



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Doctorado en Ciencias de los Alimentos

Caracterización de recubrimientos a base de almidones modificados y cera de abeja y su efecto en los atributos de calidad de frambuesas almacenadas por periodos cortos

Artículos de investigación

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta:

M.C. Alfonso Pérez Gallardo

Dirigido por:

Dr. Carlos Regalado González

SINODALES

Dr. Carlos Regalado González
Presidente

Dra. Blanca Estela García Almendárez
Secretario


Dr. Ramón Alvar Martínez Peniche
Vocal

Dr. Gustavo Barbosa Cánovas
Suplente

Dr. Arturo Bello Pérez
Suplente

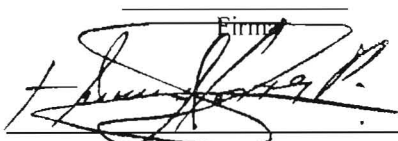
Dra. Guadalupe García Alcocer
Directora de la Facultad


Firma


Firma


Firma


Firma


Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Marzo de 2012
México.

Agradecimientos

Este trabajo de investigación además de resultados científicos incluye además, aunque no de manera explícita, diversas situaciones, vivencias y experiencias diferentes a la ciencia.

Entre ellas se mencionan todos los momentos en que mis Padres me brindaron su apoyo, pláticas y consejos, en el que mis hermanos me animaron a continuar, los momentos en que estando solo, mis amigos me escucharon y ofrecieron sus puntos de vista. La importante labor de mis asesores para no desviar el camino y ver los experimentos de manera objetiva. También el valioso apoyo de todas las personas que formaron parte indirecta en la realización de este trabajo. Éste escrito contiene además, el cariño, amor y dedicación que tengo hacia esa persona especial que me enseñó lo que es el cariño y el amor. Sin embargo, también contiene problemas, cambios y transformaciones que sufrí a lo largo de la realización del presente. Aun así, debido a que considero que somos el resultado de todas las vivencias que experimentamos a lo largo de nuestra vida, quiero decirles a todos muchas gracias a todos, no sería quien soy el día de hoy si no fuera por ustedes. Ahora solo resta continuar en el camino de la vida, vivir bien, ser feliz y mejor cada día pues todos ustedes me lo han enseñado y considero que debo honrar esas enseñanzas cada día de mi vida.

Atentamente.

Alfonso Pérez Gallardo

Índice

I.	Resumen	1
II.	Abstract	2
III.	Introducción	3
IV.	Resumen en extenso y artículo original del primer artículo publicado.	6
V.	Resumen en extenso y artículo original del segundo artículo publicado.	19
VI.	Conclusiones generales	30

1. Resumen

Los recubrimientos compuestos (EC) son una capa delgada de materiales comestibles como el almidón, polioles y lípidos, aplicados en estado líquido y secados sobre su superficie. Es posible utilizar los EC en frutas para controlar la pérdida de vapor de agua y la tasa de respiración durante el almacenamiento, para lograr un efecto positivo en la conservación de parámetros de calidad de la fruta tales como la pérdida de firmeza, color, peso y producción de compuestos relacionados con el aroma. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la estructura molecular de cuatro almidones de maíz ceroso modificados, acetilado entrecruzado (ACLS), hidrolizado-octenilsuccinilado (H-OSA), oxidado (OS), y sin modificar (WCS), así como su interacción con otras moléculas de la formulación y su impacto en las propiedades reológicas de suspensiones usadas para EC. Un objetivo adicional consistió en evaluar las propiedades microestructurales, de apariencia y de barrera de los EC. El WCS y el ACLS se utilizaron para obtener EC aplicados en frambuesas frescas y se evaluó su efecto sobre los atributos de calidad en un periodo corto de almacenamiento refrigerado (8 días a 4°C). Los análisis de la estructura molecular de los almidones, su caracterización reológica y las micrografías de los EC producidos mostraron predominantemente amilopectina de bajo peso molecular. Esto indica que las propiedades de un EC dependen de la capacidad reorganización de las moléculas de amilopectina. Además, las interacciones entre los grupos funcionales introducidos en los almidones modificados o entre grupos funcionales y los aditivos añadidos a los EC pueden obstaculizar o promover la reorganización del almidón, produciendo diferentes niveles de permeabilidad al vapor de agua, solubilidad y transparencia. Los EC producidos con ACLS y WCS afectaron significativamente ($p > 0.05$) la tasa de respiración y producción de etileno de las frambuesas, interviniendo en el control de la maduración. Además, ambos recubrimientos preservaron el color sin afectar la concentración de antocianinas. Sin embargo, ambos recubrimientos promovieron condiciones de hipoxia evidenciada por la producción de metabolitos de fermentación, aumentaron la tasa de pérdida de peso y disminuyeron de la firmeza de los frutos. Este trabajo contribuye a la comprensión del efecto de la estructura molecular del almidón sobre las propiedades de los EC y caracteriza el efecto de los EC a base de almidón en los atributos de calidad de frambuesas durante su almacenamiento.

