en placas con agar Sabouraud. Las placas se incubaron por 3-5 días a 25°C (NOM-111; Ayón-Reyna y col 2015). Se realizaron tres réplicas por dilución y fueron analizadas por triplicado, el conteo de hongos y levaduras fue expresado en UFC/g de tejido.

6 Análisis estadísticos

Para el análisis de varianza de los datos experimentales del estudio de calidad poscosecha y análisis microbiológico se utilizó un diseño completamente aleatorio con dos factores: tratamiento (Control, Quit Com y Quit Opt) y tiempo de almacenamiento (0, 2, 4, 6, 8 y 10 días) y tres réplicas. Para el caso de los análisis microbiológicos se utilizaron los mismos dos factores, con la diferencia que el tiempo de almacenamiento sólo tuvo 3 niveles (0, 5 y 10 días). La separación de medias se realizó mediante la prueba de Fisher con un nivel de significancia del 5% ($P \leq 0.05$).

VIII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A MEJORES CONDICIONES DE FERMENTACIÓN LÁCTICA DE CABEZAS DE CAMARÓN PARA LA OBTENCIÓN DE QUITOSANO

En el **Cuadro 6** se muestran las diferentes combinaciones de variables del proceso de fermentación láctica [tiempo de fermentación (t)/ concentración de azúcar (C) (h/%)] utilizadas para la producción de Quitosano a partir de cabezas de camarón, y los valores experimentales de las variables de respuesta [Cenizas, Rendimiento, Grado de Desacetilación] evaluadas al Quitosano producido.

1 Modelos experimentales de predicción

A partir de los datos experimentales de Cenizas, Rendimiento, Grado de Desacetilación del Quitosano mostrados en el **Cuadro 6** se obtuvieron modelos de predicción, como resultado de ajustar el polinomio " $\hat{Y}_i = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2$ ", que relaciona las variables de respuesta (Cenizas, Rendimiento, Grado de Desacetilación) evaluadas al Quitosano, con las variables del proceso de fermentación láctica (t y C). A estos modelos de predicción se les probó su idoneidad y ajuste por análisis de varianza (ANOVA). Meyers y Montgomery (2002) reportaron que un buen modelo de predicción debe tener una R^2 ajustada (coeficiente de determinación) ≤ 0.80 , un nivel de significancia de $P < 0.05$, un valor de coeficiente de varianza (CV) $\leq 10\%$, y prueba de falta de ajuste > 0.1 ; todos estos parámetros fueron usados para decidir el nivel de satisfacción de cada modelo.

Cuadro 6. Diseño experimental^a empleado para obtener diferentes combinaciones de tiempo de fermentación y concentración de azúcar (t, C) para la producción de Quitosano por fermentación ácido láctica de cabezas de camarón, y resultados experimentales de las variables de respuesta (Cenizas, Rendimiento, Grado de desacetilación).

Tratamiento ^b	Variables de proceso o independientes ^c				Variables de respuesta o dependientes ^d		
	Codificadas		Originales		Y _{Cenizas}	Y _{Rendimiento}	Y _{GD}
No.	X ₁	X ₂	t (h)	C (°Brix)			
1	-1	-1	66	13	0.43	1.98	90.62
2	1	-1	264	13	0.24	1.80	76.10
3	-1	1	66	35	0.36	1.95	78.47
4	1	1	264	35	0.38	1.82	79.88
5	-1.414	0	25	24	0.61	1.96	87.04
6	1.414	0	305.01	24	0.45	1.67	76.91
7	0	-1.414	165	8.44	0.18	1.94	80.38
8	0	-1.414	165	39.56	0.29	2.02	77.07
9	0	0	165	24	0.31	1.65	85.57
10	0	0	165	24	0.35	1.66	85.25
11	0	0	165	24	0.33	1.65	86.32
12	0	0	165	24	0.31	1.61	86.34
13	0	0	165	24	0.30	1.66	85.61

^aDiseño central compuesto rotatable con dos factores y cinco niveles; 13 tratamientos. ^bNo. corresponde al orden de procesamiento. ^cX₁ = t = Tiempo de fermentación (h), X₂ = C = Concentración de azúcar (%). ^dY_{Cenizas} = Cenizas, Y_{Rendimiento} = Rendimiento, Y_{GD} = Grado de Desacetilación.

a Contenido de cenizas

El Quitosano obtenido por fermentación láctica de cabezas de camarón presentó valores de contenido de cenizas entre 0.18 y 0.61 (**Cuadro 6**). El análisis de varianza del modelo de predicción para contenido de cenizas del Quitosano, muestra la relación entre esta variable de respuesta y las variables del proceso de fermentación láctica (t y C). El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p < 0.0001$) para contenido de cenizas. Este análisis también mostró que el contenido de cenizas del Quitosano fue significativamente dependiente de los términos lineales del tiempo de fermentación (t; $p < 0.0014$) y la concentración de azúcar (C; $p < 0.0252$), así como del término de interacción ($t \cdot C$; $p < 0.0054$) y los términos cuadráticos del tiempo de fermentación (t^2 ; $p < 0.0001$) y concentración de azúcar (C^2 ; $p < 0.0014$). El modelo de predicción para el contenido de cenizas del Quitosano usando variables codificadas fue:

$$Y_{\text{Cenizas}} = 0.33 - 0.048X_1 + 0.027X_2 + 0.053X_1X_2 + 0.096X_1^2 - 0.051X_2^2 \quad (22)$$

El modelo de predicción para el contenido de cenizas del Quitosano usando variables no codificadas fue:

$$Y_{\text{Cenizas}} = 0.62 - 4.862 \times 10^{-3}t + 0.014C + 4.837 \times 10^{-5}tC + 9.747 \times 10^{-6}t^2 - 4.233 \times 10^{-4}C^2 \quad (23)$$

Este modelo de predicción explicó el 96.28% de la variabilidad total ($p < 0.0001$) de los valores del contenido de cenizas del Quitosano. El coeficiente de determinación R^2 ajustada del modelo fue 93.63% y la falta de ajuste no fue significativa ($p < 0.0001$). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores

predichos con el modelo (CV) fue de 7.48%. Estos valores indican que el modelo experimental para el contenido de cenizas del Quitosano fue adecuado y reproducible.

A partir del modelo matemático de predicción del Grado de desacetilación se construyeron gráficos de contorno y de superficie de respuesta (**Figuras 10**) en los cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación (t y C) sobre el Grado de desacetilación de Quitosano.

En general se puede apreciar que conforme aumenta el tiempo de fermentación de las cabezas de camarón, menor es el contenido de cenizas. Posiblemente debido al mayor tiempo de interacción entre el ácido láctico producido durante la fermentación y el carbonato de calcio presente en las cabezas de camarón, el cual proporciona la dureza al mismo, dando como producto final de la fermentación lactato de calcio. Es importante destacar que diversos autores señalan que un Quitosano con alto grado de calidad debe tener un contenido de cenizas inferior al 1%, los Quitosanos obtenidos en los diferentes tratamientos contienen valores menores al 1% de cenizas (Benhabiles y col 2012; Blanco y col 2013; Arancibia y col 2015).

Benhabiles y col (2012), obtuvieron Quitosano a partir de residuos de cáscaras de camarón mediante un tratamiento químico. Utilizaron soluciones de ácido clorhídrico en un intervalo de 0.25 hasta 2 N para desmineralizar, soluciones de hidróxido de sodio desde 0.5 hasta 5 M a diferentes temperaturas (20-100°C) para desproteínizar y una solución de hidróxido de sodio al 50% a una temperatura entre (90-100°C) por 5 h. El contenido de cenizas del Quitosano fue de 0.18%, en donde las condiciones para su obtención fueron: una solución de ácido clorhídrico 1.5 N, una

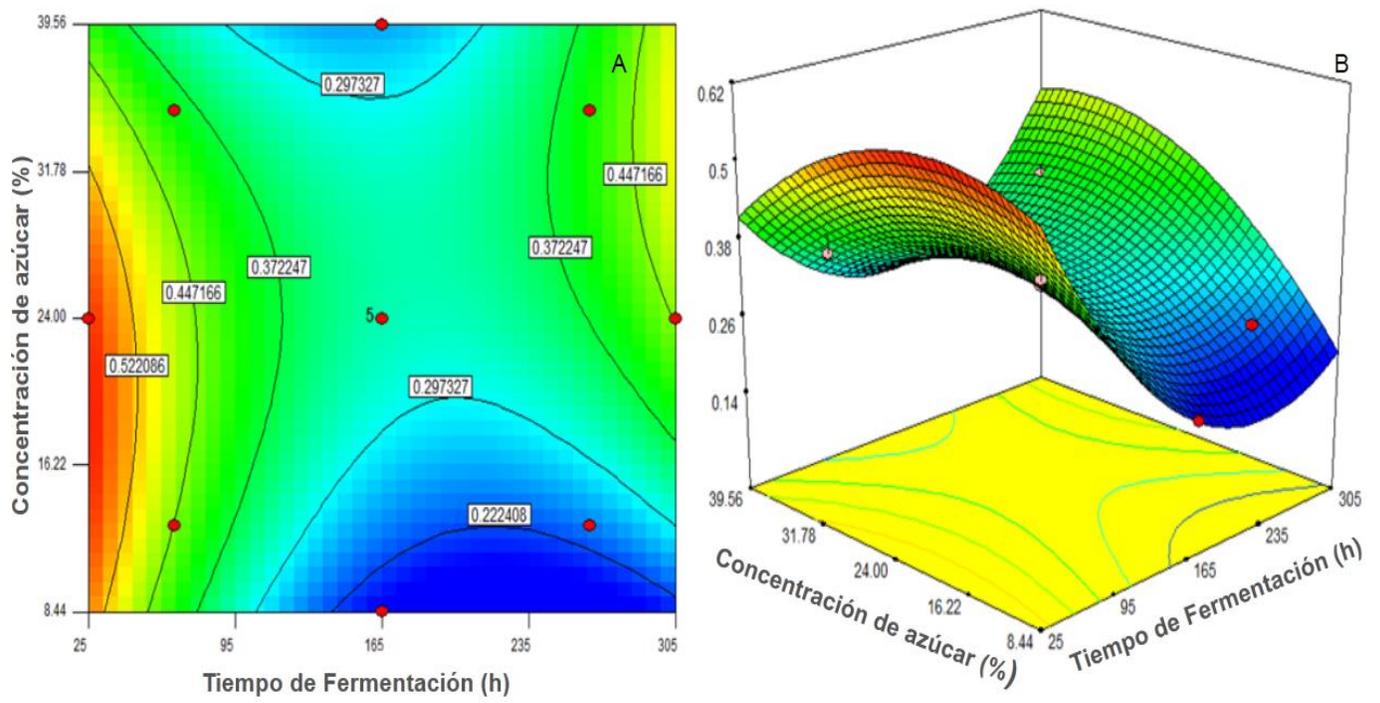


Figura 10. Gráfica de contornos (A) y de superficie de respuesta (B) que muestra el efecto del tiempo (t) y concentración de azúcar (C) sobre el contenido de cenizas (%C) del Quitosano obtenido por fermentación ácido láctica de cabezas de camarón.

solución de hidróxido de sodio 2M por 2 h a 55°C y una solución de hidróxido de sodio al 50% a una temperatura de 100°C por 5 h.

Juárez (2012), obtuvo Quitosano a partir de la desacetilación de Quitina proveniente de desperdicios de camarón. Se utilizó la sepa *Lactobacillus spp.* (B2), aislada de desperdicios de camarón tropical para fermentar los desperdicios de camarón. Después de la fermentación se realizó una desproteización con proteasas comerciales para obtener Quitina biológica, la cual fue desacetilada por un método termoquímico, con una solución de NaOH (50%) por 4 h. El contenido de cenizas del Quitosano fue de 19.05%. El contenido de cenizas es alto, comparado con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que durante la desproteización enzimática aparentemente no existe una considerable separación de los minerales presentes en la muestra.

Islam y col (2011) evaluaron las características de Quitosano obtenido a partir de desechos de camarón mediante tratamiento termoquímico. Utilizaron una solución de HCl al 4% para desmineralizar, una solución NaOH al 5% a 90°C para desproteizar y una solución al 70% para desacetilar, obteniendo un contenido de ceniza de 1.2%.

Duan y col (2012), realizaron la fermentación ácido láctica (FAL) de desperdicio de camarón, se observó una disminución importante en el contenido de grasas, cenizas y proteína en los productos obtenidos al término de cada proceso, comprobando el efecto que produce la FAL sobre el contenido de estos compuestos, reduciendo el contenido de proteína desde un 30.8% hasta un 7.4%. Igualmente se aminoraron estos subproductos después de realizar el lavado del desperdicio de

camarón fermentado con agua corriente, este efecto se debió a los remanentes de grasas, minerales y proteínas en la fase sólida de la FAL, que no se encontraban unidos covalentemente a la estructura de la Quitina, ya que estos fueron removidos por el efecto de la fermentación, pero no fueron arrastrados junto con el licor, problema que se resolvió realizando el lavado con agua, arrastrando consigo los subproductos solubles y obteniendo así la Quitina parcialmente purificada (QPP). Al mezclar una enzima comercial con la QPP, ésta reaccionará directamente con las proteínas unidas a la estructura de la Quitina. La Quitina pura que se obtuvo por método químico, presentó valores de 0% de grasa, 0.12% de cenizas y un 5.92% nitrógeno, siendo este último valor el más importante, por ser un punto de comparación para la determinación de la proteína residual en el proceso biológico.

Czechowska-Biskup y col (2012), obtuvieron un Quitosano con un contenido de cenizas 1%, siendo superior al de las muestras comerciales (0.6%). Estos valores están influenciados por la presencia de impurezas de tipo mineral (calcio), resultados acordes con el contenido calcáreo característico del exoesqueleto de camarón. Además del origen, depende también de las propiedades y condiciones de obtención del Quitosano, debido a la relación directa que existe entre la concentración de la disolución de NaOH y su viscosidad, facilitando en mayor o menor medida la retención de impurezas.

b Rendimiento

El Quitosano obtenido por fermentación láctica de cabezas de camarón presentó valores de rendimiento entre 1.61 y 2.02 (**Cuadro 6**). El análisis de varianza del modelo de predicción para el rendimiento del Quitosano, muestra la relación entre esta variable

de respuesta y las variables del proceso de fermentación láctica (t y C). El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p < 0.0001$) para rendimiento. Este análisis también mostró que el rendimiento del Quitosano fue significativamente dependiente de los términos lineales del tiempo de fermentación (t; $p < 0.0001$) y concentración de azúcar (C, $p < 0.0001$), así como los términos cuadráticos del tiempo (t^2 ; $p < 0.0001$) y concentración de azúcar (C^2 ; $p < 0.0001$). El modelo de predicción para el rendimiento del Quitosano usando variables codificadas fue:

$$Y_{\text{Rendimiento}} = 1.65 - 0.89X_1 + 0.085X_1 + 0.14X_2 + 0.085X_1^2 + 0.16X_2^2 \quad (24)$$

El modelo de predicción para el rendimiento del Quitosano usando variables no codificadas fue:

$$Y_{\text{Rendimiento}} = 2.781 - 3.749 \times 10^{-3}t - 0.063C + 8.637 \times 10^{-6}t^2 + 1.351 \times 10^{-3}C^2 \quad (25)$$

Este modelo de predicción explicó el 97.77% de la variabilidad total ($p < 0.0001$) de los valores de rendimiento del Quitosano. El coeficiente de determinación R^2 ajustada del modelo fue 96.66% y la falta de ajuste no fue significativa ($p < 0.0001$). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 1.56%. Estos valores indican que el modelo experimental para el rendimiento del Quitosano fue adecuado y reproducible.

A partir del modelo matemático de predicción del rendimiento se construyeron gráficos de contorno y de superficie de respuesta (**Figuras 11**) en los cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación (t y C) sobre el rendimiento de Quitosano.

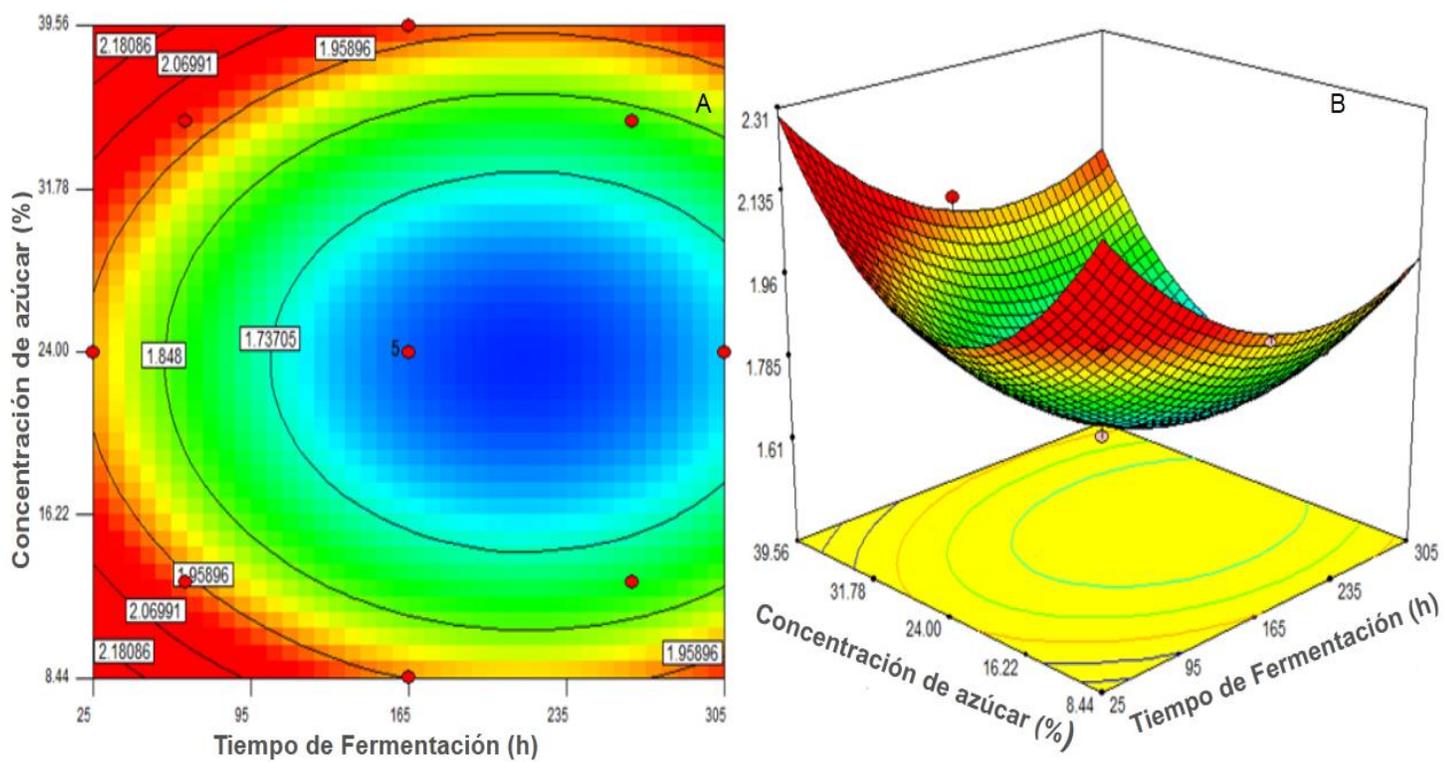


Figura 11. Gráfica de contornos (A) y de superficie de respuesta (B) que muestra el efecto del tiempo (t) y concentración de azúcar (C) sobre el rendimiento (%R) de Quitosano obtenido por fermentación ácido láctica de cabezas de camarón.

Estas gráficas muestran que a menores tiempos de fermentación, los rendimientos son mayores y conforme aumenta el tiempo, este parámetro disminuye. Esto coincide con la tendencia del contenido de cenizas, ya que a menores tiempos de fermentación mayor contenido de cenizas, lo que propicia una producción mayor de Quitosano, por lo tanto, mayores rendimientos.

Mármol y col (2004) estudiaron la desacetilación termoquímica de Quitina obtenida de exoesqueletos de camarón. Utilizaron una concentración de 50% de NaOH a temperaturas de 60 y 100°C por 2 h. El rendimiento del proceso fue de 18.42%.

Khanafari y col (2008) evaluaron el rendimiento de Quitina y Quitosano mediante los métodos químico y biológico. El método químico consistió en una solución al 2% de hidróxido de sodio a 90°C por 2 h y una solución de ácido acético al 10% a 60°C por 6 h. Para el tratamiento biológico, utilizaron 3 microorganismos, *lactobacillus plantarum* (PTTC 1058), *lactobacillus acidophilus* (PTTC 1643) y *lactobacillus rhamnosus* (PTCC 1637). El rendimiento para el método químico fue de 41% y para el método biológico fue de 31-42%.

Hernández y col (2009) obtuvieron Quitosano a partir de exoesqueletos de camarón mediante tratamiento químico. Teniendo un rendimiento global de 15.58%.

Islam y col (2011) evaluaron las características de Quitosano obtenido a partir de desechos de camarón mediante tratamiento termoquímico. Utilizaron una solución de HCl al 4% para desmineralizar, una solución NaOH al 5% a 90°C para desproteínizar y una solución al 70% para desacetilar, obteniendo un rendimiento de 15.21%.