2. Abstract

Composite edible coatings (EC) for food are a thin layer of edible materials such as starch, polyols and lipids, applied in liquid state and dried over its surface. It is possible to use EC in fruit during storage to control the loss of water vapor and respiration rate, to achieve a positive effect in the preservation of quality parameters like loss of firmness, color, weight loss and production of aroma compounds. This work was aimed to study the molecular structure of four modified corn starches; acetylated-cross linked (ACLS), hydrolyzed octenylsuccinylated (H-OSA), oxidized (OS) and unmodified; as well as their interaction with another molecules in the formulation and its impact on the rheological properties of suspensions used for EC. An additional objective was to evaluate the microstructural, appearance and barrier properties of EC. WCS and ACLS were used to obtain EC applied in fresh raspberries and their effect on quality attributes during short period of refrigerated storage (8 days at 4 °C) was evaluated. The analysis of the molecular structure of starch, rheological characterization and micrographs of the produced EC, showed predominantly amylopectin of low molecular weight. This indicates that EC properties depend of the reorganization capability of amylopectin molecules. Besides, interactions among functional groups introduced in modified starches or between functional groups and the additives added to the EC may hinder or promote starch reorganization; producing different levels of permeability to water vapor, solubility and transparency. The EC produced with ACLS and WCS affected significantly ($p>0.05$) the respiration rate and ethylene production of raspberries, intervening on the control of ripening. Furthermore, coatings preserved the color without affecting anthocyanins content. However, both coating promoted the generation of hypoxic conditions evidenced by the production of fermentation metabolites the increase of the weight loss rate and the decrease of firmness. This work contributes to the comprehension of the effect of the molecular structure of starch on the properties of the EC and characterizes the effect of the starch based EC on the quality attributes of raspberries during their storage.

3. Introducción

Los recubrimientos comestibles (EC) son una capa de materiales comestibles aplicados estado líquido y secados sobre la superficie de un alimento con la finalidad de preservar ciertos de sus parámetros de calidad (Bravin *et al.*, 2004; Lin & Zhao, 2007). En algunos casos son capaces de actuar como una barrera selectiva ante el intercambio de gases como H₂O, O₂ y CO₂. Por lo que pueden controlar la desecación y posiblemente las velocidades de maduración y senescencia (Olivas & Barbosa-Cánovas, 2009).

La obtención de EC con las propiedades de barrera, apariencia, estabilidad y propiedades funcionales deseadas comienza con la mezcla de distintos materiales en lo que se denomina solución de recubrimiento. Típicamente los EC se producen a partir de polímeros comestibles como proteínas o carbohidratos que son plastificados con agua y polioles. A estas formulaciones es común añadirse sustancias lipídicas para conferirles características hidrofóbicas que permitan restringir la pérdida de humedad. También pueden ser incluidos otros aditivos como colorantes, antioxidantes, antimicrobianos o tensoactivos que aporten características de interés al recubrimiento (Vargas-Torres *et al.*, 2008).

Se ha escogido al almidón ceroso de maíz (WCS) como material filmogénico debido a que es barato y abundante, no retrograda como la amilosa, es fácilmente hidratable y altamente soluble, produce películas transparentes y puede ser químicamente modificado para mejorar su estabilidad tanto en solución como en recubrimientos (Rindlav-Westling *et al.*, 1998; Mehyar & Han, 2004; Ratnayake & Jackson, 2007). Entre las modificaciones químicas se seleccionaron la oxidación, acetilación-entrecruzamiento e hidrólisis-octenil succinilación (Mason, 2009).

En el estudio de los recubrimientos comestibles es de gran importancia conocer su comportamiento reológico ya que tiene estrecha relación con el método de aplicación y la

aparición final del recubrimiento. Dos técnicas que permiten obtener esta información son los perfiles de viscosidad y los esfuerzos de fluencia estático y dinámico (Genovese & Rao, 2003; Peressini *et al.*, 2003; Achayuthakan *et al.*, 2006). Una vez obtenido el recubrimiento seco se puede proceder a estudiar sus propiedades de barrera (permeabilidad CO₂, O₂, H₂O), de apariencia (opacidad) o funcionales (solubilidad).

El estudio de un EC directamente sobre la superficie de un alimento es complicado debido a la irregularidad de su superficie. Por ello, es común que se empleen películas producidas con la misma formulación pero obtenidas sobre superficies regulares. Posteriormente se pueden elegir las formulaciones que cumplan con las características deseadas, aplicarlas sobre el alimento de interés y evaluar su efecto sobre los parámetros de calidad deseados.

Debido a que los EC pueden actuar como barreras selectivas a CO₂ y O₂, pueden modificar la composición de la atmósfera interna de tejidos vegetales (Park, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007). Por lo anterior, es de gran importancia la evaluación de su efecto directamente sobre el producto de interés.

Las frambuesas son frutos delicados, de elevada tasa de respiración y corta vida útil poscosecha. En ellas, la visualización de cambios de color, aroma y firmeza son rápidos y relacionables con trastornos debidos a condiciones de almacenamiento (temperatura, humedad), tratamientos adicionales y ataques microbianos (Haffner *et al.*, 2002; Van der Steen *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004; Ali *et al.*, 2011). Por lo anterior y por el interés en evaluar tratamientos poscosecha que permitan el aumento de su vida de anaquel es que se usaron como modelos para estudiar el efecto de los recubrimientos de almidones modificados.