Zamarrón y col (2014) estudiaron el efecto de 2 tratamientos termoquímicos para la obtención de Quitosano a partir de exoesqueletos de langostinos. Alcanzaron un rendimiento de 17%, rendimiento similar a lo reportado para desperdicios de camarón obtenidos mediante tratamiento termoquímico.

Gamal y col (2016), optimizaron el proceso de extracción de Quitina mediante bacillus subtilis a partir de exoesqueletos de camarón y estudiaron el impacto de la irradiación de rayos gamma en la producción de Quitosano de bajo peso molecular, el cual se obtuvo con una solución de 40% de hidróxido de sodio a 135°C por 2 h para desacetilar. Los rendimientos fueron de 4.84-10.12%.

c Grado de desacetilación

El Quitosano obtenido por fermentación láctica de cabezas de camarón presentó valores de Grado de desacetilación entre 76.10 y 90.62 (**Cuadro 6**). El análisis de varianza del modelo de predicción para Grado de desacetilación del Quitosano, muestra la relación entre esta variable de respuesta y las variables del proceso de fermentación láctica (t y C). El análisis de varianza mostró un modelo cuadrático significativo ($p < 0.0001$) para Grado de desacetilación. Este análisis también mostró que el Grado de desacetilación del Quitosano fue significativamente dependiente de los términos lineales del tiempo de fermentación (t; $p < 0.0001$) y la concentración de azúcar (C; $p < 0.0017$), así como del término de interacción ($t \cdot C$; $p < 0.0001$) y los términos cuadráticos del tiempo de fermentación (t^2 ; $p < 0.0009$) y concentración de azúcar (C^2 ; $p < 0.0001$). El modelo de predicción para el Grado de desacetilación del Quitosano usando variables codificadas fue:

$$Y_{GD}=85.82-3.43X_1-1.63X_2+3.98X_1X_2-1.69X_1^2-3.32X_2^2 \quad (20)$$

El modelo de predicción para el Grado de desacetilación del Quitosano usando variables no codificadas fue:

$$Y_{GD}=89.079-0.065 t+0.565 C+3.65 \times 10^{-3} t^*C-1.727 \times 10^{-4} t^2-0.027C^2 \quad (21)$$

Este modelo de predicción explicó el 98.33% de la variabilidad total ($p < 0.0001$) de los valores del Grado de desacetilación del Quitosano. El coeficiente de determinación R^2 ajustada del modelo fue 97.14% y la falta de ajuste no fue significativa ($p < 0.0001$). Además, la dispersión relativa de los puntos experimentales con respecto a los valores predichos con el modelo (CV) fue de 0.97%. Estos valores indican que el modelo experimental para el Grado de desacetilación del Quitosano fue adecuado y reproducible.

A partir del modelo matemático de predicción del Grado de desacetilación se construyeron gráficos de superficie de respuesta y de contorno (**Figuras 12**) en los cuales se observa el efecto de las variables del proceso de fermentación (t y C) sobre el Grado de desacetilación de Quitosano.

Tiempo de fermentación (t) y la concentración de azúcar (t) tuvieron efecto importante sobre el grado de desacetilación del Quitosano. Los máximos valores de esta variable se encuentran a tiempos cortos y concentraciones pequeñas, conforme aumentó el tiempo y la concentración hubo una disminución de este parámetro. Este comportamiento podría ser atribuido al efecto sinérgico del tratamiento biológico-químico, por lo que se necesitan más estudios sobre el fenómeno que sucede durante la fermentación láctica de cabezas de camarón.

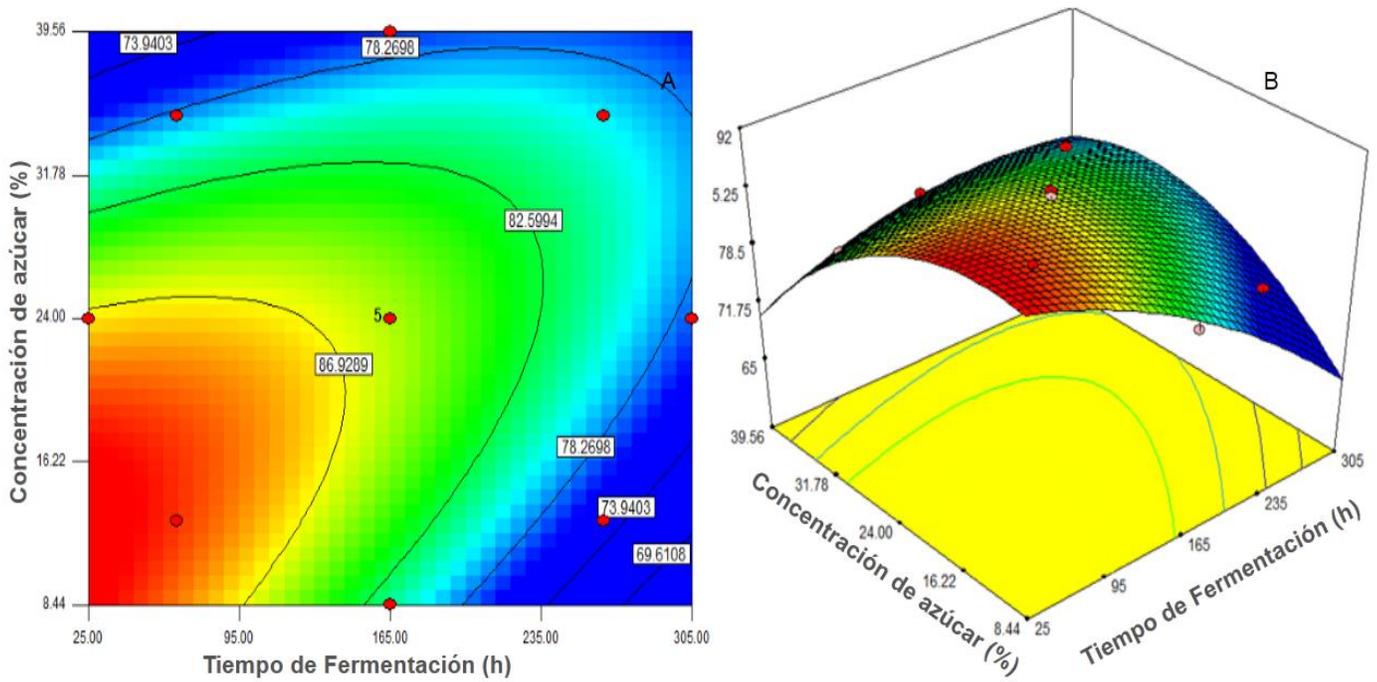


Figura 12. Gráfica de contornos que muestra el efecto del tiempo (t) y concentración de azúcar (C) sobre el grado de desacetilación del Quitosano obtenido por fermentación ácido láctica de cabezas de camarón.

Hernández y col (2009) obtuvieron Quitosano a partir de exoesqueletos de camarón de desecho mediante tratamiento químico. Demostrando el efecto de este tratamiento para la obtención de Quitosano con buenas características, la Quitina obtenida se vertió en una solución de NaOH al 50% en una relación 1:4 sólido líquido, bajo las siguientes condiciones: primero por 2 horas a 60°C y luego por 2 horas a 100°C. Bajo esas condiciones experimentales usadas, obtuvieron un porcentaje de desacetilación de Quitosano de 64%.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a lo reportado por Sierra y col (2013), ellos optimizaron el proceso de obtención de Quitina y Quitosano mediante método químico, utilizando distintas soluciones de hidróxido de sodio, ácido clorhídrico e hidróxido de sodio para desacetilar y obtener Quitosano. El grado de desacetilación se determinó mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, utilizando las ecuaciones propuestas por Brugnerotto. Las condiciones óptimas fueron: solución de hidróxido de sodio de 3.5% por 2 horas para desproteinizar, una solución de ácido clorhídrico 2 N para desmineralizar por 90 minutos y una solución de hidróxido de sodio de 60% a 100°C por 1 h. El Quitosano obtenido tuvo un grado de desacetilación del 80.67%. La principal desventaja de este proceso optimizado comparado con el proceso realizado en este trabajo, es la utilización de cantidades importantes de reactivos químicos y energía.

Los resultados difieren a lo reportado por Colina y col (2014), ellos estudiaron el efecto del tratamiento químico en desechos de cangrejo para la obtención de Quitosano. Utilizaron distintas concentraciones de ácido clorhídrico y ácido fosfórico para desmineralizar las muestras, determinaron el grado de desacetilación mediante

espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier, para el espectro del Quitosano se prepararon películas disolviendo 250 mg de Quitosano en 50 ml de ácido acético al 6% (v/v). Los valores obtenidos se encuentran en un intervalo entre 82.52–89.80% para los Quitosanos obtenidos por la desacetilación de las quitinas obtenidas por la desmineralización del ácido clorhídrico, y para los del ácido fosfórico de 91.09–95.01%, es decir, con un alto grado de desacetilación. Estos resultados sugieren que la utilización de ácido fosfórico ayuda a aumentar el grado de desacetilación de las muestras, sin embargo, estos autores mencionan que otras características importantes de este biopolímero no son afectadas (peso molecular, contenido de cenizas) por lo que aún desconocen él porque de dicho aumento, sugiriendo la utilización de ácido clorhídrico como el reactivo para desmineralizar. La utilización de otra fuente para la obtención de Quitosano pudiera influir en los resultados.

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares Zhang y col (2014), ellos estudiaron el efecto de doble fermentación para la obtención de Quitina y posteriormente, Quitina fue fermentada utilizando *rhizopus japonicus* m193 para obtener Quitosano. Utilizaron un diseño Taguchi para optimizar el proceso, en donde las variables de proceso fueron: %Quitina (1-2.5), Glucosa (5-20 g/L), concentración de inóculo (5-20%), solución de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2-0.8g/L) y tiempo de cultivo (4-7 d). Las mejores condiciones para la obtención de Quitosano fueron: 2.5% de Quitina, concentración de glucosa de 5 g/L, 5% de concentración de inóculo, 0.6 g/L de concentración de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 5 días de tiempo de cultivo. Bajo esas condiciones, se obtuvo un Quitosano con un grado de desacetilación del 79%. Evidenciando el

potencial de la técnica utilizada para optimizar el proceso de obtención de Quitosano mediante un proceso biológico.

2 Optimización

La **Figura 13**, obtenida a partir de la sobreposición de las gráficas de contorno (**Figuras 10, 11, 12**), se utilizó para conocer la mejor combinación de variables de proceso para producir Quitosano por fermentación ácido láctica de cabezas de camarón. El punto central de la región de optimización en **Figura 13** corresponde a la combinación óptima de variables de proceso [tiempo de fermentación (t)= 108 h /concentración de azúcar (C)= 8.74%) para producir Quitosano con valores altos de rendimiento y grado de desacetilación, y valores bajos de cenizas. Los valores predichos de cenizas, rendimiento y grado de desacetilación, usando los modelos de predicción de cada una de las variables de respuesta y las condiciones óptimas de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón fueron 0.29%, 2.02% y 86.30%, respectivamente (**Figura 13**). El Quitosano obtenido con condiciones óptimas se elaboró aplicando la mejor combinación de variables del proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón. Los valores experimentales de cenizas, rendimiento y grado de desacetilación del Quitosano obtenido con condiciones óptimas (0.23%, 2.03% y 83%, respectivamente) fueron similares a los valores predichos, mencionados anteriormente, indicando que las condiciones óptimas del proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón fueron adecuadas y reproducibles.

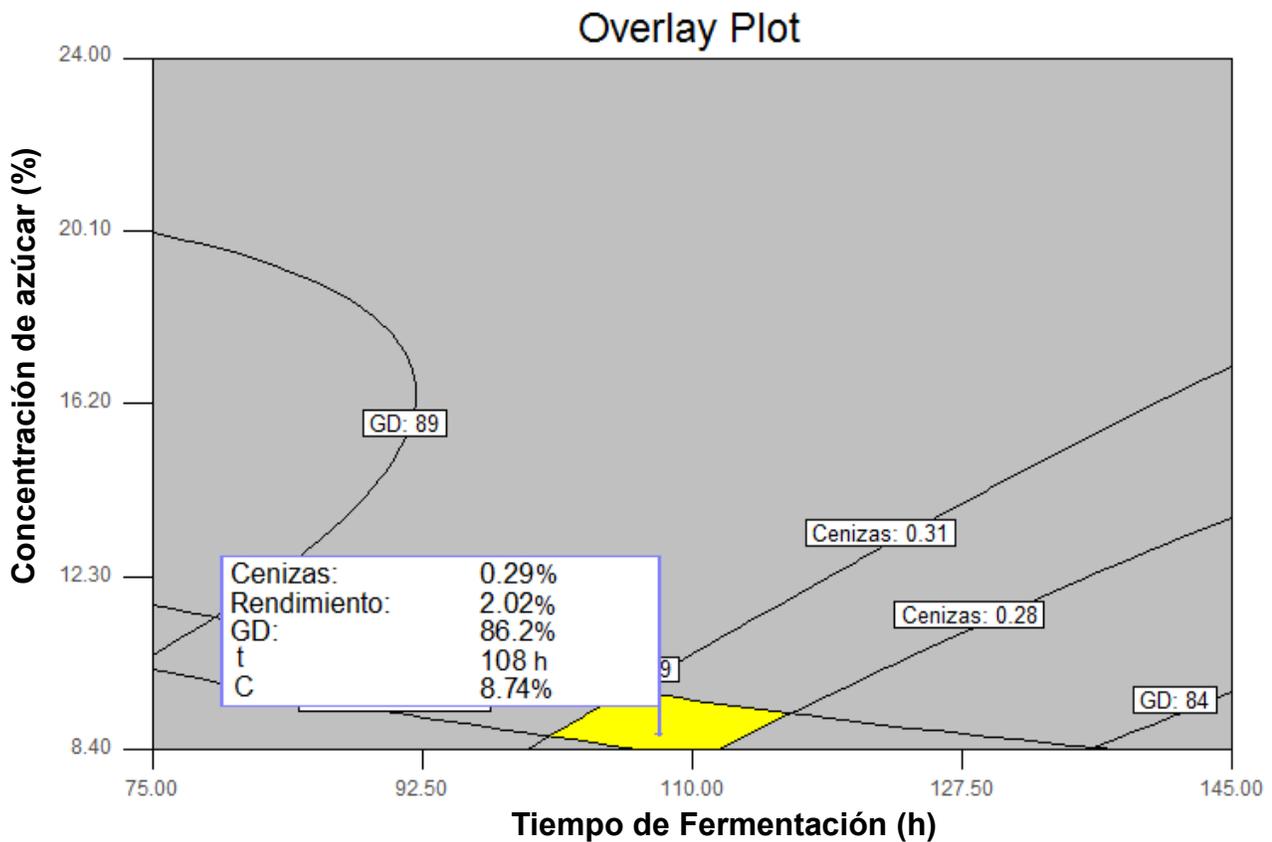


Figura 13. Gráfico mostrando la región con la mejor combinación de variables del proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón [tiempo de fermentación [(t)=108 h / concentración de azúcar (C)=8.74%] para la producción de Quitosano con rendimiento y grado de desacetilación altos y contenido de cenizas bajo.

El peso molecular del Quitosano fue una variable de respuesta propuesta originalmente en este trabajo de investigación para fines de optimización del proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón para la obtención de este producto con un valor lo más pequeño posible de esta respuesta, sin embargo esta variable no se ajustó de manera adecuada a un modelo experimental de predicción, por lo que no fue posible incluirla con este propósito de optimización. El peso molecular del Quitosano obtenido experimentalmente con condiciones óptimas del proceso de fermentación ácido láctica de cabezas de camarón fue 107.5 kDa.

El espectro de infrarrojo para el Quitosano obtenido en las condiciones óptimas de procesamiento puede observarse en el **Anexo 1**.

En general, el Quitosano obtenido en las mejores condiciones de procesamiento tuvo un mayor GD que lo reportado en la literatura (79%, 80.67%) por Sierra y col (2013) y Zhang y col (2014), un menor contenido de cenizas (1%, 19.05%) por Czechowska-Biskup y col (2012) y Juárez (2012), así como un rendimiento y un peso molecular menor (15.21%; 622 kDa y 165KDa) que lo reportado por Parada y col (2004) e Islam y col (2011) y similar (4%; 50 kDa, 43 kDa, 126 kDa) a lo reportado por Badawy y Rabea (2009), Teli y Sheikh (2012) y Zhang y col (2014). La gráfica de Huggins para el cálculo de peso molecular se puede observar en el **Anexo 2**. Aider (2010) reportó que el Quitosano se ha utilizado como recubrimiento en alimentos para inhibir el crecimiento de microorganismos como mesófilos, hongos y levaduras. Otros estudios, como los realizados por Mellegard y col (2011) demostraron la efectividad en la inhibición de microorganismos de diferentes tipos de Quitosano con grados de desacetilación y pesos moleculares diferentes. Usaron grados de desacetilación que

fueron de 52-86%, y pesos moleculares de 2.3-224 KDa. En el estudio realizado por estos investigadores se evidenció que los Quitosanos con alto grado de desacetilación, y menor peso molecular tuvieron menor crecimiento de microorganismos. Recientemente, los trabajos realizados por Dotto y col (2015) y Petriccione y col (2015) demostraron que la aplicación de un recubrimiento a base de Quitosano en frutos de cerezas, así como papaya, mantuvieron por más tiempo el color, pH, contenido de sólidos solubles totales y acidez titulable, los cuales son importantes parámetros de calidad, además de inhibir el crecimiento de microorganismos. Ahmed y col (2014) mencionan que la efectividad de este biopolímero, en la aplicación de frutos como cubierta para mantener las características del mismo, e inhibir el crecimiento de microorganismos, reside en las características del mismo (grado de desacetilación, contenido de cenizas, peso molecular). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que el Quitosano puede ser aplicado como recubrimiento en alimentos, por lo tanto, es importante evaluar el potencial de este biopolímero como inhibidor del crecimiento de microorganismos y la calidad poscosecha del fruto recubierto.

B ANÁLISIS DE CALIDAD

Los recubrimientos a base de polisacáridos han sido los más empleados para recubrir frutos y esto es debido a sus propiedades mecánicas, adherencia y flexibilidad en la superficie de los productos hortofrutícolas (Ramos-García y col 2010).

En general la aplicación del Quitosano ocasiona que la maduración de los productos tratados se retrase ya que los niveles de producción de O₂, CO₂ y/o etileno, hormona natural que induce a la maduración de los frutos, se reducen. El uso de Quitosano previene la pérdida de agua por efecto de la transpiración y por tanto retarda

la senescencia, también mantiene la firmeza y comúnmente el contenido de sólidos solubles totales (CSST) aumenta (Bautista-Baños y col 2006b). A continuación se muestran los resultados del efecto que tuvo la aplicación de cubiertas de Quitosano, obtenido con el proceso optimizado de fermentación láctica y otro adquirido comercialmente, sobre los parámetros de calidad de rebanadas de papaya procesadas mínimamente.

1 Color

El color es uno de los atributos visuales más importantes en papaya debido a que su coloración rojiza característica es un indicativo de su estado de maduración y de una buena calidad. Los parámetros L^* , a^* y b^* son utilizados comúnmente para describir objetivamente los cambios de color en los frutos. Bautista-Baños y col (2006a) señalaron que la aplicación de Quitosano en frutos generalmente mejora su apariencia y mantiene el color durante el almacenamiento, esto pudiera deberse al retardo de la degradación de antocianinas en la fruta tratada con Quitosano, y a la retención de humedad debido a la semipermeabilidad de la película del biopolímero.

En el caso de la papaya los parámetros de L^* y b^* , son los que generalmente se utilizan para describir sus cambios de color (Ayón-Reyna y col 2015).

a Valor L

En la **Figura 14** se presentan los resultados del valor L^* de rebanadas de papaya procesadas mínimamente para los diferentes días de almacenamiento a 5°C para los tratamientos Control (rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano), Quit Com (rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial) y Quit Opt (rebanadas de papaya

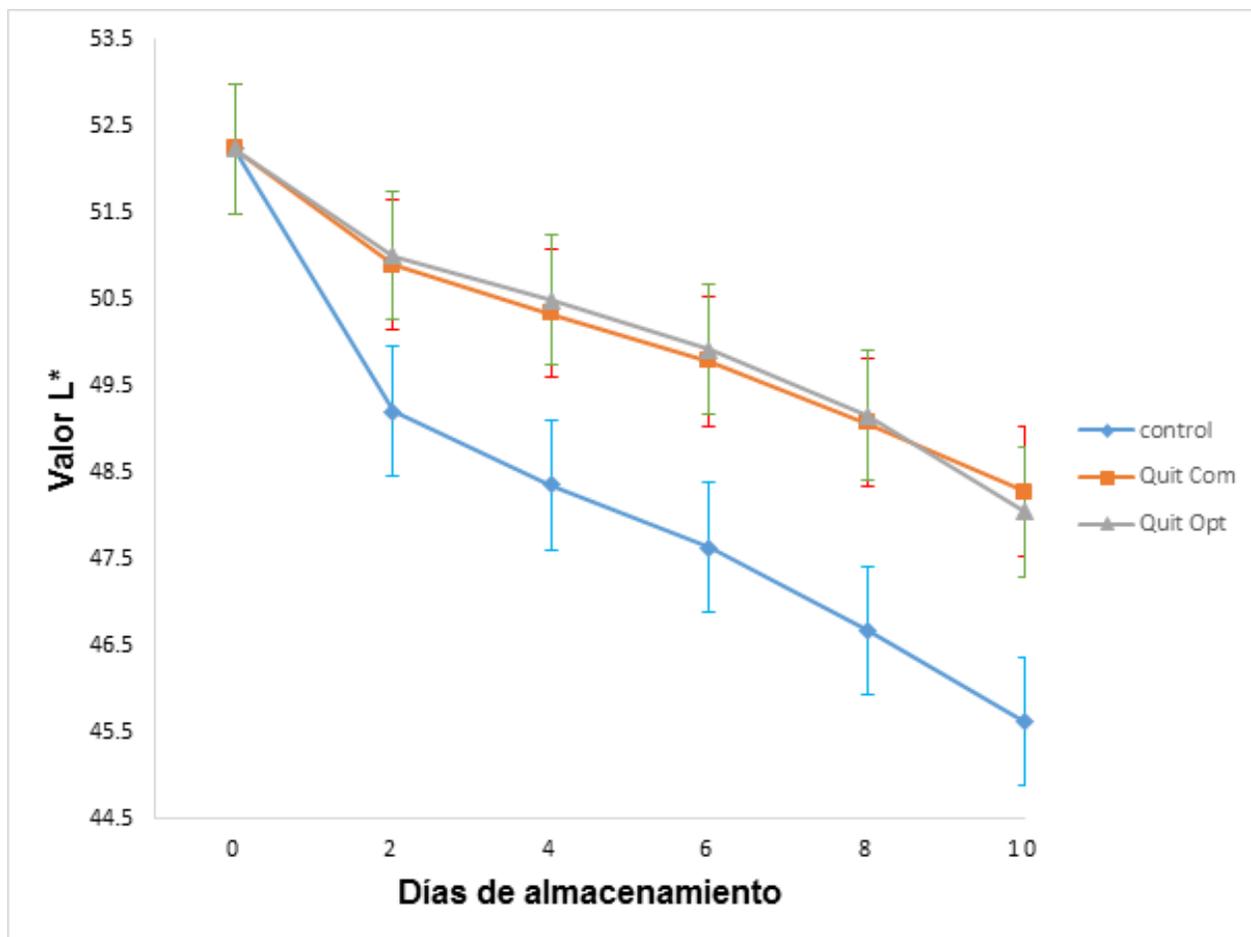


Figura 14. Cambios en el parámetro L^* de la escala de color CIE durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican $LSD = 1.484$ ($\alpha=0.05$).

procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica). En este trabajo se encontró que los factores estudiados [tratamiento (niveles: Control, Quit Com y Quit Opt) y tiempo de almacenamiento (niveles: 0, 2, 4, 6, 8, 10 días)] tuvieron efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en este parámetro, mientras que la interacción de estos factores no fue significativa ($p > 0.05$).

Se puede observar que las rebanadas de papaya presentaron una disminución permanente en la luminosidad durante todos los días de almacenamiento a 5°C en todos los tratamientos; el tratamiento control tuvo el menor valor de luminosidad, teniendo diferencia estadísticamente significativa a partir del día 2 con el resto de los tratamientos (Quit Com y Quit Opt). Estas pérdidas de luminosidad ocurridas en las rebanadas de papaya pueden atribuirse a la pérdida de humedad de los frutos conforme avanzaron los días de almacenamiento y al fenómeno de translucidez, que comúnmente ocurre en papaya, se caracteriza por la alteración en la textura de la pulpa, lo que propicia una apariencia transparente, cristalina y sobremadura, haciendo que la pulpa tenga un tono más oscuro. Esto sucede cuando la fruta es pelada y rebanada (Dotto y col 2015).

Las rebanadas de papaya presentaron un valor de luminosidad inicial de 52.2, alcanzando valores al final del almacenamiento de 45.6 para el tratamiento Control, 48.2 para los tratados con Quit Com y 48.0 para los frutos inmersos en solución de Quit Opt. Estos valores indican que las rebanadas utilizadas como Control presentaron la mayor pérdida de luminosidad con un valor de 12.6% mientras que las rebanadas tratadas con Quit Com y Quit Opt sólo mostraron una pérdida del 8%. Entre los

tratamientos Quit Com y Quit Opt no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) en los valores del parámetro L para todos los días de almacenamiento. Este resultados tiene relevante interés ya que la luminosidad es una característica muy importante de calidad en frutos procesados mínimamente; es interesante observar que las cubiertas elaboradas con Quit Opt fueron igual de efectivas que las cubiertas elaboradas con Quit Com en retardar la disminución de este parámetro de color en las rebanadas de papaya procesadas mínimamente.

González-Aguilar y col (2005) evaluaron los efectos de la aplicación de Quitosano con diferentes pesos moleculares sobre papaya fresca cortada, encontraron que el valor L^* disminuyó significativamente en todos los tratamientos, siendo los frutos no tratados los que presentaron la mayor pérdida de luminosidad, por lo que puede inferirse que la aplicación de Quitosano ayudó a mantener la luminosidad del fruto procesado.

Por su parte, Hernández y col (2007) observaron un descenso en la luminosidad de trozos de papaya con dos diferentes estados de madurez (80 y 100%) almacenados por doce días a 5°C , no encontrando diferencias importantes entre los dos estados de maduración en todo el periodo de almacenamiento.

Ali y col (2011) observaron un aumento en el parámetro L^* durante el almacenamiento de papaya cubierta con Quitosano. Sin embargo, a una concentración de 2% este parámetro disminuyó durante el almacenamiento. Esto pudo deberse a una menor tasa de respiración y reducción de la producción etileno ocasionado por la modificación de la atmósfera en el fruto. El retraso de la maduración y senescencia en el fruto, resulta en un menor cambio de color y firmeza.

Los resultados encontrados en este trabajo coinciden con lo reportado por Ayón-Reyna y col (2015), ellos encontraron que la luminosidad disminuyó en todos los tratamientos durante el almacenamiento de papaya procesada mínimamente. Al último día de almacenamiento el tratamiento que menor luminosidad tuvo fue el control, seguido del tratamiento con Quitosano, el tratamiento hidrotérmico con calcio y Quitosano fue el de mayor luminosidad.

b Valor b

En la **Figura 15** se presentan los resultados del valor b^* de rebanadas de papaya procesadas mínimamente para los diferentes días de almacenamiento a 5°C para los tratamientos Control, Quit Com y Quit Opt. Este valor se utiliza para estimar los cambios en la intensidad del color amarillo de los frutos de papaya durante el tiempo de almacenamiento (González-Aguilar y col 2005).

Se puede observar que las rebanadas de papaya presentaron una disminución permanente en el valor b^* durante los días de almacenamiento a 5°C en todos los tratamientos; el tratamiento control fue el que presentó un valor significativamente ($p < 0.05$) menor de b desde el día 6 de almacenamiento, respecto a los tratamientos de Quitosano (Quit Com y Quit Opt).

Las rebanadas tratadas con Quitosano comercial y Quitosano optimizado son las que presentaron menor pérdida de la coloración amarilla que tenían al inicio del experimento, mostrando valores similares durante todo el almacenamiento. Teniendo en cuenta que una disminución de b^* indica una pérdida de color amarillo, siendo un

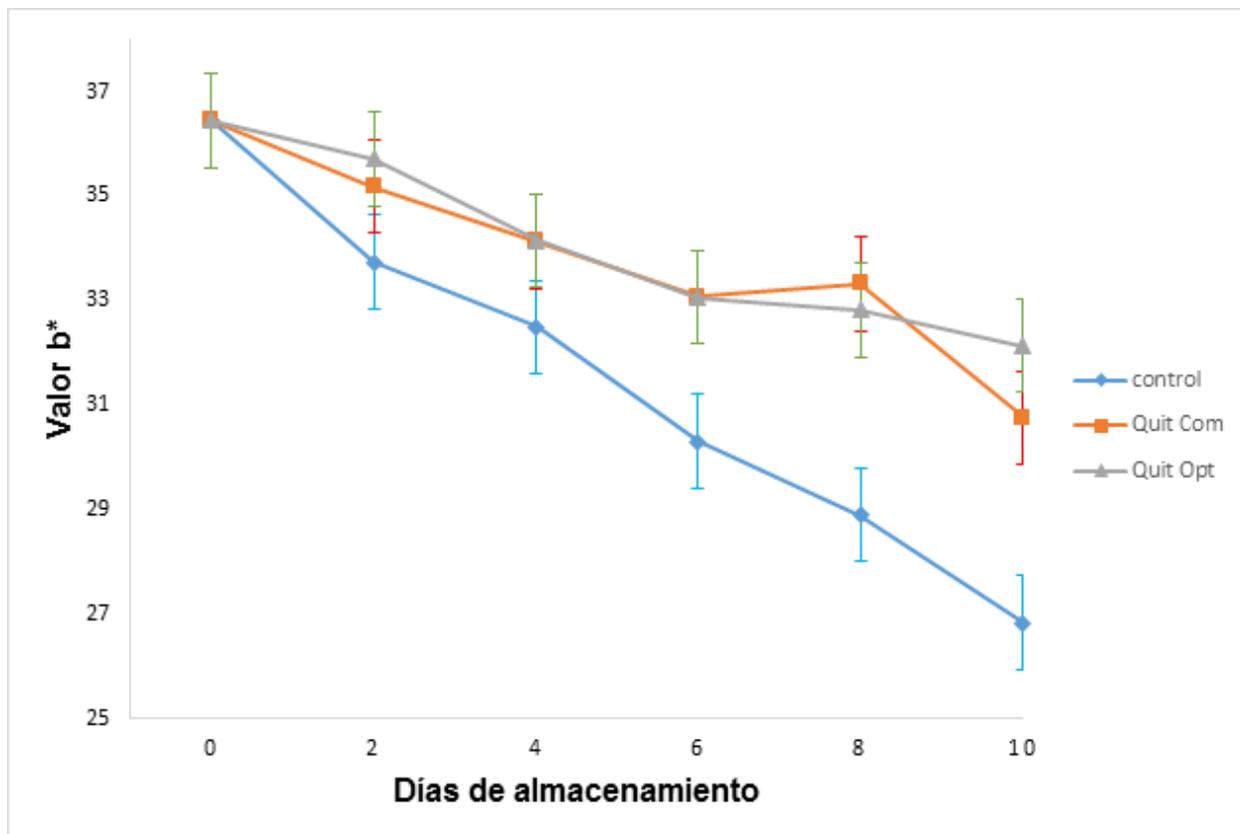


Figura 15. Cambios en el parámetro b^* de la escala de color CIE durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican $\text{LSD} = 1.791$ ($\alpha=0.05$).

parámetro importante en la calidad visual de frutos de papaya, estos resultados indican que la inmersión en las soluciones de Quitosano retardan la pérdida del color original de papaya.

El tratamiento Control fue el que presentó la mayor pérdida de b^* durante el almacenamiento, alcanzando un valor de 26.8 al final de la evaluación, es decir, perdió un 20 % aproximadamente. Por su parte los tratamientos Quitosano comercial y Quitosano optimizado tuvieron valores más altos al final del almacenamiento (32.1 y 30.7, respectivamente) y estadísticamente no fueron diferentes ($p > 0.05$), presentando tan solo una pérdida de aproximadamente el 11% durante el periodo de almacenamiento.

En este trabajo se encontró que el empleo de tratamientos con Quitosano (comercial y optimizado) como cubiertas disminuyeron el deterioro de la papaya procesada mínimamente y almacenada a 5°C, manteniendo una buena calidad del fruto hasta por diez días de almacenamiento, comparándolos con los frutos que no fueron tratados con Quitosano (control), los cuales, presentaron para el sexto día cierto grado de translucidez, el cual es un desorden fisiológico que se presenta en la papaya fresca cortada y le da una apariencia desagradable al fruto, mientras que para el décimo día presentaban casi en su totalidad dicha apariencia traslúcida.

Un estudio realizado por González-Aguilar y col (2005) evidenció que el tratamiento con Quitosano tuvo un mayor valor en el parámetro b^* que el control, por lo que éste biopolímero mantuvo los cambios en este parámetro de color en papaya fresca cortada a 5 °C por 18 días.

Los resultados encontrados en el presente estudio también coinciden con lo reportado por Gonzalez-Aguilar y col (2008). Estos autores observaron un constante descenso en la intensidad del color amarillo (valor b^*) al evaluar frutos de mango procesados mínimamente de tres variedades distintas, tratados con diferentes antioxidantes y cubiertas comestibles y almacenados a 5°C.

(Ayón-Reyna y col 2015) al evaluar el efecto del tratamiento hidrotérmico con calcio e inmersión en Quitosano en papaya mínimamente procesada, encontraron que el valor b^* disminuyó gradualmente durante los días de almacenamiento. Al último día de almacenamiento el tratamiento que menor valor b^* tuvo fue el control, seguido del tratamiento con Quitosano, el tratamiento hidrotérmico con calcio y Quitosano fue el de mayor valor b .

2 Firmeza

La firmeza, es una característica sensorial importante de frutas y hortalizas frescas. Una vez que los frutos de poscosecha se vuelven blandos durante el tiempo de almacenamiento, su característica crujiente disminuye gradualmente y desaparece. Durante el periodo de almacenamiento de frutas y verduras frescas, su firmeza disminuirá debido a la evaporación del agua, la degradación de la pectina, el consumo de nutrientes, entre otros factores (Youwei y Yinzhe 2013).

Esta pérdida ocurre a medida que el fruto madura, por lo que el estado de maduración de un producto al momento de la cosecha influye en la velocidad de pérdida de firmeza del fruto (Ayón-Reyna y col 2015).

En la **Figura 16** se muestran los resultados de firmeza expresados en Newton (N) obtenidos durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya procesadas

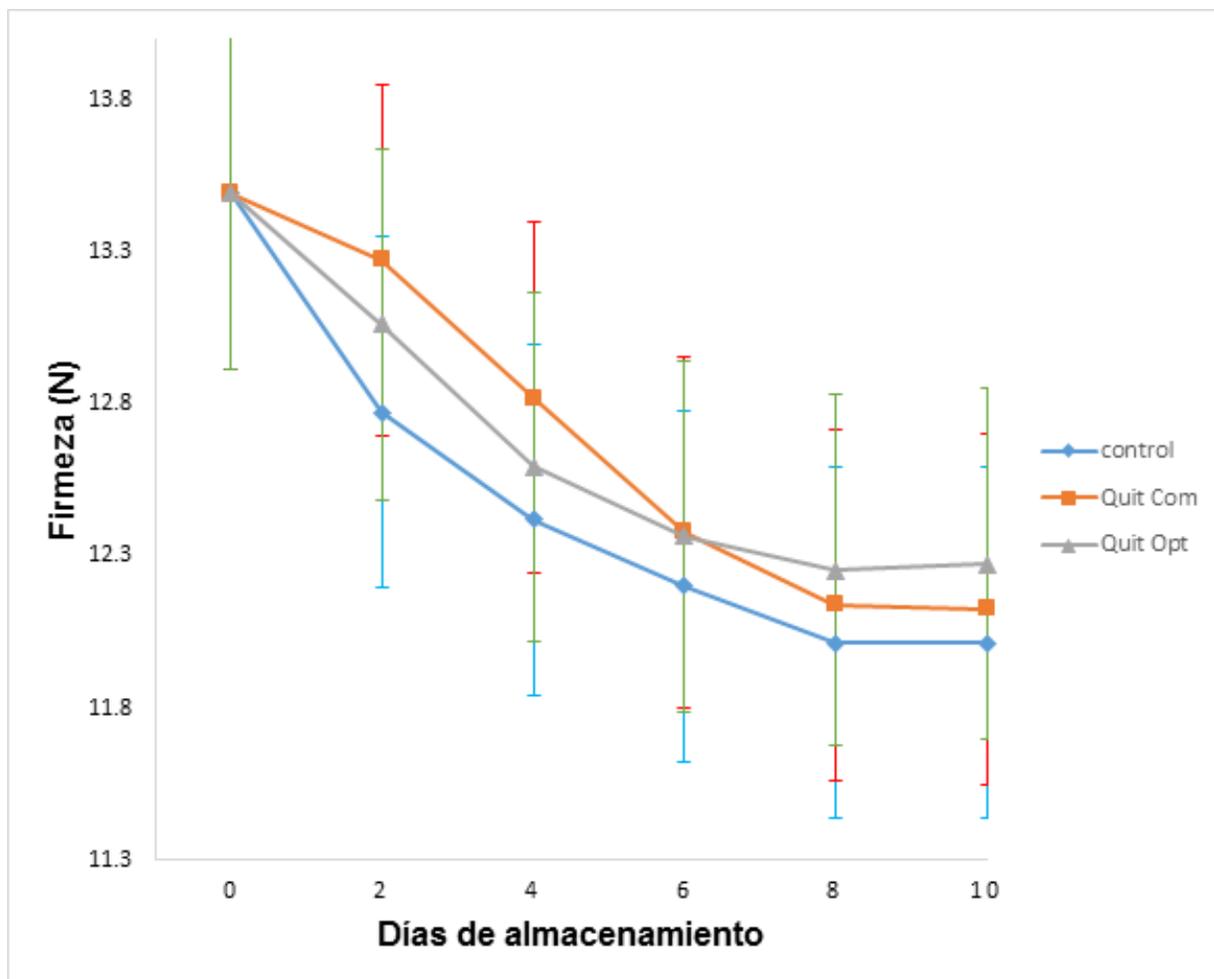


Figura 16. Pérdida de firmeza (N) durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican LSD = 1.153 ($\alpha=0.05$).

mínimamente para los tratamientos Control, Quit Com y Quit Opt. Se puede observar que las rebanadas de papaya presentaron una disminución en firmeza durante el almacenamiento en todos los tratamientos; no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos para cada uno de los diferentes días de almacenamiento estudiados.

El valor de firmeza promedio para las rebanadas de papaya al inicio del almacenamiento (día 0) fueron 13.5 N, los cuales fueron disminuyendo durante el almacenamiento hasta alcanzar valores de 12.1 N; esto quiere decir que, al inicio del almacenamiento (día 0) se necesitaba más fuerza para penetrar el fruto que la que se requería al finalizar el almacenamiento (día 10).

Ali y col (2010) evaluaron el efecto de cubiertas de Quitosano sobre el comportamiento poscosecha de papaya, reportaron que al utilizar una cubierta con 2% de Quitosano se obtuvo una menor pérdida de firmeza, teniendo diferencias con el control.

Qi y col (2011) utilizaron un recubrimiento a base de Quitosano en manzanas frescas cortadas, encontrando que este recubrimiento por sí sólo no disminuyó la pérdida de firmeza a lo largo del periodo de almacenamiento, por lo que fue necesario la incorporación de sales de calcio y ácido ascórbico como un pretratamiento en los trozos de papaya.

Ali y col (2011) estudiaron el efecto de cubiertas de Quitosano en papaya durante su almacenamiento en frío, encontraron que las cubiertas de Quitosano reducían la pérdida de firmeza de papaya durante el almacenamiento. La firmeza aumentó

conforme aumentaba la concentración de Quitosano, y la máxima retención de firmeza al final del almacenamiento fue con una concentración de 1.5% y 2%.

Hong y col (2012) evaluaron el efecto de cubiertas de Quitosano sobre el comportamiento poscosecha de guayaba, reportaron que al utilizar una cubierta con 2% de Quitosano se obtuvo una menor pérdida de firmeza, teniendo diferencias con el control.

Yang y col (2014) evaluaron la adición de extractos de hojas de arándanos en recubrimientos a base de Quitosano sobre la conservación de arándanos frescos, encontraron que el recubrimiento a base de Quitosano aumentó hasta el décimo segundo día de almacenamiento, y posteriormente disminuyó teniendo diferencias estadísticamente significativas con el control. Se ha reportado que el aumento de este parámetro podría deberse a la pérdida de agua del fruto.

Tezotto-Uliana y col (2014) estudiaron el efecto de la aplicación de recubrimiento a base de Quitosano sobre frambuesa, encontraron que para todos los tratamientos existió una disminución de este parámetro durante los días de almacenamiento, observaron que su aplicación no tuvo diferencias estadísticamente significativas con el control. Los frutos perdieron hasta un 45% de firmeza en el último día de almacenamiento evaluado.

3 Concentración de sólidos solubles totales

La concentración de sólidos solubles totales (CSST) expresados en °Brix, son un indicativo del contenido de azúcares en frutos como papaya. La CSST relacionan la gravedad específica de una solución con la concentración equivalente de sacarosa pura; por lo tanto constituye un factor importante en el sabor de los frutos (Dotto y col

2015). En la **Figura 17** se muestran los resultados de concentración de sólidos solubles totales (CSST) expresados en °Brix obtenidos durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya procesadas mínimamente para los tratamientos Control, Quit Com y Quit Opt. Se puede observar que las rebanadas de papaya presentaron un comportamiento similar durante el almacenamiento, permaneciendo sin diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos durante los diez días de almacenamiento.

Los resultados reportados por Hernández y col (2005) coinciden con los resultados encontrados en este trabajo, ellos reportaron que durante el almacenamiento por 10 días a 5°C de trozos de papaya “Maradol” con un estado de madurez del 80%, el contenido de °Brix no se modificó, mientras que en los trozos con una madurez del 100% permaneció constante durante 8 días y sólo disminuyó significativamente a partir del décimo día.

Chien y col (2007) mencionan que la concentración de sólidos solubles totales no varió significativamente entre los frutos de mango cortados tratados con diferentes concentraciones de Qitosano (1-3%).

Por otra parte, Argañosa y col (2008), reportaron resultados similares a los encontrados en este trabajo, ellos señalaron que los sólidos solubles totales permanecieron constantes durante el almacenamiento por 10 días de papaya mínimamente procesada.

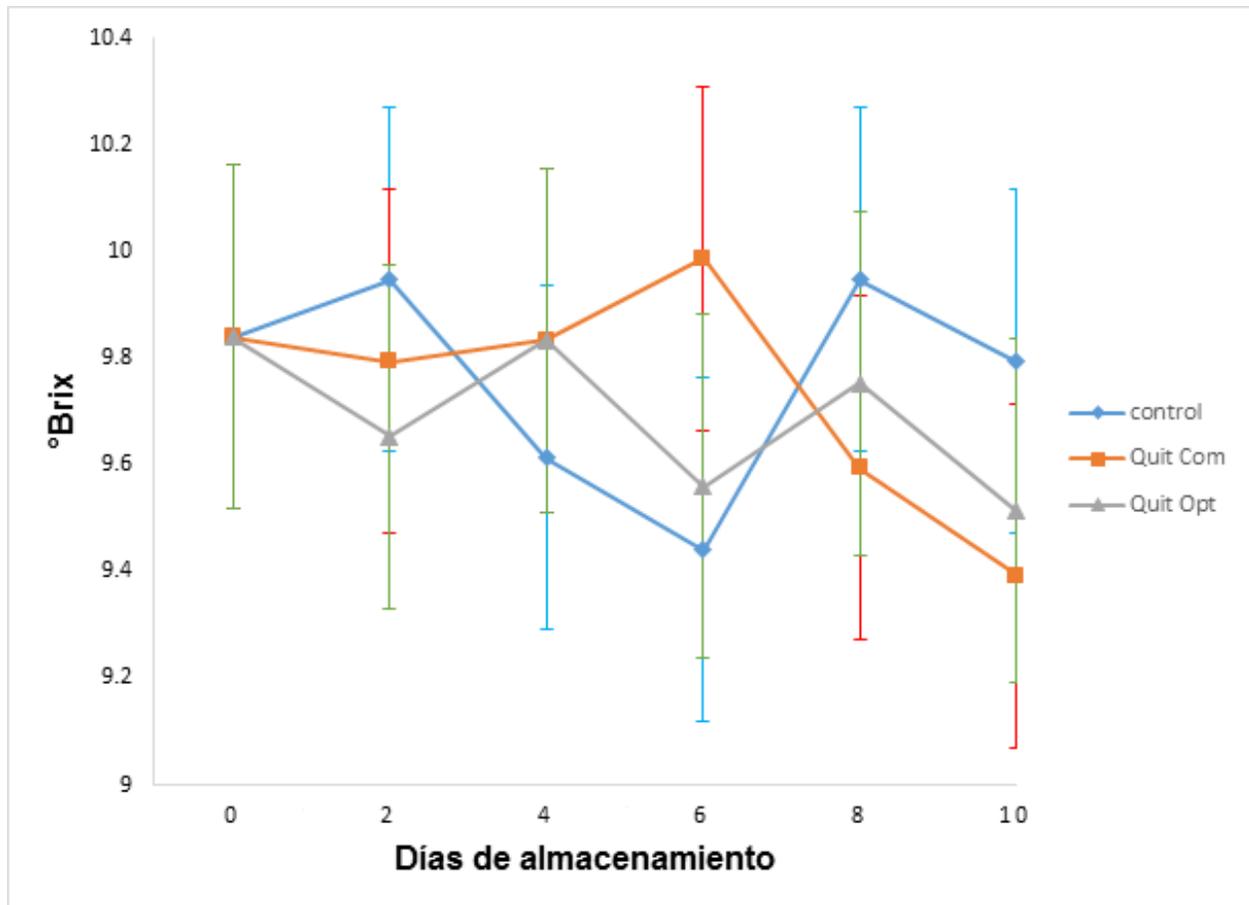


Figura 17. Contenido de sólidos solubles totales (°Brix) durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican LSD = 0.644 ($\alpha=0.05$).

Existen diferentes reportes en la literatura en los cuales se ha reportado un efecto significativo de tratamientos con Quitosano y los días de almacenamiento sobre la concentración de sólidos solubles. Uno de estos trabajos fue reportado por Ali y col (2010) al evaluar el efecto de cubiertas de Quitosano sobre el comportamiento poscosecha de papaya, encontraron que las cubiertas de Quitosano tuvieron valores bajos de concentración de sólidos solubles totales comparándolos con el control. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los frutos tratados con las soluciones de Quitosano y el control.

Asimismo, Ali y col (2011) observaron un aumento en la concentración de sólidos solubles totales durante el almacenamiento de papaya cubierta con Quitosano. Los frutos sumergidos en una solución de Quitosano al 2% fueron los que perdieron menos sólidos solubles totales, evidenciando el potencial de este biopolímero en la retención de la calidad de estos frutos.

Petriccione y col (2015) evaluaron el efecto de cubiertas de Quitosano en el comportamiento poscosecha de cerezas, reportaron un incremento de este parámetro en los tratamientos evaluados. Ellos reportaron que este aumento podría deberse a la descomposición de almidón en azúcar, a la disminución de la tasa de respiración y conversión de azúcares en CO₂ y H₂O y al incremento de sólidos secos debido a la pérdida de agua. Estos cambios presentes en los frutos cubiertos con Quitosano propiciaron un menor aumento de los sólidos solubles totales comparados con el control, debido a una menor hidrólisis del almidón en azúcares como fuente de energía.

Los frutos utilizados en este trabajo tuvieron un intervalo promedio de sólidos solubles totales de 9.4-10.5°Brix. Los resultados obtenidos en este trabajo son

similares con los obtenidos por Ayón-Reyna y col (2015) quienes utilizaron rebanadas de papaya mínimamente procesada, a las cuales se les dio un tratamiento hidrotérmico con cloruro de calcio y posteriormente inmersas en una solución que contenía Quitosano, obteniendo una concentración de sólidos solubles totales entre 8.9-9.5 °Brix. Mencionaron que no existe acumulación de azúcares en papaya 'Maradol' durante su maduración, inclusive bajo el efecto de tratamientos que la inducen.

4 pH

En la **Figura 18** se muestran los resultados de pH de los tratamientos Control, Quit Com y Quit Opt durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya procesadas mínimamente. Se puede observar un incremento de pH en los distintos tratamientos desde el día 2 hasta el final del almacenamiento (día 10). Debido a que los ácidos orgánicos (predominando en papaya los ácidos cítrico y málico) son los sustratos de reacciones enzimáticas durante la respiración, por lo que es de esperarse que exista un aumento en el pH durante el almacenamiento. El aumento en el pH encontrado en este estudio se atribuye a la pérdida de ácidos orgánicos utilizados como sustratos en diversos procesos bioquímicos (Ayón-Reyna y col 2015).

Las rebanadas de papaya no tratadas con Quitosano fueron las que presentaron los valores de pH más altos durante todo el almacenamiento, mostrando diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) respecto a los tratamientos con Quitosano (comercial y optimizado), los cuales presentaron los valores más bajos de pH durante el almacenamiento. Esto sugiere una disminución en el metabolismo de los frutos debido a que la película actúa regulando el intercambio de gases y reduciendo la

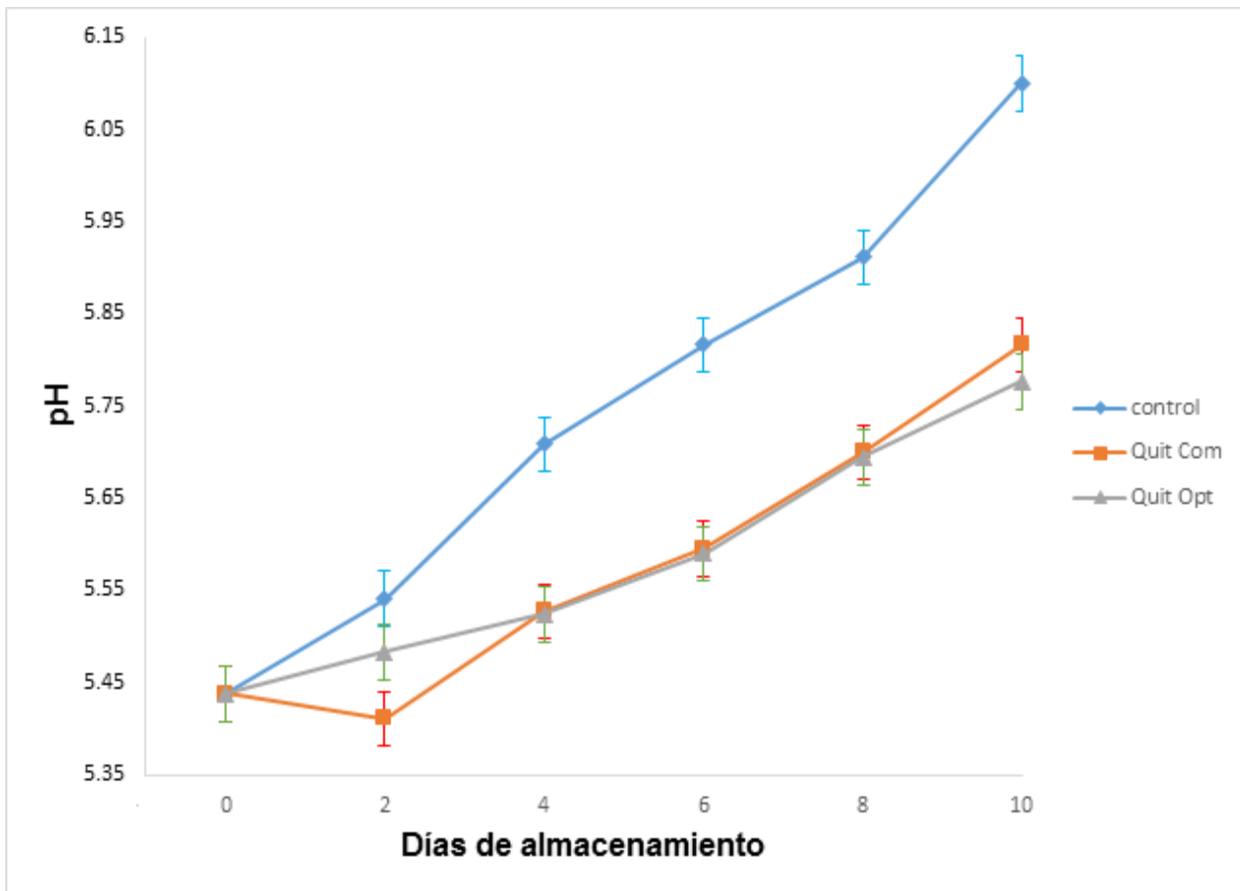


Figura 18. Cambios en el pH durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican LSD = 0.059 ($\alpha=0.05$).

velocidad de respiración, requiriendo menos ácidos orgánicos para este proceso (Dotto y col 2015). Además, las rebanadas tratadas con Quitosano (comercial y optimizado) no tuvieron diferencias estadísticamente significativas a partir del cuarto día de almacenamiento, lo cual podría significar que ambas cubiertas de Quitosano tienen propiedades de barrera similares

González-Aguilar y col (2005) obtuvieron un comportamiento similar de pH en cubos de papaya, aumentando en los primeros 9 días, seguido por una disminución el resto del almacenamiento. Aunque contrario a este estudio, aquí no se encontraron diferencias entre los tratamientos con Quitosano y el control, indicando que el Quitosano no afectó el pH de los cubos de papaya. Ellos lo atribuyen a que las soluciones fueron ajustadas a un pH de 5.6, ya que se ha reportado que a ese pH los grupos amino del Quitosano están cargados positivamente y muestran su mayor actividad biológica.

Ellos también reportaron que la tendencia de los tratamientos a disminuir su pH al final del almacenamiento pudo ser provocada por la deshidratación del tejido de las rebanadas de papaya, ya que al perderse el agua los ácidos orgánicos presentes en el fruto incrementan en porcentaje trayendo consigo una disminución del pH, sugiriendo que el Quitosano pudo actuar como una barrera contra la pérdida de humedad (Ayón-Reyna y col 2015). Sin embargo, en el presente trabajo este comportamiento no se presentó hasta los 10 días de almacenamiento estudiados.

Argañosa y col (2008) reportaron un incremento significativo en el valor de pH de papaya fresca cortada almacenada por 10 días a 4°C para todos los tipos de corte estudiados. El aumento puede ser atribuido a la degradación de los ácidos orgánicos

del fruto durante su almacenamiento, utilizados como reservas de energía durante el metabolismo primario.

5 Acidez total titulable

Los ácidos son los sólidos solubles contenidos en mayor cantidad, después de los azúcares y tienen un importante papel en el sabor del fruto, pues lo acentúan (Dotto y col 2015).

En la **Figura 19** se muestra el porcentaje de acidez total titulable expresado como porcentaje de ácido cítrico de los tratamientos Control, Quit Com y Quit Opt durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya procesadas mínimamente. Se puede observar una disminución en este parámetro en todos los tratamientos desde el día dos hasta el final del almacenamiento (día 10). El tratamiento que tuvo el menor porcentaje de ácido cítrico fue el control, teniendo diferencias estadísticamente significativas desde el día 2 con respecto a los tratamientos con Quitosano.

Los resultados obtenidos se pueden relacionar con los valores de pH, ya que mientras la acidez titulable disminuyó el pH aumentó, además, ambos fenómenos fueron pronunciados en los primeros días de almacenamiento.

El contenido de ácido en papaya es muy bajo, éste está constituido de cantidades similares de los ácidos cítrico y málico, concentraciones de los cuales se conoce que disminuyen durante la maduración (Argañosa y col 2008). La disminución en la acidez total titulable observada en este trabajo puede ser el resultado de la utilización de los ácidos orgánicos en la respiración y en otros procesos fisiológicos (Ayón-Reyna y col 2015).

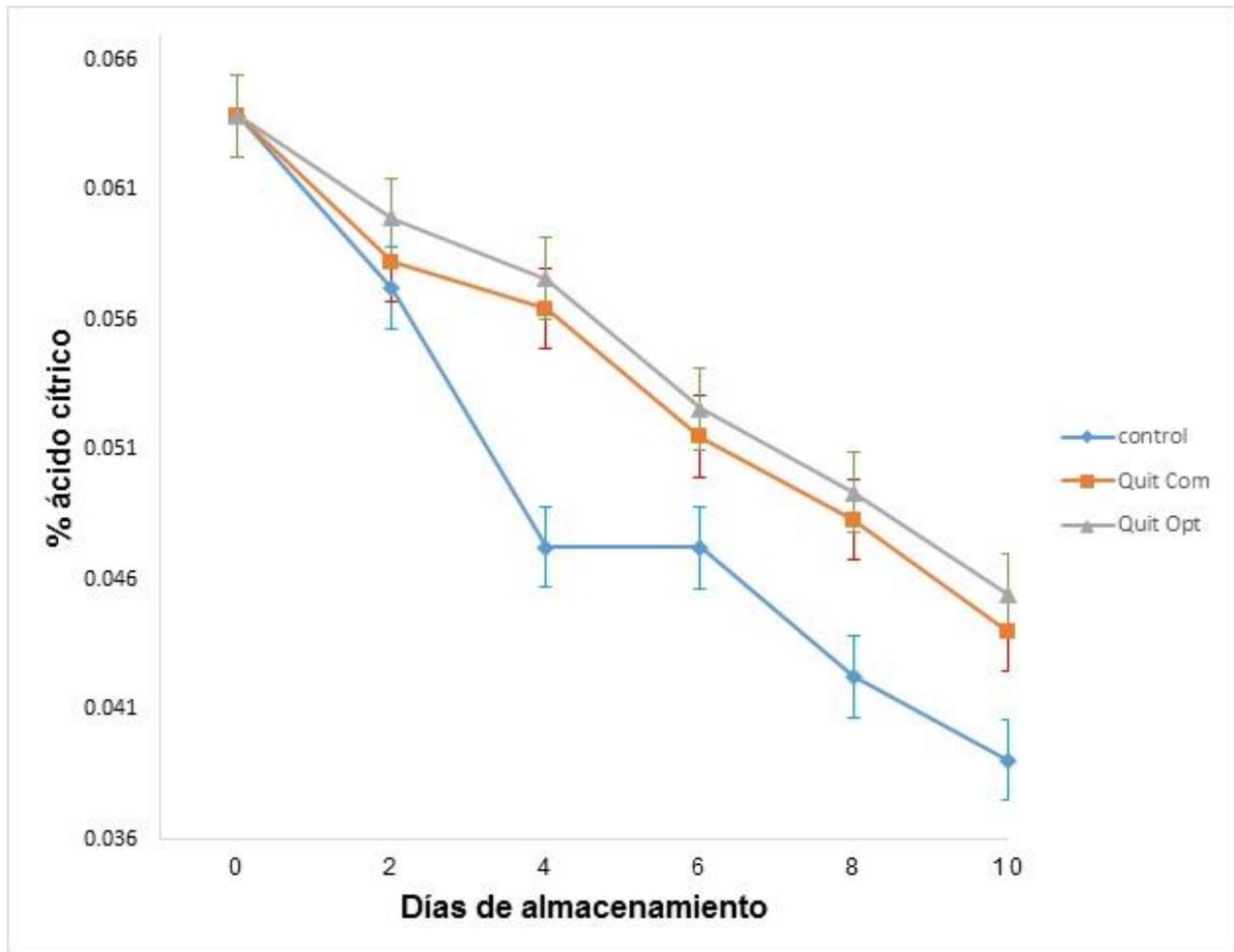


Figura 19. Cambios en la acidez total titulable (% ácido cítrico) durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control = rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt = rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 15 repeticiones. Las barras verticales indican LSD = 0.0031 ($\alpha=0.05$).

Se observó una pérdida drástica de acidez en los días de almacenamiento en todos los tratamientos, sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de Quitosano (comercial y optimizado) hasta el final del almacenamiento.

Los resultados obtenidos en este trabajo difieren de los resultados obtenidos por Hernández y col (2005), quienes reportaron que la acidez de las distintas muestras de papaya mínimamente procesada se mantuvo estable durante los primeros días de conservación, aumentando la acidez al décimo día de almacenamiento siendo 1.7 veces mayor que al inicio del mismo.

Ali y col (2010) evaluaron el efecto de cubiertas de Quitosano sobre el comportamiento poscosecha de papaya, encontraron que las cubiertas de Quitosano tuvieron los valores más elevados de acidez total titulable, siendo el control el tratamiento que tuvo los valores menores. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los frutos tratados con las soluciones de Quitosano y el control.

Ali y col (2011) observaron una disminución en la acidez total titulable durante el almacenamiento de papaya cubierta con Quitosano. Encontraron que los frutos sumergidos en una solución de Quitosano al 2% fueron los que perdieron menos acidez, por lo que concluyeron que el contenido de acidez total titulable disminuía en menor medida conforme aumentaba la concentración de Quitosano durante los días de almacenamiento.

Tezotto-Uliana y col (2014) encontraron que disminuyó la acidez total titulable de los frutos con recubrimiento a base de Quitosano durante los días de almacenamiento, observaron que la aplicación de un recubrimiento con 2% de Quitosano mantuvo una

acidez más elevada que los demás tratamientos. La aplicación de Quitosano tuvo diferencias estadísticamente significativas con el control a partir del sexto día de almacenamiento.

Petriccione y col (2015) observaron una disminución estadísticamente significativa conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento en cerezas cubiertas con Quitosano, esta disminución de acidez total titulable no fue evidente en los frutos con cubierta. La mayor pérdida de acidez de los frutos sin cubierta pudo ser debido a la utilización de los ácidos orgánicos como sustrato en el mecanismo de respiración.

Se pudo observar cómo los dos tratamientos de Quitosano (comercial y optimizado) lograron disminuir la pérdida de acidez, lo cual puede deberse a que esta película pudo actuar formando una atmósfera modificada, regulando el intercambio de gases y disminuyendo la velocidad de respiración del fruto fresco cortado con la consecuente disminución de los requerimientos de ácidos orgánicos (Ayón-Reyna y col 2015).

C ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Durante el procesamiento mínimo se daña la integridad del tejido de las frutas y hortalizas, lo que desencadena procesos deteriorativos. Adicionalmente, la remoción de la epidermis protectora natural y el incremento de humedad debido al estrés ocasionado en los mismos, así como azúcares disueltos en la superficie proveen las condiciones ideales para el crecimiento microbiano (Villacorta y col 2015).

En general, los recuentos totales de las poblaciones microbiológicas de los vegetales mínimamente procesados después del proceso son 3.0 hasta 6.0 Log ufc/g. Las bacterias, son los microorganismos que predominan durante el almacenamiento a

baja temperatura, sin embargo, se han identificado diferentes especies de levaduras y observado crecimiento de hongos, pero éstos son menos importantes en los productos mínimamente procesados, debido a las propiedades intrínsecas tales como pH ligeramente ácido a neutro, lo que favorece el crecimiento de bacterias y levaduras que crecen en exceso (Benhabiles y col 2012). A continuación se muestran los resultados del efecto que tuvo la aplicación de cubiertas de Quitosano, obtenido con el proceso optimizado de fermentación láctica y otro adquirido comercialmente, sobre el crecimiento de bacterias mesófilas y psicrófilas, hongos y levaduras en rebanadas de papaya procesadas mínimamente.

1 Bacterias mesófilas

El recuento de bacterias mesófilas iniciales en rebanadas de papaya en este trabajo estuvo en un intervalo de 1×10^3 a 1×10^5 UFC/g. Estos valores iniciales encontrados en papaya mínimamente procesada son similares a los reportados por González-Aguilar y col (2005) y Tirkey y col (2014). Los límites de tolerancia permitidos por la norma de la Unión Europea y la Norma Oficial Mexicana NOM-093 para productos frescos cortados, al día de producción (5.0×10^4 UFC/g y 1.5×10^5 UFC/g, respectivamente), por lo que los valores iniciales de bacterias aerobias encontrados en este trabajo, están dentro de esos límites establecidos.

Al primer día de procesamiento, el tratamiento Quit Com fue el que presentó el menor contenido de microorganismos con 3.2×10^4 UFC/g, seguido por el tratamiento que contenía Quit Opt con 9.33×10^4 UFC/g y por último el tratamiento Control con 1.07×10^5 UFC/g. Los valores de la población bacteriana incrementaron durante el almacenamiento de las rebanadas de papaya, presentándose un ligero incremento los

primeros 5 días para todos los tratamientos seguido de un incremento pronunciado al décimo día de almacenamiento. En la **Figura 20** se puede observar el comportamiento del crecimiento de bacterias aerobias durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya variedad “Maradol” procesadas mínimamente.

Durante este trabajo el máximo desarrollo de microorganismos mesófilos al final del almacenamiento lo tuvo el tratamiento Control con un valor de 2.45×10^6 UFC/g, y los menores lo presentaron los tratamientos que contenían Quitosano (Quit Com y Quit Opt) con valores de $9.5-9.53 \times 10^5$ UFC/g.

Se observó que el tratamiento control presentó diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) con los tratamientos que contenían Quitosano (Com y Opt) a los días 5 y 10 de almacenamiento. Estos tratamientos, mostraron un comportamiento similar durante todo el periodo almacenamiento sin presentar diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre ellos en los diferentes días de almacenamiento. Al último día de evaluación, la reducción en la proliferación de microorganismos en los tratamientos con Quitosano fue significativamente importante con respecto al Control, logrando una reducción bacteriana de casi 5 veces menor que el tratamiento Control. También, se pudo observar en estos resultados que al final del almacenamiento los tratamientos que contenían Quitosano (Com y Opt) tuvieron un efecto antimicrobiano similar cuando se aplicaron, al reducir la cuenta total de bacterias aerobias.

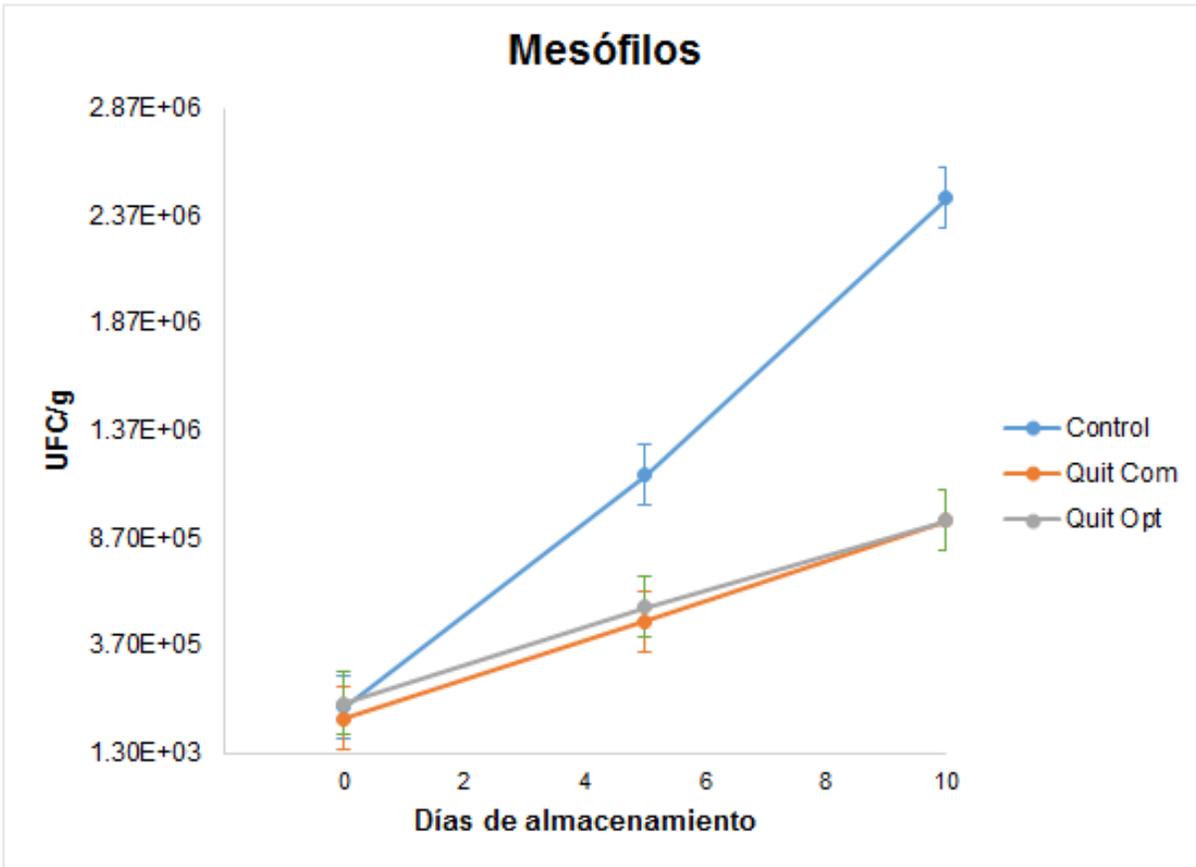


Figura 20. Recuento de bacterias mesófilas aerobias durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 9 repeticiones \pm la desviación estándar.

En la **Figura 21** se muestra una representación visual del crecimiento de las bacterias mesófilas en placas Petri, obtenidas a partir de los diferentes tratamientos empleados aquí, posteriores al almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya procesadas mínimamente.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado por Durango y col (2006), ellos reportaron una disminución en el crecimiento de bacterias mesófilas en zanahoria procesadas mínimamente recubiertas con Quitosano. Este efecto se observó durante los días de almacenamiento, teniendo diferencias estadísticamente significativas con el tratamiento Control. Los resultados concuerdan también con lo reportado por Chien y col (2007), ellos evidenciaron una disminución en el crecimiento de bacterias en rebanadas de mango tratadas con Quitosano. El efecto de este biopolímero se observó en los primeros días de almacenamiento, teniendo diferencias estadísticamente significativas desde el día cinco con el Control.

Jung y col (2010) demostraron el efecto de la aplicación de Quitosanos obtenidos por diferentes procedimientos sobre el crecimiento de distintas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Estos autores pudieron observar que los Quitosanos inhibieron el crecimiento de las bacterias analizadas, sin embargo, el efecto inhibitorio dependió principalmente del tipo de Quitosano y del tipo de bacteria. Independientemente del GD (Grado de Desacetilación) y la viscosidad, los Quitosanos, inhibieron casi por completo ($<1 \text{ Log CFU mL}^{-1}$) o suprimieron completamente el crecimiento de bacterias Gram-negativas (*P. fluorescens*), y cuatro Gram-positivas (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *B. cereus*). En general, el Quitosano mostró

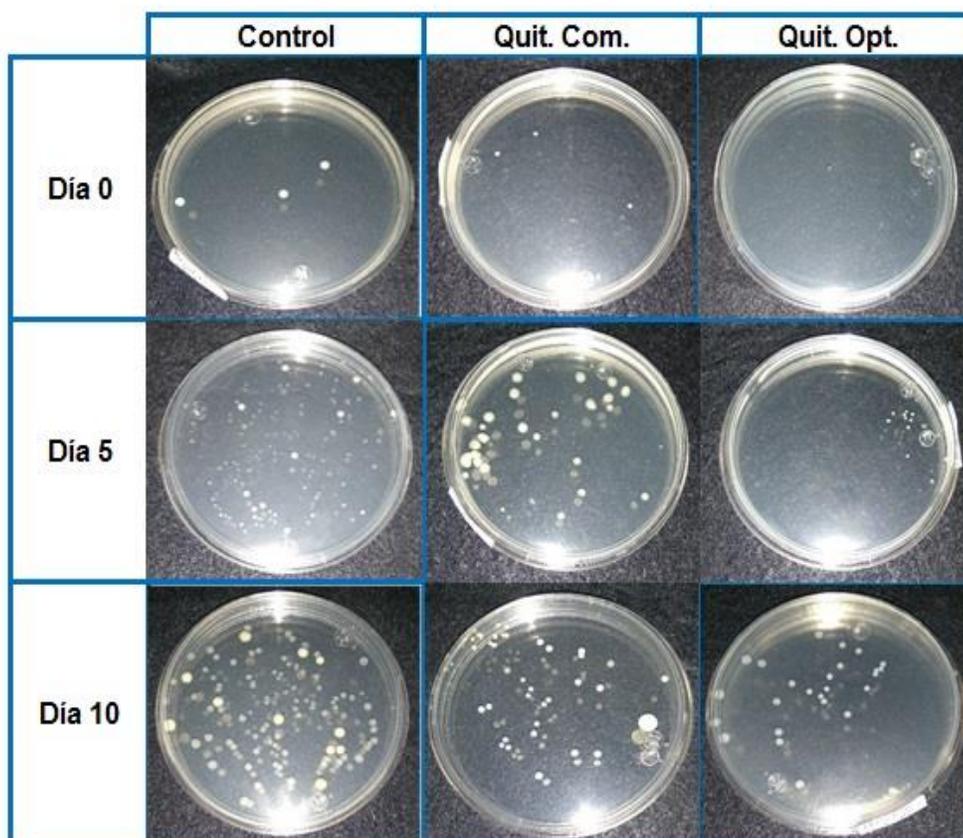


Figura 21. Fotografías que muestran el efecto de los diferentes tratamientos (Control, Quit Com y Quit Opt) aplicados en trozos de papaya “Maradol” almacenada a 5°C por 10 días sobre el crecimiento de bacterias mesófilas aerobias. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica.

mayor efecto antimicrobiano contra bacterias Gram-positivas que contra de las bacterias Gram-negativas. Las diferencias en el efecto antibacteriano del Quitosano entre las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas probablemente se deben a las diferencias en la estructura de la pared celular. La pared celular de bacterias Gram-positivas se compone enteramente de Péptidoglicano; Quitosano podría fácilmente perforar a través de la red de Péptidoglicano y actuar directamente sobre la membrana celular. La pared celular de bacterias Gram-negativas, sin embargo, se compone de una membrana interna de Péptidoglicano y una membrana externa de lipopolisacárido, lipoproteína, y fosfolípido. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas funciona como una eficiente barrera exterior permeable que las protege contra macromoléculas y podría ser responsable de prevenir que el Quitosano pueda llegar a la membrana citoplasmática. Por lo tanto, el Quitosano generalmente muestra mayor efecto antibacteriano contra bacterias Gram-positivas que bacterias Gram-negativas (Younes y col 2014; Dragostin y col 2016). Los resultados del presente trabajo concuerdan con lo reportado por estos autores, se realizó tinción de Gram a las muestras que contenían crecimiento de bacterias mesófilas, en ellas se pudo observar mayor proliferación de bacterias Gram-negativas, como se aprecia en el **Anexo 3**.

Moreira y col (2011), estudiaron el efecto de la aplicación de Quitosano en brócoli, observaron que los floretes de brócoli que fueron tratados con Quitosano tuvieron un menor recuento de bacterias mesófilas desde el primer día de evaluación, logrando una inhibición de 100 UFC/g, teniendo diferencias estadísticamente significativas con el Control. Este efecto se mantuvo hasta el final del almacenamiento.

Un comportamiento similar fue lo reportado por López-Mata y col (2012), ellos evaluaron el efecto de cubiertas de Quitosano sobre fresa, encontrando que los tratamientos a base de este biopolímero tuvieron diferencias significativas con el control desde el día de procesamiento, y se mantuvo hasta el final del almacenamiento. Concluyeron que el tratamiento que contenía una solución de Quitosano al 2%, fue el que presentó menor crecimiento de bacterias mesófilas.

De acuerdo a Bautista-Baños y col (2013), los efectos antifúngicos y antibacterianos se asocian con la naturaleza catiónica del Quitosano, el cual, está fuertemente asociado con la composición de la membrana celular de los microorganismos, lo que afecta a su integridad y permeabilidad. Además, se reconoce que los efectos antimicrobianos de Quitosano están asociados con la disminución de la actividad respiratoria de los microorganismos y la actividad de algunas enzimas.

Dotto y col (2015) evaluaron el efecto de la aplicación de Quitosano en papaya sobre las características de calidad y el crecimiento de microorganismos. Observaron que la aplicación de este biopolímero, presentó el menor crecimiento de bacterias mesófilas comparado con las no tratadas después del séptimo día de almacenamiento.

Se han propuesto varios mecanismos de la actividad antimicrobiana de Quitosano. La interacción entre el Quitosano policatiónico y grupos aniónicos presentes en las membranas celulares microbianas provoca la fuga de constituyentes intracelulares. Además, el Quitosano puede convertirse en un agente quelante, ya que puede unir metales para inhibir el crecimiento de microorganismos. Quitosanos con peso molecular pequeño pueden ingresar al núcleo de las células para inhibir la

síntesis de RNA y proteínas, por consiguiente suprimir el crecimiento de bacterias y otros patógenos (Chien y col 2016).

2 Bacterias psicrófilas

En los productos mínimamente procesados, se daña la estructura del fruto por el cortado del mismo, produciendo salida de nutrientes, haciéndolo más susceptible al crecimiento de microorganismos debido a estas condiciones; al ser almacenados a temperaturas bajas (4-6°C), se incrementa el crecimiento de bacterias psicrófilas (Ayón-Reyna y col 2015).

El recuento de bacterias psicrófilas Iniciales en rebanadas de papaya en este trabajo estuvo en un intervalo de 2 a 7×10^3 UFC/g. Al primer día de procesamiento, los tratamientos presentaron los siguientes contenidos de microorganismos: Control = 7.78×10^3 UFC/g, Quit Com = 3.33×10^3 UFC/g y Quit Opt = 2.2×10^3 UFC/g; no se presentaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$) entre los tres tratamientos. Los valores del conteo de la población bacteriana, se incrementaron durante el almacenamiento de las rebanadas de papaya, presentándose un ligero incremento los primeros 5 días para todos los tratamientos seguido de un incremento pronunciado al décimo día de almacenamiento. En la **Figura 22** se puede observar el comportamiento del crecimiento de bacterias psicrófilas aerobias durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya variedad "Maradol", bajo las diferentes condiciones de tratamiento del presente trabajo.

Durante este trabajo el máximo desarrollo de microorganismos psicrófilos al final del almacenamiento lo obtuvo el tratamiento Control con un valor de 3.19×10^5 UFC/g

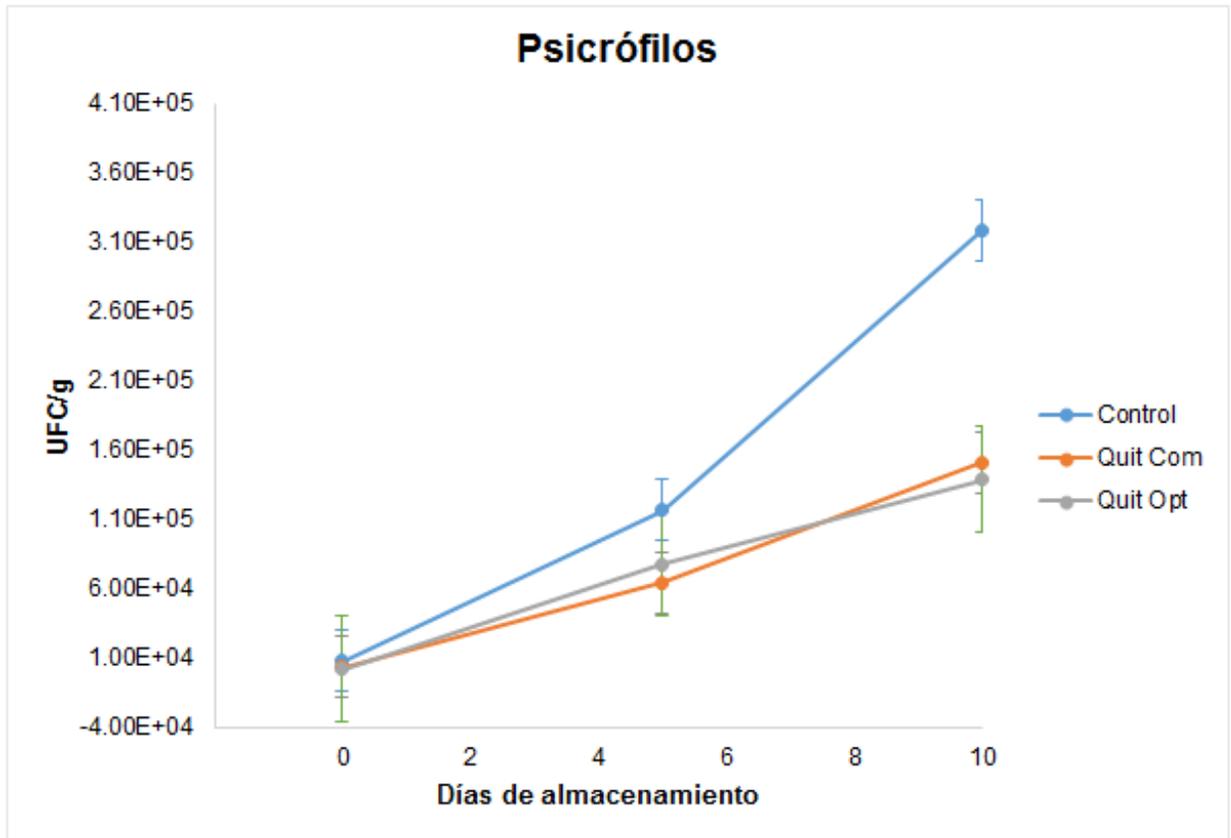


Figura 22. Recuento de bacterias psicrófilas aerobias durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 9 repeticiones \pm la desviación estándar.

y los menores desarrollos de estos microorganismos lo presentaron los tratamientos que contenían Quitosano (Quit Com y Quit Opt) con valores de $1.39 - 1.51 \times 10^5$ UFC/g. El tratamiento que presentó mayor desarrollo de bacterias mesófilas durante el almacenamiento fue el Control, el cual mostró diferencias estadísticas significativas con el resto de los tratamientos los días 5 y 10, seguido por los tratamientos que contenían Quitosano (Com y Opt), los cuales mostraron un comportamiento similar durante todo el periodo almacenamiento sin mostrar diferencias estadísticas ($p > 0.05$) entre ellos desde el inicio hasta el final.

Estos resultados indican que al final del almacenamiento los tratamientos que contenían Quitosano (Com y Opt) tuvieron el mismo efecto antimicrobiano para reducir la cuenta total de bacterias psicrófilas aerobias.

En la **Figura 23** se muestra una representación visual del crecimiento de las bacterias psicrófilas en placas Petri, obtenidas a partir de los diferentes tratamientos empleados en este trabajo, posteriores al almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya procesadas mínimamente.

Pen y Jiang (2003) reportaron que el Quitosano podría evocar mecanismos efectores en respuesta al ataque de microorganismos. Entre ellos, incluyen la activación de enzimas, como la PAL (fenilalanina amonio liasa). Esta enzima es fundamental en la formación de compuestos fenólicos, ya que cataliza la conversión de fenilalanina a ácido trans-cinámico, por lo que, al tratar los frutos con Quitosano, se obtiene una mayor concentración de estos compuestos. Los compuestos fenólicos pueden actuar directamente sobre los patógenos o contribuir a la formación de barreras estructurales que limiten su avance hacia el hospedero.

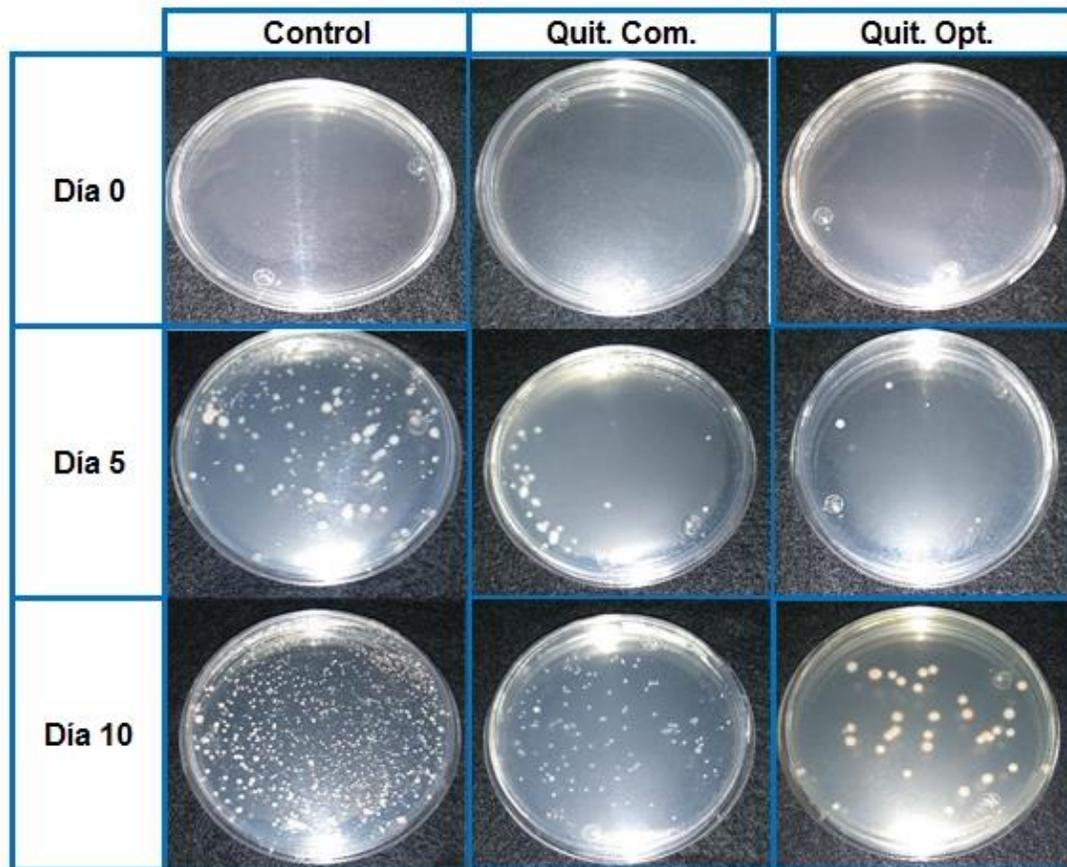


Figura 23. Fotografías que muestran el efecto de los diferentes tratamientos (Control, Quit Com y Quit Opt) aplicados en trozos de papaya “Maradol” almacenada a 5°C por 10 días sobre el crecimiento de bacterias psicrófilas aerobias. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica.

Campaniello y col (2008), evaluaron el efecto de recubrimientos de Quitosano en cerezas, atribuyendo su eficacia a la inhibición del crecimiento de bacterias psicrófilas en todas las condiciones experimentales, reportando diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. El tratamiento de Quitosano resultó en una reducción adicional de carga de las bacterias psicrófilas. Además, las bacterias psicrófilas tenían un crecimiento logarítmico pequeño, independientemente del tipo de envasado; este efecto se prolongó hasta el día 10 de almacenamiento en las muestras tratadas con Quitosano.

Moreira y col (2011) estudiaron el efecto de los recubrimientos de Quitosano en floretes de brócoli, encontraron que el crecimiento de bacterias psicrófilas disminuyó desde el primer día de almacenamiento para aquellos floretes que fueron recubiertos con este biopolímero, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento Control. Este efecto bactericida ejercido por el Quitosano se mantuvo hasta el día diez de almacenamiento. La aplicación de este biopolímero logró una reducción de un ciclo logarítmico, en comparación con el control. Ellos atribuyeron este efecto a la atmósfera modificada originada por el recubrimiento comestible, generando una permeabilidad selectiva a gases, así como, el efecto antimicrobiano de grupos amino cargados positivamente del Quitosano que interactúa con las membranas celulares microbianas con carga negativa, lo cual conduce a la fuga de constituyentes intracelulares proteicos y otros microorganismos.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado por Ayón-Reyna y col (2015), ellos estudiaron el efecto de tratamiento hidrotérmico con cloruro de calcio y Quitosano en papaya procesada mínimamente, reportando un crecimiento

de bacterias psicrófilas de 5.2×10^4 UFC/g para el tratamiento que contenía Quitosano, lográndose inhibir el desarrollo de psicrófilos hasta 6 veces más que el control.

En este trabajo se realizó tinción de Gram tomando una muestra de las bacterias psicrófilas con el fin de visualizar las bacterias y su morfología, por ejemplo la forma (cocos, bacilos, cocobacilos y espirilos) y la agrupación (parejas, racimos, cadenas, empalizadas), además de conocer la proliferación de bacterias Gram-positivas o Gram-negativas. Encontrando que se trataba de estafilococos Gram-negativos (**Anexo 4**).

Las temperaturas bajas de almacenamiento de papaya procesada mínimamente puede permitir el crecimiento de patógenos psicrófilos, como *Listeria monocytógenes* (Ayón-Reyna y col 2015). Se pudo comprobar mediante la tinción de Gram, que en las muestras donde hubo crecimiento de bacterias psicrófilas se observó mayormente bacterias Gram-negativas, por lo que se puede mencionar que las papayas recubiertas con Quitosano no contenían este microorganismo patógeno.

3 Hongos y levaduras

Al día de procesamiento, el conteo de hongos y levaduras fue bajo en todos los tratamientos (Control, Quit Com y Quit Opt), para el día cinco el crecimiento de éstos no fue significativo, ya que no se observaron diferencias estadísticamente significativas para cada uno de los tratamientos. Fue hasta el último día de almacenamiento, que se observaron diferencias significativas entre el tratamiento Control y los tratamientos que emplearon Quitosano, lográndose observar la eficacia de los tratamientos que contenían Quitosano (Com y Opt) para retardar el crecimiento de hongos y levaduras respecto al Control.

En la **Figura 24** se puede observar el comportamiento del crecimiento de hongos y levaduras durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya variedad “Maradol”.

Las rebanadas que no fueron tratadas con Quitosano (control) tuvieron el máximo crecimiento de hongos y levaduras al día diez de almacenamiento, alcanzando un valor promedio de 1.58×10^6 UFC/g, seguido del tratamiento Quitosano Com con un promedio de 2.28×10^5 . Los tratamientos que tuvieron el menor recuento de hongos y levaduras fueron los que contenían Quitosano (Com y Opt) con valores promedio de 2.28×10^5 y 1.98×10^5 , respectivamente; entre los tratamientos a base de Quitosano (Com y Opt) no presentaron diferencias estadísticamente significativas mostrando un comportamiento similar durante los diez días de almacenamiento de rebanadas de papaya procesada mínimamente y almacenada a 5°C.

En la **Figura 25** se puede observar visualmente el crecimiento de hongos y levaduras en placas Petri cultivadas a partir de los diferentes tratamientos sobre rebanadas de papaya procesadas mínimamente, posteriormente a su almacenamiento por diez días a 5°C.

Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con lo reportado por (Durango y col 2006), ellos reportaron una importante acción fungicida del Quitosano aplicado en zanahoria procesadas mínimamente. Observaron una disminución en el crecimiento de hongos y levaduras durante los días de almacenamiento, teniendo diferencias estadísticamente significativas con el control.

Bautista-Baños y col (2006a) mencionaron que el Quitosano no sólo es eficaz en detener el crecimiento del patógeno, sino que también induce cambios morfológicos

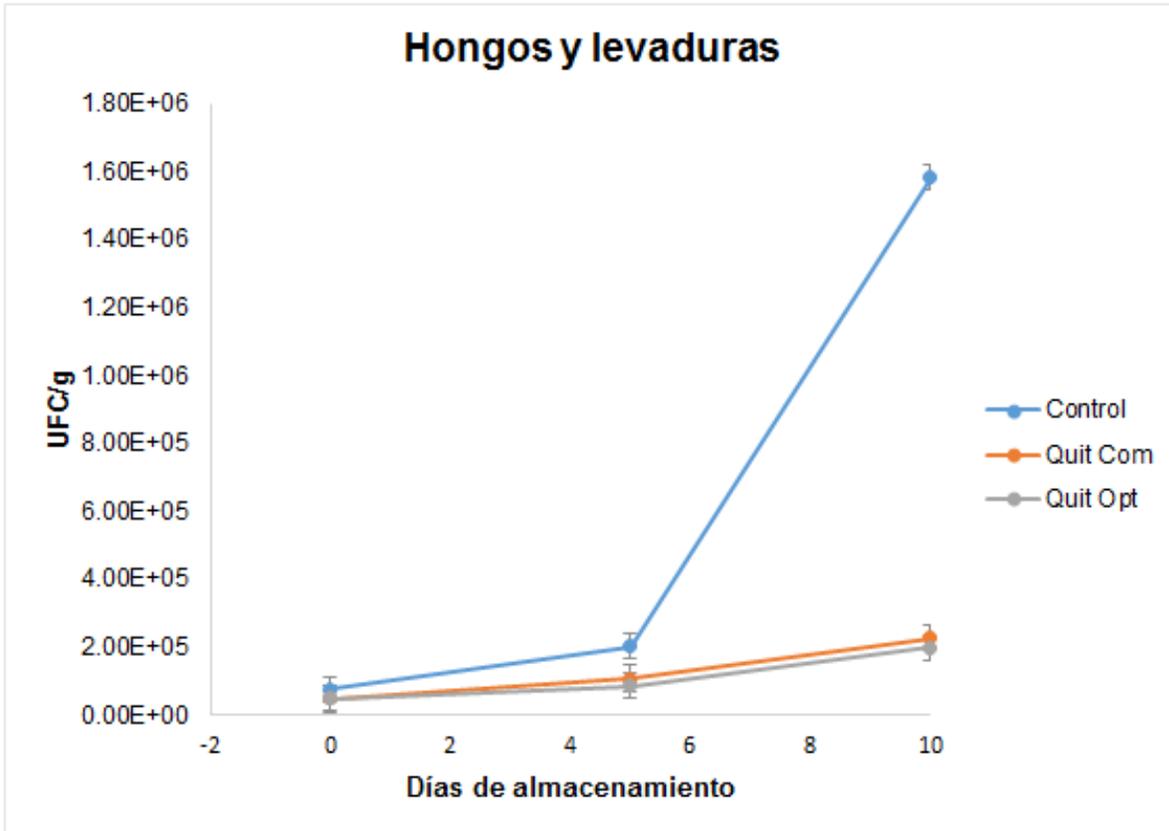


Figura 24. Recuento de hongos y levaduras durante el almacenamiento a 5°C de rebanadas de papaya “Maradol” procesadas mínimamente. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica. Cada punto representa la media de 9 repeticiones \pm la desviación estándar.

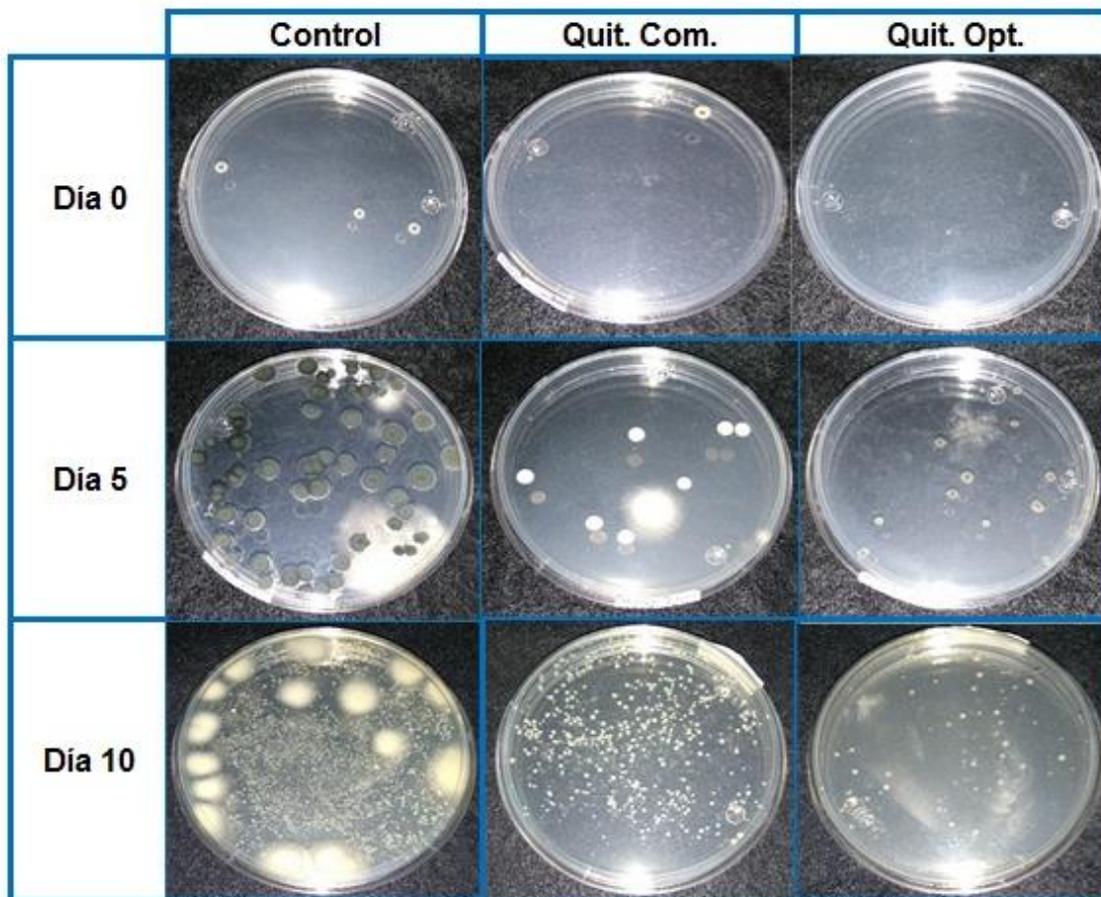


Figura 25. Fotografías que muestran el efecto de los diferentes tratamientos (Control, Quit Com y Quit Opt) aplicados en trozos de papaya “Maradol” almacenada a 5°C por 10 días sobre el crecimiento de hongos y levaduras. Control=rebanadas de papaya procesadas mínimamente sin la aplicación de película de Quitosano, Quit Com=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano comercial y Quit Opt=rebanadas de papaya procesadas mínimamente con la aplicación de película de Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación láctica.

marcados, alteraciones estructurales y desorganización molecular de las células de hongos. Se cree que esta actividad está relacionada con la naturaleza de este compuesto policatiónico y es la clave para sus propiedades antifúngicas y que la longitud de la cadena de polímero mejora su actividad antifúngica.

Ali y col (2010) reportaron una disminución en la proliferación de hongos en papaya tratada con soluciones de Quitosano. Al evaluar diferentes concentraciones de este biopolímero, encontraron que una solución al 2% fue la que mayor inhibición tuvo. Se encontraron diferencias significativas a partir del día 7 de almacenamiento, comportamiento observado en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos en este trabajo no coinciden con lo reportado por Moreira y col (2011), estos autores no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre floretes de brócoli recubiertas con Quitosano y floretes sin cubiertas (control) durante catorce días de almacenamiento. Ellos comentan que esto pudo deberse a que la flora de hongos y levaduras en brócoli es más resistente a tratamientos antimicrobianos, respecto a otras frutas y verduras.

López-Mata y col (2012), evaluaron el efecto de cubiertas de Quitosano sobre fresa, encontrando que los tratamientos a base de este biopolímero tuvieron menor crecimiento de hongos y levaduras, teniendo diferencias significativas con el control desde el día de procesamiento, manteniendo este comportamiento hasta el final del almacenamiento.

Bautista-Baños y col (2013), reportaron el efecto de cubiertas de Quitosano en papaya, se han estudiado distintas concentraciones en este fruto, observaron que la concentración de 3% fue la que tuvo mayor inhibición. Se han propuesto diferentes

mecanismos de acción, sin embargo, el más apoyado se asocia con la naturaleza catiónica del Quitosano, la cual se asocia fuertemente con la composición de la membrana celular de los hongos, afectando a su integridad y permeabilidad.

López-Mora y col (2013), estudiaron la actividad antifúngica de Quitosano aplicado sobre mango, observando que, en comparación con el control, los tratamientos con Quitosano influyeron en el crecimiento de hongos y levaduras. El menor crecimiento se encontró a una concentración de 1%. Esto podría deberse a las características del Quitosano utilizado y al fruto evaluado. Los autores mencionan además, que concentraciones superiores a 1.5% inhiben el desarrollo de hongos por completo, sin embargo, este efecto depende en gran medida del microorganismo evaluado.

Dotto y col (2015), al evaluar el efecto de la aplicación de Quitosano en papaya sobre las características de calidad y el crecimiento de microorganismos, observaron que los frutos a los que les aplicaron una solución que contenía este biopolímero, presentaron el menor crecimiento de hongos y levaduras comparado con las no tratadas después del quinto día de almacenamiento.

Se realizó tinción de Gram a las muestras con proliferación de hongos y levaduras para conocer la morfología de las mismas, pudiendo observarse en el **Anexo 5**.

XI CONCLUSIONES

1. Se optimizaron las condiciones del proceso de obtención de Quitina y Quitosano a partir de residuos de camarón, empleando fermentación láctica y subproductos de las industrias láctea y azucarera como fuente de inóculo y energía, utilizando la metodología de superficie respuesta. La mejor combinación de las variables de proceso (tiempo de fermentación y concentración de azúcar) fue 180 h y 8.7 °Brix, en donde se estimaron los valores de 0.29% de cenizas, 2.02% de rendimiento y un GD de 86.30%.
2. Quitosano obtenido en las mejores condiciones de procesamiento tuvo un contenido de cenizas de 0.23%, un rendimiento de 2.03% y un DG de 83%, valores similares a los predichos, indicando que los modelos de predicción para estas respuestas fueron adecuados y reproducibles. Estos valores experimentales indican que el Quitosano obtenido en las mejores condiciones de procesamiento resultó ser de buena calidad y similar a los Quitosanos reportados en la literatura, así como, al Quitosano comercial (Quitosano obtenido por el método químico convencional).
3. El tratamiento con Quitosano obtenido en las mejores condiciones de procesamiento retardó la pérdida de color y acidez titulable, y el aumento de pH de rebanadas de papaya procesadas mínimamente y almacenada a 5°C durante 10 días y no presentó diferencias significativas con el Quitosano comercial (Quitosano obtenido por el método químico convencional).
4. El contenido de sólidos solubles totales y la firmeza de rebanadas de papaya procesadas mínimamente y almacenada a 5°C durante 10 días no fueron

afectados por los tratamientos con Quitosano ni por el tiempo de almacenamiento.

5. El tratamiento con Quitosano obtenido en las mejores condiciones de procesamiento retardó el crecimiento de bacterias mesófilas y psicrófilas, así como el crecimiento de hongos y levaduras, de rebanadas de papaya procesadas mínimamente y almacenada a 5°C durante 10 días y no presentó diferencias significativas con el Quitosano (Quitosano obtenido por el método químico convencional).
6. Con base a los resultados obtenidos en este trabajo, el tratamiento con Quitosano obtenido con condiciones optimizadas de fermentación ácido láctica podría aplicarse en otros frutos como recubrimiento para mantener sus características de calidad y retardar el crecimiento microbiano durante el almacenamiento de los frutos procesados mínimamente, de manera similar a lo reportado para Quitosano obtenido por el método químico convencional.

IX BIBLIOGRAFIA

- Ahmed S, Ahmad M, Ikram S. 2014. Chitosan: A Natural Antimicrobial Agent-A Review. *Journal of Applicable Chemistry* 3(2):493-503.
- Aider M. 2010. Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT-Food Science and Technology* 43(6):837-842.
- Ali A, Muhammad MTM, Sijam K, Siddiqui Y. 2010. Potential of chitosan coating in delaying the postharvest anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) of Eksotika II papaya. *International journal of food science & technology* 45(10):2134-2140.
- Ali A, Muhammad MTM, Sijam K, Siddiqui Y. 2011. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry* 124(2):620-626.
- Alishahi A, Aider M. 2012. Applications of chitosan in the seafood industry and aquaculture: a review. *Food and Bioprocess Technology* 5(3):817-830.
- Aljawish A, Chevalot I, Jasniewski J, Scher J, Muniglia L. 2015. Enzymatic synthesis of chitosan derivatives and their potential applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 112:25-39.
- AOAC. 2012. *Official Methods of Analysis*. 19th ed. Association of Official Analytical Chemists Washington, D. C. USA.
- Arancibia M, López-Caballero M, Gómez-Guillén M, Montero P. 2015. Chitosan coatings enriched with active shrimp waste for shrimp preservation. *Food Control* 54:259-266.
- Arancibia MY, Alemán A, Calvo MM, López-Caballero ME, Montero P, Gómez-Guillén MC. 2014. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. *Food Hydrocolloids* 35:710-717.
- Arango-Wiesner. 2012. *Manual de asistencia técnica no. 4: El cultivo de papaya en los llanos orientales de Colombia*. Disponible de:

http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Cultivo%20de%20la%20papaya.pdf.

Consultado el 27 Julio del 2016.

Argañosa ACS, Raposo MFJ, Teixeira P, Morais AM. 2008. Effect of cut-type on quality of minimally processed papaya. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88(12):2050-2060.

Ayón-Reyna LE, Tamayo-Limón R, Cárdenas-Torres F, López-López ME, López-Angulo G, López-Moreno HS, López-Cervántes J, López-Valenzuela JA, Vega-García MO. 2015. Effectiveness of Hydrothermal-Calcium Chloride Treatment and Chitosan on Quality Retention and Microbial Growth during Storage of Fresh-Cut Papaya. *Journal of food science* 80(3):C594-C601.

Badawy MEI, Rabea EI. 2009. Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology* 51(1):110-117.

Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo AN, Velázquez-del Valle MG, Hernández-López M, Ait Barka E, Bosquez-Molina E, Wilson CL. 2006a. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. *Crop Protection* 25(2):108-118.

Bautista-Baños S, López MH, Sánchez DG, Tejacal IA. 2006b. Influencia del recubrimiento con quitosano y la temperatura de almacenamiento en la calidad postcosecha y niveles de infección en la ciruela mexicana. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 7(2):114-121.

Bautista-Baños S, Sivakumar D, Bello-Pérez A, Villanueva-Arce R, Hernández-López M. 2013. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection* 49:8-20.

- Benhabiles M, Salah R, Lounici H, Drouiche N, Goosen M, Mameri N. 2012. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids* 29(1):48-56.
- Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76(5):965-977.
- Bierhals VS, Chiumarelli M, Hubinger MD. 2011. Effect of Cassava Starch Coating on Quality and Shelf Life of Fresh-Cut Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merrill cv "Pérola"). *Journal of food science* 76(1):E62-E72.
- Blanco A, García-Abuín A, Gómez-Díaz D, Navaza JM. 2013. Physicochemical characterization of chitosan derivatives. *CyTA - Journal of Food* 11(2):190-197.
- Bof MJ, Bordagaray VC, Locaso DE, García MA. 2015. Chitosan molecular weight effect on starch-composite film properties. *Food Hydrocolloids* 51:281-294.
- Bojórquez Gálvez A, Vega García M, Caro Corrales J, Carrillo López A, López Valenzuela JA. 2010. EFFECT OF GRADUAL COOLING STORAGE ON CHILLING INJURY AND PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE ACTIVITY IN TOMATO FRUIT. *Journal of food biochemistry* 34(2):295-307.
- Campaniello D, Bevilacqua A, Sinigaglia M, Corbo M. 2008. Chitosan: Antimicrobial activity and potential applications for preserving minimally processed strawberries. *Food microbiology* 25(8):992-1000.
- Can AS, Erdal MS, Güngör S, Özsoy Y. 2013. Optimization and characterization of chitosan films for transdermal delivery of ondansetron. *Molecules* 18(5):5455-5471.
- Caprile MD. 2005. Obtención y utilización de quitina y quitosano a partir de desechos de crustáceos.

- Cardoso A, Lins CIM, dos Santos ER, Silva MCF, Campos-Takaki GM. 2012. Microbial enhance of chitosan production by *Rhizopus arrhizus* using agroindustrial substrates. *Molecules* 17(5):4904-4914.
- Ceballos-Chan G. 2005. Estudios en papaya mínimamente procesada por deshidratación osmótica. Directores: Chiralt-Boix MA, Talens-Oliag P. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Departamento de Tecnología de alimentos. Valencia, España.
- Cira LA, Huerta S, Hall GM, Shirai K. 2002. Pilot scale lactic acid fermentation of shrimp wastes for chitin recovery. *Process Biochemistry* 37(12):1359-1366.
- Colina M, Ayala A, Rincón D, Molina J, Medina J, Inciarte R, Vargas J, Montilla B. 2014. Evaluación de los procesos para la obtención química de quitina y quitosano a partir de desechos de cangrejos. Escala piloto e industrial. *Rev. Iberoam. Polim* 15(1):21-43.
- Czechowska-Biskup R, Jarosińska D, Rokita B, Ulański P, Rosiak JM. 2012. Determination of degree of deacetylation of chitosan-comparison of methods. *Prog. Chem. Appl. Chitin Its Deriv* 17:5-20.
- Chatterjee S, Adhya M, Guha A, Chatterjee B. 2005. Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry* 40(1):395-400.
- Chatterjee S, Guha A. 2014. A study on biochemical changes during cultivation of *Rhizopus oryzae* in deproteinized whey medium in relation to chitosan production. *Letters in applied microbiology* 59(2):155-160.
- Chien P-J, Sheu F, Yang F-H. 2007. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering* 78(1):225-229.
- Chien R-C, Yen M-T, Mau J-L. 2016. Antimicrobial and antitumor activities of chitosan from shiitake stipes, compared to commercial chitosan from crab shells. *Carbohydrate Polymers* 138:259-264.

- Danyen M, Boodia N, Ruggoo A. 2012. Effect Of Cutting Shapes And Thicknesses On The Quality Of Minimally Processed Pineapple (*Ananas Comosus*), Cv. 'Queen Victoria'.
- de Alvarenga ES. 2011. Characterization and properties of chitosan. *Biotechnology of biopolymers* 91.
- de la Paz N, Fernández M, López OD, Nogueira A, García CM, Pérez D, Tobella JL, de Oca YM, Díaz D. 2012. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE OBTENCIÓN DE QUITOSANO DERIVADA DE LA QUITINA DE LANGOSTA. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 13:3.
- Dotto GL, Vieira ML, Pinto LA. 2015. Use of chitosan solutions for the microbiological shelf life extension of papaya fruits during storage at room temperature. *LWT-Food Science and Technology* 64(1):126-130.
- Dragostin OM, Samal SK, Dash M, Lupascu F, Pânzariu A, Tuchilus C, Ghetu N, Danciu M, Dubruel P, Pieptu D. 2016. New antimicrobial chitosan derivatives for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers* 141:28-40.
- Du Y, Zhao Y, Dai S, Yang B. 2009. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10(1):103-107.
- Duan S, Li L, Zhuang Z, Wu W, Hong S, Zhou J. 2012. Improved production of chitin from shrimp waste by fermentation with epiphytic lactic acid bacteria. *Carbohydrate Polymers* 89(4):1283-1288.
- Durango A, Soares N, Andrade N. 2006. Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control* 17(5):336-341.
- Dutta P, Tripathi S, Mehrotra G, Dutta J. 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry* 114(4):1173-1182.

- FAO. 2016. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- FAOSTAT. 2014. Base de datos estadísticos de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Disponible de: <http://faostat.fao.org>. Consultado el 1 de Agosto del 2016.
- Franco M. 2010. Extracción de Astaxantina a Partir de Residuos de Camarón Ensilados por Métodos Ácido y Bacteriano. [Tesis de Doctorado] Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa(Iztapalapa, México).
- Gamal RF, El-Tayeb TS, Raffat EI, Ibrahim HM, Bashandy A. 2016. Optimization of chitin yield from shrimp shell waste by *Bacillus subtilis* and impact of gamma irradiation on production of low molecular weight chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*:598-608.
- Gayosso-García Sancho L, Yahia EM, Martínez-Téllez MA, González-Aguilar GA. 2010. Effect of maturity stage of papaya maradol on physiological and biochemical parameters. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 5(2):194-203.
- Ghorbel-Bellaaj O, Hajji S, Younes I, Chaabouni M, Nasri M, Jellouli K. 2013. Optimization of chitin extraction from shrimp waste with *Bacillus pumilus* A1 using response surface methodology. *International Journal of Biological Macromolecules* 61:243-250.
- Giraldo JD. 2015. PROPIDADES, OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y APLICACIONES DEL QUITOSANO.
- Godoy RP. 2008. Factibilidad Técnico Económica de Producción de Astaxantina a Partir del Cultivo de *Haematococcus Pluviales*. [Tesis de Licenciatura] FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y MATEMATICAS, UNIVERSIDAD DE CHILE, Santiago, Chile.
- González-Aguilar GA, Monroy-García I, Goycoolea-Valencia F, Diaz-Cinco M, Ayala Zavala JF. 2005. Cubiertas comestibles de quitosano. Una alternativa para prevenir el deterioro microbiano y conservar la calidad de papaya fresca cortada. *Proceedings of the*

- Simposium "Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados" La Habana, Cuba:121-133.
- Gonzalez-Aguilar GA, Celis J, Sotelo-Mundo RR, De La Rosa LA, Rodrigo-Garcia J, Alvarez-Parrilla E. 2008. Physiological and biochemical changes of different fresh-cut mango cultivars stored at 5° C. *International journal of food science & technology* 43(1):91-101.
- González M, Lobo M. 2005. Técnicas de conservación. En: González-Aguilar GA, Gardea AA, Cuamea-Navarro F, editores. *Nuevas tecnologías de conservación de productos vegetales frescos cortados*. México: CIAD. (p 98.).
- Gortari MC, Hours RA. 2013. Biotechnological processes for chitin recovery out of crustacean waste: A mini-review. *Electronic Journal of Biotechnology* 16(3):14-14.
- Hajji S, Younes I, Ghorbel-Bellaaj O, Hajji R, Rinaudo M, Nasri M, Jellouli K. 2014. Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources. *International Journal of Biological Macromolecules* 65:298-306.
- Hamer SN, Cord-Landwehr S, Biarnés X, Planas A, Waegeman H, Moerschbacher BM, Kolkenbrock S. 2015. Enzymatic production of defined chitosan oligomers with a specific pattern of acetylation using a combination of chitin oligosaccharide deacetylases. *Scientific reports* 5.
- Heidary-Vinche M, Asachi R, Zamani A, Karimi K. 2013. Ethanol and chitosan production from wheat hydrolysate by *Mucor hiemalis*. *Journal of chemical technology and biotechnology* 88(NOM-092):255-260.
- Hernández AE, Cardozo CJM, Florez CER, Cordoba LJP. 2014. Aplicación de tecnología de barreras para la conservación de mezclas de vegetales mínimamente procesados. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 67(NOM-111):7237-7245.
- Hernández HC, Águila EA, Augustin O, Nava EV, Casselis E. 2009. Obtención y caracterización de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón. *Superficies y vacío* 22(3):57-60.

- Hernández I. 2013. Revisión bibliográfica LA QUITOSANA: UN PRODUCTO BIOACTIVO DE DIVERSAS APLICACIONES. *Cultivos Tropicales* 25(3):97-110.
- Hernández Y, González M, MG. L. 2007. Importancia del grado de madurez en el procesado mínimo de frutas. V Congreso iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones; 29 de mayo-1 de junio; Cartagena, Murcia, España. Disponible en: <http://www.icia.es/icia/download/fruticulturatropical/AITEP2007Madurez%20frutas.pdf>
- Hernández Y, Lobo MG, M. G. 2005. Evaluación de la aptitud de dos cultivares de papaya (baixinho do santa amalia y maradol) al procesado mínimo. Simposium "Nuevas tecnologías de conservación y envasado de frutas y hortalizas. Vegetales frescos cortados" La Habana, Cuba. :135 p.
- Hirano S. 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polymer International* 48(8):732-734.
- Honary S, Ghajar K, Khzaeli P, Shalchian P. 2011. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver-chitosan nanocomposites using different molecular weight grades of chitosan. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 10(NOM-111).
- Hong K, Xie J, Zhang L, Sun D, Gong D. 2012. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae* 144:172-178.
- Hosseini SF, Rezaei M, Zandi M, Ghavi FF. 2013. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. *Food Chemistry* 136(3):1490-1495.
- INFOAGRO ITA. 2016. El cultivo de la papaya. Disponible de: http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/papaya.htm.(Consultado el 22 de Julio del 2016).
- Islam MM, Masum SM, Rahman MM, Molla M, Shaikh A, Roy S. 2011. Preparation of chitosan from shrimp shell and investigation of its properties. *International Journal of Basic & Applied Sciences* 11(NOM-111):116-130.

- Jiménez JÁA, Castro H, Serna A, Nava AD,Guadarrama B. 2010. Características fenotípicas y agronómicas de seis genotipos de papaya (*Carica papaya* L.) de Tuxpan, Guerrero, México. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 1:035-046.
- Juárez J. 2010. Estudio del uso de enzimas comerciales en la preparación de quitina a partir de desperdicios de camarón. [Tesis de Licenciatura] Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa (Iztapalapa, México).
- Juárez J. 2012. Obtención y Caracterización de Quitina Biológica y su Desacetilación a Quitosano. [Tesis de Maestría] Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa (Iztapalapa, México):16-19.
- Jung EJ, Youn DK, Lee SH, No HK, Ha JG,Prinyawiwatkul W. 2010. Antibacterial activity of chitosans with different degrees of deacetylation and viscosities. *International journal of food science & technology* 45(4):676-682.
- Kaya M, Asan-Ozusaglam M,Erdogan S. 2015. Comparison of antimicrobial activities of newly obtained low molecular weight scorpion chitosan and medium molecular weight commercial chitosan. *Journal of bioscience and bioengineering*.
- Khanafari A, Marandi R,Sanatei S. 2008. Recovery of chitin and chitosan from shrimp waste by chemical and microbial methods. *Journal of Environmental Health Science & Engineering* 5(1):1-24.
- Kim KW, Min B, Kim Y-T, Kimmel RM, Cooksey K,Park S. 2011. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT-Food Science and Technology* 44(2):565-569.
- Krishna K, Paridhavi M,Patel JA. 2008. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya* Linn.). *Natural product radiance* 7(4):364-373.
- Kurek M, Guinault A, Voilley A, Galić K,Debeaufort F. 2014. Effect of relative humidity on carvacrol release and permeation properties of chitosan based films and coatings. *Food Chemistry* 144:9-17.

- Lárez-Velásquez C. 2006. Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en química* 1(2):15-21.
- Li Q, Gooneratne S, Wang R, Zhang R, An L, Chen J, Pan W. 2016. Effect of different molecular weight of chitosans on performance and lipid metabolism in chicken. *Animal Feed Science and Technology* 211:174-180.
- López-Mata MA, Ruiz Cruz S, Navarro Preciado C, Ornelas Paz JdJ, Estrada Alvarado MI, Gassos Ortega LE, Rodrigo García J. 2012. Efecto de recubrimientos comestibles de Quitosano en la reducción microbiana y conservación de la calidad de fresas. *BIOtecnia* 14(1):33-43.
- López-Mora LI, Gutiérrez-Martínez P, Bautista-Baños S, Jiménez-García LF, Zavaleta-Mancera HA. 2013. Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango 'Tommy Atkins' durante el almacenamiento. *Revista Chapingo. Serie horticultura* 19(3):315-331.
- López MÁ. 2012. Obtención y caracterización de quitosanos modificados: Ingredientes funcionales con aplicaciones tecnológicas y biológicas en la industria alimentaria. [Tesis de Doctorado] Universidad Complutense de Madrid (Madrid, España):11.
- Luna-Estrada YDC. 2012. Obtención de quitosano a partir de quitina para su empleo en conservación de frutillas y moras. [Tesis de Licenciatura] UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR (FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA, CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA): Quito, Ecuador.
- Marcia E, Malespín J, Sánchez M, Benavente M. 2011. Estudio de la fermentación láctica para la extracción de quitina a partir de desechos de crustáceos. *Nexo Revista Científica* 24(1):33-42.
- Marcillo M, Vélez M. 2011. Planta procesadora de desechos de camarón y cangrejo para la obtención de quitina y extracto colorante. [Tesis de Licenciatura] Universidad de Guayaquil (Guayaquil, Ecuador).

- Mármol Z, Gutiérrez E, Páez G, Ferrer J, Rincón M. 2004. Desacetilación termoalcalina de quitina de conchas de camarón. *Multiciencias* 4(2).
- Mármol Z, Páez G, Rincón M, Araujo K, Aiello C, Chandler C, Gutiérrez E. 2011. Quitina y quitosano polímeros amigables. Una revisión de sus aplicaciones. *Revista Tecnocientífica* 1:53-58.
- Mellegard H, Strand SP, Christensen BE, Granum PE, Hardy SP. 2011. Antibacterial activity of chemically defined chitosans: influence of molecular weight, degree of acetylation and test organism. *Int J Food Microbiol* 148(1):48-54.
- Meyers RH, Montgomery DC. 2002. Response surface methodology. *Process and Product Optimisation Using Design Experiments*, second ed, Wiley, New York, NY.
- Mohammed MH, Williams PA, Tverezovskaya O. 2013. Extraction of chitin from prawn shells and conversion to low molecular mass chitosan. *Food Hydrocolloids* 31(2):166-171.
- Molina R, Vicente AA, Aguilar CN. 2015. Advances in preservation of fruits and vegetables with bioactive coatings. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos* 33(2):45-58.
- Montero-Calderón M. 2011. Fruits and vegetables for the fresh-cut processing industry. Internal quality profile and influence of packaging conditions on fresh-cut pineapple:15.
- Moreira MdR, Roura SI, Ponce A. 2011. Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli. *LWT-Food Science and Technology* 44(10):2335-2341.
- [NOM-092] Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994). Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
- [NOM-093] Norma Oficial Mexicana (NOM-092-SSA1-1994). Bienes y servicios. Placas de higiene y sanidad en la preparación de alimentos que se ofrecen en establecimientos fijos.

[NOM-111] Norma Oficial Mexicana (NOM-093-SSA1-1994). Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

Niu X-f, Tian F, Wang L-z, Li X-m, Zhou G, Fan Y-b. 2013. Synthesis and characterization of chitosan-graft-poly (lactic acid) copolymer. *Chinese Journal of Polymer Science* 32(1):43-50.

Pacheco N, Garnica-Gonzalez M, Gimeno M, Bárzana E, Trombotto S, David L, Shirai K. 2011. Structural characterization of chitin and chitosan obtained by biological and chemical methods. *Biomacromolecules* 12(9):3285-3290.

Pacheco NA. 2010. Extracción biotecnológica de quitina para la producción de quitosanos: caracterización y aplicación. Universidad Autónoma Metropolitana: Unidad Iztapalapa.

Parada LG, Amashta IAK, Crespín G, Miranda R. 2004. Caracterización de quitosano por viscosimetría capilar y valoración potenciométrica. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 5(1):1.

Park SH, Lee HS, Choi JH, Jeong CM, Sung MH, Park HJ. 2012. Improvements in barrier properties of poly (lactic acid) films coated with chitosan or chitosan/clay nanocomposite. *Journal of Applied Polymer Science* 125(S1).

Pen L, Jiang Y. 2003. Effects of chitosan coating on shelf life and quality of fresh-cut Chinese water chestnut. *LWT-Food Science and Technology* 36(3):359-364.

Petriccione M, De Sanctis F, Pasquariello MS, Mastrobuoni F, Rega P, Scortichini M, Mencarelli F. 2015. The effect of chitosan coating on the quality and nutraceutical traits of sweet cherry during postharvest life. *Food and Bioprocess Technology* 8(2):394-408.

Propapaya. 2012. Situación actual de la papaya. Programa de Desarrollo de Capacidades, Innovación Tecnológica y Extensionismo Rural, SAGARPA. México Disponible en: <http://propapaya.org/acerca-de-la-papaya/situacion-de-la-papaya>.

Puga-López D, Ponce-Palafox J, Barba-Quintero G, Torres-Herrera MR, Romero-Beltrán E, Figueroa JA. 2013. A Comparative Study of Physico-Chemical, Proximate

- Composition and Microbiological Muscle Properties, in Two Species Shrimps of the Pacific Tropical Coast. *Journal of Agricultural Science and Applications* 2(3).
- Qi H, Hu W, Jiang A, Tian M, Li Y. 2011. Extending shelf-life of fresh-cut 'Fuji' apples with chitosan-coatings. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 12(1):62-66.
- Radwan MA, Farrag SA, Abu-Elamayem MM, Ahmed NS. 2012. Extraction, characterization, and nematocidal activity of chitin and chitosan derived from shrimp shell wastes. *Biology and Fertility of Soils* 48(4):463-468.
- Ragaert P, Devlieghere F, Debevere J. 2007. Role of microbiological and physiological spoilage mechanisms during storage of minimally processed vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 44(3):185-194.
- Ramírez-Coutiño L, del Carmen Marín-Cervantes M, Huerta S, Revah S, Shirai K. 2006. Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry* 41(5):1106-1110.
- Ramírez JCR, Ulloa PR, Velázquez MY, González JAU, Romero FA. 2011. Bacterias lácticas: Importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Revista Fuente Año* 2(7).
- Ramos-García MdL, Bautista-Baños S, Barrera-Necha LL, Bosquez-Molina E, Alia-Tejagal I, Estrada-Carrillo M. 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1):44-57.
- Rao MS, Stevens WF. 2005. Chitin production by *Lactobacillus* fermentation of shrimp biowaste in a drum reactor and its chemical conversion to chitosan. *Journal of chemical technology and biotechnology* 80(9):1080-1087.
- Rêgo T, Cadaval T, Dotto G, Pinto L. 2013. Statistical optimization, interaction analysis and desorption studies for the azo dyes adsorption onto chitosan films. *Journal of colloid and interface science* 411:27-33.

- Rodríguez O, Monserrat A. 2013. Tratamiento químico y biotecnológico de residuos de camarón para la obtención de productos de valor agregado. [Tesis de Licenciatura] FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, ZONA XALAPA (Universidad Veracruzana):Xalapa, Veracruz, México.
- Ross S. 2000. Functional foods: the Food and Drug Administration perspective. *The American journal of clinical nutrition* 71(6):1735s-1738s.
- Ruiz-Cruz S, Guevara-Gálvez C, Estrada-Alvarado I, Cira-Chavéz L, Gassós-Ortega L, Llenez-Samaniego A. 2010. Aplicación de películas comestibles a base de quitosano y almidón para mantener la calidad sensorial y microbiológica de melón fresco cortado. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica* 1(1):1-11.
- Saborío D, Sáenz V, Arauz LF, Bertsch F. 2000. Efecto del calcio en aplicaciones precosecha y poscosecha sobre la severidad de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y la calidad de frutos de papaya (*Carica papaya*). *Agronomía Costarricense* 24(2):77-88.
- SAGARPA. 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesca. Avance de siembras y cosechas. Disponible de: <http://www.siap.gob.mx/>. Consultado el 1 de Agosto del 2016.
- Sánchez MR, Gorinstein S, Belloso OM, García HA, Aguilar GAG, Valenzuela RC. 2007. Frutos tropicales mínimamente procesados: Potencial antioxidante y su impacto en la salud. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América* 32(4):227-232.
- Sanjinez-Argandoña EJ, Branco IG, Takito SY, Corbari J. 2010. Influencia de la deshidratación osmótica y de la adición de cloruro de calcio en la conservación de kivis mínimamente procesados. *Food Science and Technology (Campinas)* 30:205-209.
- Santamaría Basulto F, Díaz Plaza R, Sauri Duch E, Espadas y Gil F, Santamaría Fernández JM, Larqué Saavedra A. 2009. Características de calidad de frutos de papaya Maradol en la madurez de consumo. *Agricultura técnica en México* 35(3):347-353.

- Sierra DME, Orozco CPO, Rodríguez MAQ, Villa WAO. 2013. Optimización de un protocolo de extracción de quitina y quitosano desde caparazones de crustáceos. *Scientia et Technica* 18(1):260-266.
- Sillani S, Nassivera F. 2015. Consumer behavior in choice of minimally processed vegetables and implications for marketing strategies. *Trends in food Science & technology* 46(2):339-345.
- Sun Y, Zhang J, Wu S, Wang S. 2014. Statistical optimization for production of chitin deacetylase from *Rhodococcus erythropolis* HG05. *Carbohydr Polym* 102:649-652.
- Tayel AA, Ibrahim SI, Al-Saman MA, Moussa SH. 2014. Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat. *International Journal of Biological Macromolecules* 69:471-475.
- Teli MD, Sheikh J. 2012. Extraction of chitosan from shrimp shells waste and application in antibacterial finishing of bamboo rayon. *Int J Biol Macromol* 50(5):1195-1200.
- Tezotto-Uliana JV, Fargoni GP, Geerdink GM, Kluge RA. 2014. Chitosan applications pre-or postharvest prolong raspberry shelf-life quality. *Postharvest Biology and Technology* 91:72-77.
- Thakhiew W, Devahastin S, Soponronnarit S. 2013. Physical and mechanical properties of chitosan films as affected by drying methods and addition of antimicrobial agent. *Journal of Food Engineering* 119(NOM-111):140-149.
- Tirkey B, Pal US, Bal LM, Sahoo NR, Bakhara CK, Panda MK. 2014. Evaluation of physico-chemical changes of fresh-cut unripe papaya during storage. *Food Packaging and Shelf Life* 1(NOM-092):190-197.
- Valdes Arevalo A, Valdez Aguirre LA. 2014. El cultivo de la papaya (*Carica papaya* L.).
- van den Broek LA, Knoop RJ, Kappen FH, Boeriu CG. 2015. Chitosan films and blends for packaging material. *Carbohydr Polym* 116:237-242.

- Velásquez CL. 2003. Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 4(NOM-092):91.
- Villacorta LM, Vásquez CP, Medina CM. 2015. Efecto de la dosis de irradiación UV-C y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, microbiológicas, y antioxidantes en rebanadas de carambola (*Averrhoa carambola* L.), variedad Golden Star mínimamente procesada. *PUEBLO CONTINENTE* 23(2):353-369.
- Wang Q, Tian F, Feng Z, Fan X, Pan Z, Zhou J. 2015. Antioxidant activity and physicochemical properties of chitosan films incorporated with *Lycium barbarum* fruit extract for active food packaging. *International journal of food science & technology* 50(2):458-464.
- Xia W, Liu P, Zhang J, Chen J. 2011. Biological activities of chitosan and chitooligosaccharides. *Food Hydrocolloids* 25(2):170-179.
- Yang G, Yue J, Gong X, Qian B, Wang H, Deng Y, Zhao Y. 2014. Blueberry leaf extracts incorporated chitosan coatings for preserving postharvest quality of fresh blueberries. *Postharvest Biology and Technology* 92:46-53.
- Younes I, Rinaudo M. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs* 13(3):1133-1174.
- Younes I, Sellimi S, Rinaudo M, Jellouli K, Nasri M. 2014. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. *Int J Food Microbiol* 185:57-63.
- Youwei Y, Yinzhe R. 2013. Effect of chitosan coating on preserving character of post-harvest fruit and vegetable: a review. *Journal of Food Processing & Technology* 2013.
- Zamarrón KFR, Cabrera LEP, Carrillo RER. 2014. QUITOSANOS DE *Cherax quadricarinatus* UTILIZADOS COMO RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES SOBRE FRUTOS DE FRESAS MÍNIMAMENTE PROCESADAS. *Ciencia y tecnología agropecuaria de México* 2:36-43.

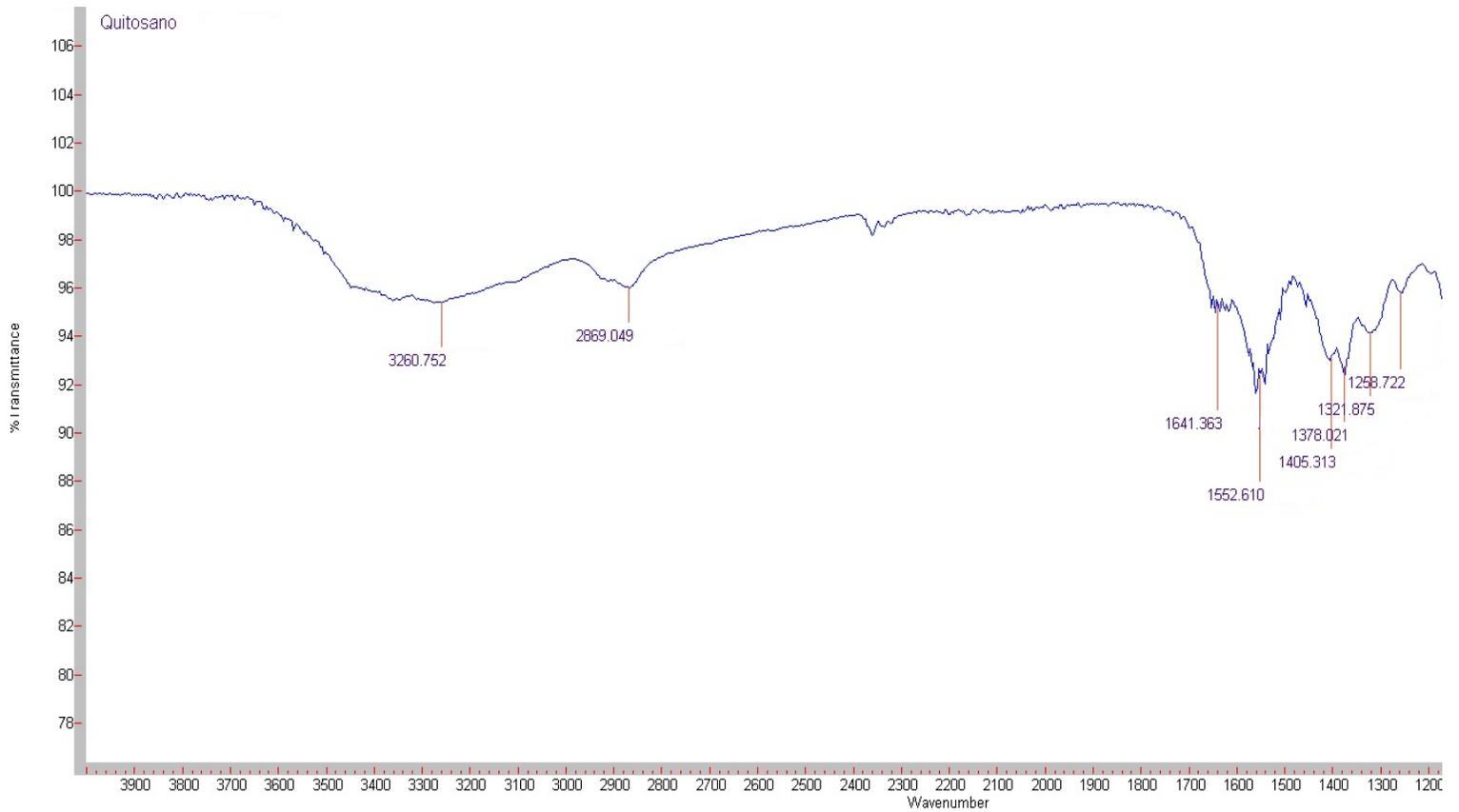
- Zhang H, Yang S, Fang J, Deng Y, Wang D, Zhao Y. 2014. Optimization of the fermentation conditions of *Rhizopus japonicus* M193 for the production of chitin deacetylase and chitosan. *Carbohydr Polym* 101:57-67.
- Zhu X, Wu H, Yang J, Tong J, Yi J, Hu Z, Hu J, Wang T, Fan L. 2015. Antibacterial activity of chitosan grafting nisin: Preparation and characterization. *Reactive and Functional Polymers* 91-92:71-76.
- Zimmerman JR. 2014. The Characterization of Chitin Microparticle Preparations: Degree of Acetylation and its Effect on Immunologic Response.
- Zou P, Yang X, Wang J, Li Y, Yu H, Zhang Y, Liu G. 2016. Advances in characterisation and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. *Food Chemistry* 190:1174-1181.

ABREVIATURAS

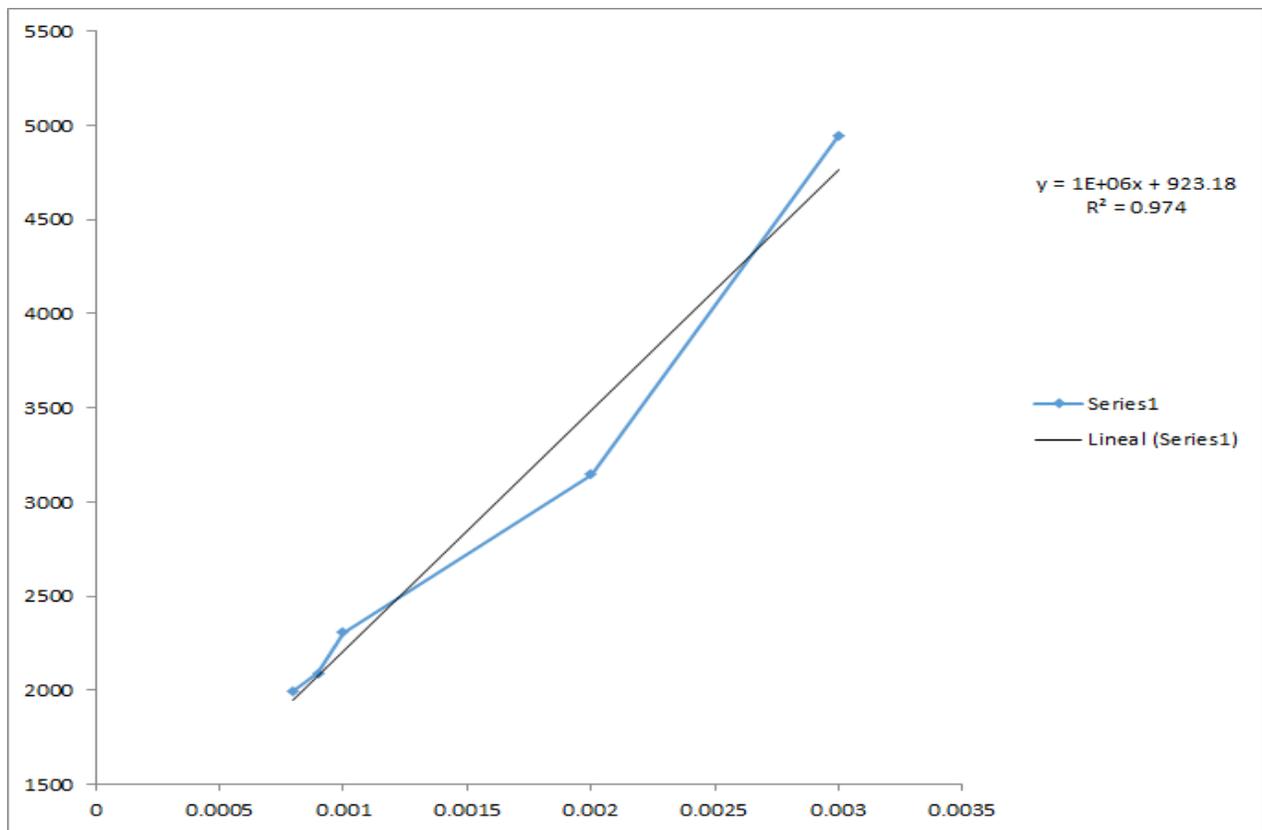
a	Constante de la configuración de la cadena polimérica
ATP	Adenosin trifosfato
ATT	Acidez total titulable
%C	Porcentaje de cenizas
Com	Comercial
C	Concentración
CSST	Concentración de sólidos solubles totales
DD	Desacetilación
DM	Desmineralización
DP	Desproteización
FAL	Fermentación ácido láctica
GD	Grado de Desacetilación
%GD	Porcentaje de Grado de desacetilación
IR	Espectroscopía infrarrojo
KDa	Kilo Dalton
KM	Contante característica del sistema polímero-solvente

M	Molaridad
\overline{M}_v	Peso molecular promedio
η_r	Viscosidad relativa
η	Viscosidad de la solución
η_o	Viscosidad del solvente puro
η_{red}	Viscosidad reducida
$[\eta]$	Viscosidad intrínseca
MSR	Metodología de superficie de respuesta
PAL	Fenilalanina amonio liasa
PM	Peso molecular
Quit	Quitano
Opt	Optimizado
QPP	Quitina parcialmente purificada
RNA	Ácido ribonucleico
UV	Luz ultravioleta
V	Volumen
W	Peso

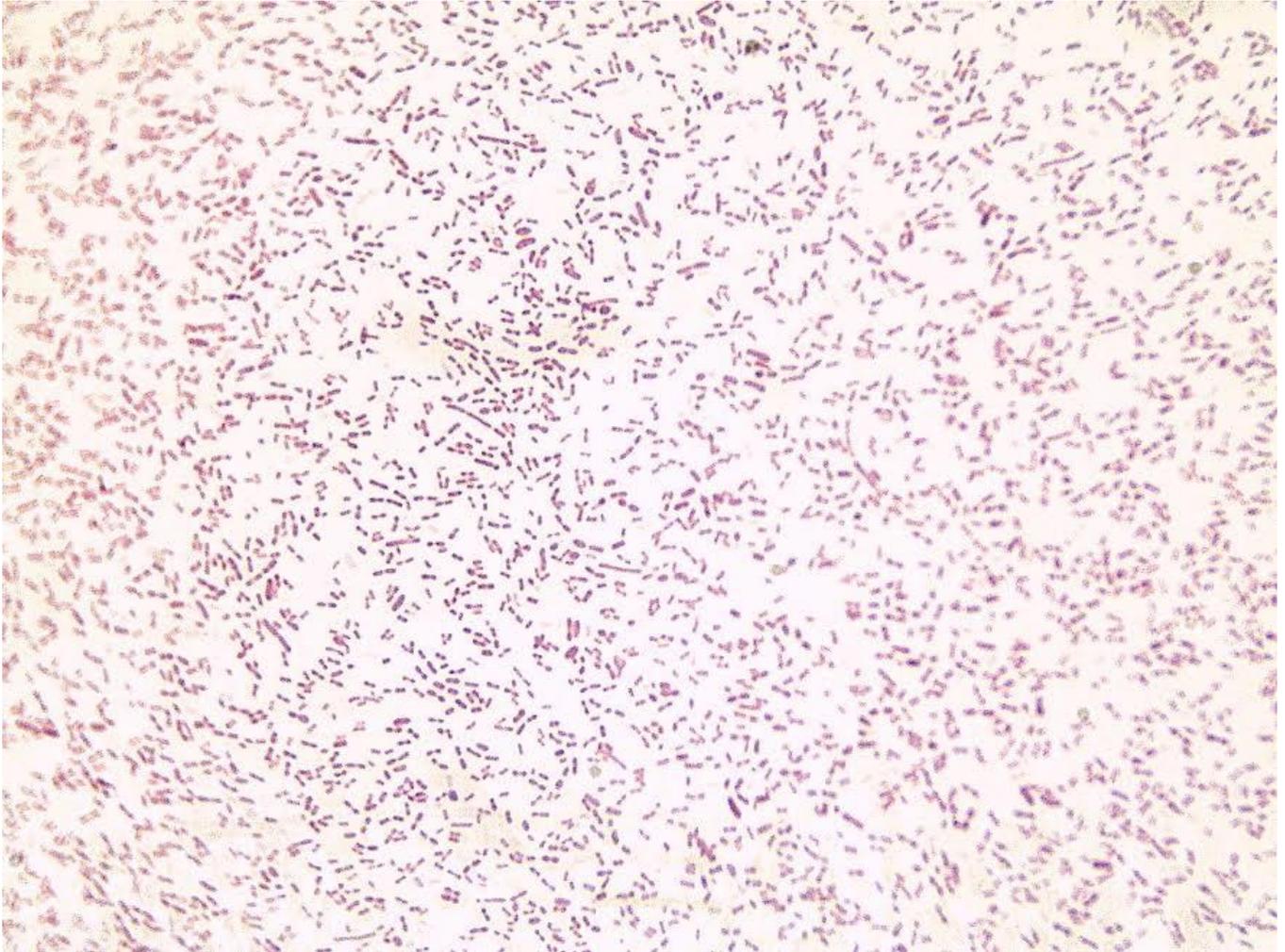
ANEXOS



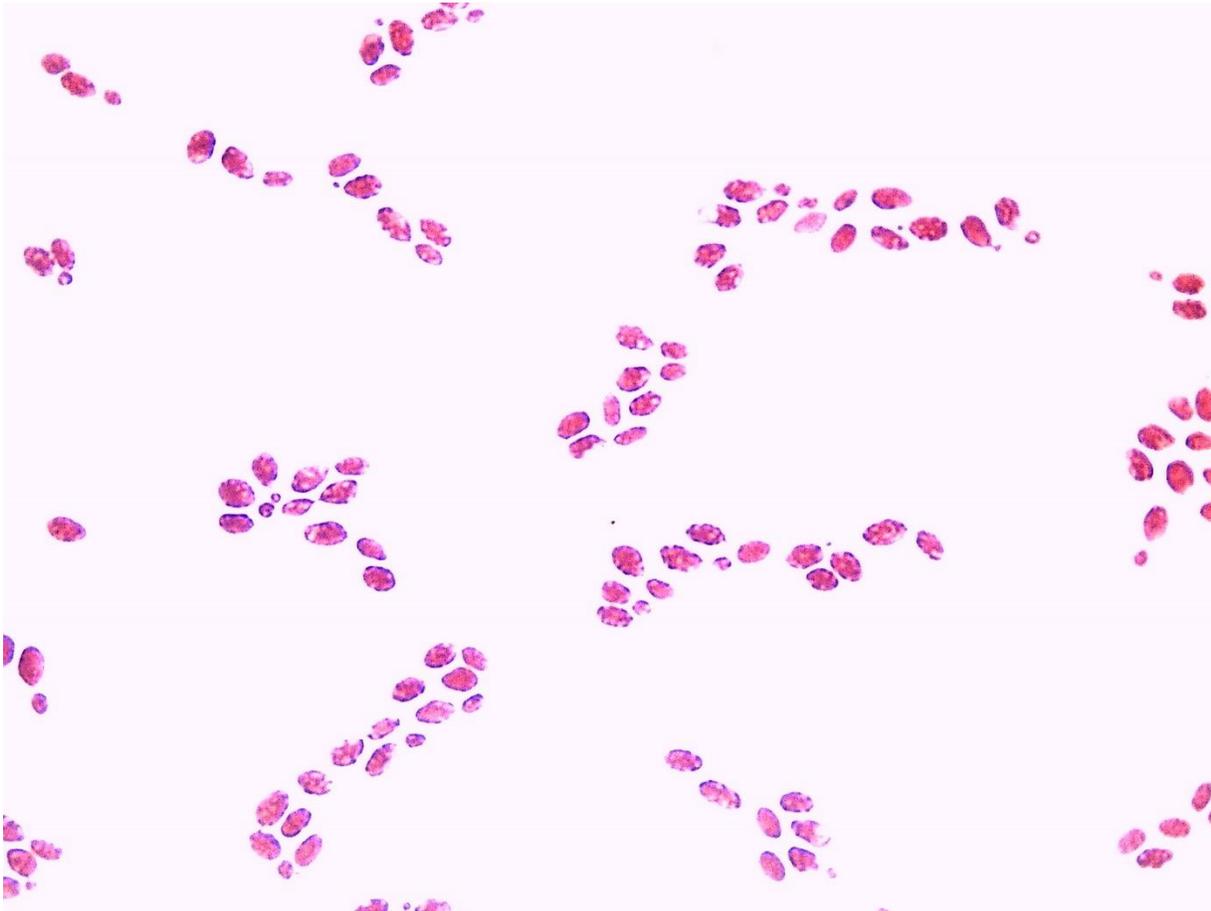
Anexo 1. Espectro de infrarrojo del Quitosano obtenido en las condiciones óptimas de fermentación láctica de cabezas de camarón.



Anexo 2. Representación de Huggins, a 25°C en NaCl/HOAc, para Quitosano óptimo.



Anexo 3. Tinción de gram realizada a las muestras de bacterias mesófilas de papaya inmersas en solución que contenía Quitosano optimizado.



Anexo 4. Tinción de gram realizada a las muestras de bacterias psicrófilas de papaya inmersas en solución que contenía Quitosano optimizado.



Anexo 5. Tinción de gram realizada a las muestras de hongos y levaduras de papaya inmersas en solución que contenía Quitosano optimizado.