De acuerdo a lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron: primero, estudiar las características de los recubrimientos producidos con almidones modificados adicionados y cera de abeja y; segundo, aplicar dichos recubrimientos sobre frambuesas frescas y evaluar su efecto sobre sus atributos de calidad durante periodos cortos de almacenamiento en refrigeración.

4. Resumen en extensor del primer artículo publicado

Efecto de las características estructurales de almidones modificados de maíz sobre las propiedades reológicas, soluciones filmogénicas y permeabilidad al vapor de agua, solubilidad y opacidad de las películas.

Pérez Gallardo Alfonso¹, Bello Pérez Luis Arturo², García-Almendárez Blanca¹, Montejano Gaitán Gerardo³, Barbosa-Cánovas, Gustavo⁴, Regalado Carlos^{1*}

Los recubrimientos comestibles (EC) pueden ser definidos como una delgada capa de materiales comestibles aplicada como dispersión líquida y secada sobre la superficie de un alimento como una fruta fresca, con el propósito de incrementar su vida de (Bravin *et al.*, 2004; Lin & Zhao, 2007). Una de las tendencias en las tecnologías de EC es el diseño de recubrimientos a la medida con un desempeño funcional elevado basado en la selección más apropiada de polímeros filmogénicos (almidón, proteína, entre otros), aditivos (plastificantes, lípidos, surfactantes), la inclusión de sustancias activas (antimicrobianos) y el ensamble de acuerdo al arreglo de componentes más efectivo como una solución formadora de película (FFS) (Vargas-Torres *et al.*, 2008). Aunque las propiedades de los EC deberían de ser estudiadas directamente en la superficie de un alimento, debido a las irregularidades de su superficie, éste proceso es en ocasiones difícil. De aquí que el estudio de las propiedades de un recubrimiento se efectúe empleando películas producidas en superficies suaves y regulares.

Los recubrimientos comestibles son relevantes para la preservación de la calidad y el incremento de la vida de anaquel de frutas y vegetales debido a que pueden ser empleadas como matrices de transporte y entrega de sustancias activas como antimicrobianos además de que pueden retardar la pérdida de vapor de agua (Olivas & Barbosa-Cánovas, 2009).

El almidón de maíz ceroso (WCS) se ha sugerido como material filmogénica debido a que relativo a que es relativamente barato y abundante, es compatible con superficies de baja energía y retrograda en menor cantidad comparado con la amilosa. En adición, el WCS es fácilmente hidratable y altamente soluble, lo que puede ser útil para producir recubrimientos comestibles indetectables durante su consumo además de que puede ser modificado químicamente para mejorar su utilidad (Rindlav-Westling *et al.*, 1998; Mehyar & Han, 2004; Ratnayake & Jackson, 2007).

Dentro del vasto número de modificaciones químicas, la oxidación, acetilación-entrecruzamiento y la hidrólisis-ocetnilsuccinilación fueron consideradas importantes para este trabajo porque pueden proveer de características de interés a ambos, las FFS y los EC. Los grupos carbonilo y carboxilo generados durante la oxidación pueden incrementar las enlaces por puente de hidrógeno entre moléculas adyacentes resultando en un proceso de asociación más eficiente. El entrecruzamiento ayuda a prevenir la desintegración del gránulo durante la gelatinización, resultando en una reducida dispersabilidad reducida de las FFS. La esterificación es usada para incrementar la hidrofobicidad y capacidad de ligación a lípidos de los almidones sin afectar de manera sustancial su dispersabilidad en agua (Mason, 2009).

Debido a que los EC son usualmente aplicados como dispersiones líquidas, el conocimiento del comportamiento reológico de las FFS se necesita diseñar las operaciones

de proceso y predecir su desempeño después de la aplicación. Después del proceso de aplicación, la viscosidad y el esfuerzo de fluencia tienen el rol primario de controlar el comportamiento del recubrimiento (Peressini *et al.*, 2003), en particular, de prevenir un escurrimiento excesivo. Los almidones cerosos tienen la ventaja de producir dispersiones viscosas pero no geles después del proceso de gelatinización, debido a que por ser más cortas, las cadenas de la amilopectina tienen poca tendencia a interactuar (Mali *et al.*, 2004b). Esta característica es particularmente útil ya que ayuda al control de la reestructuración después de un cizallamiento.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue estudiar la estructura del almidón ceroso de maíz y como los grupos funcionales introducidos por modificación química afectan la asociación entre cadenas de amilopectina en las FFS y en las películas producidas. Este trabajo está además enfocado a comprender las interacciones del almidón ceroso de maíz con aditivos como el sorbitol o sustancias hidrofóbicas y su efecto en las propiedades de solubilidad, opacidad y permeabilidad al vapor de agua de las películas producidas.

Se emplearon cuatro almidones modificados para realizar este estudio. El almidón de maíz ceroso (WCS) y el almidón acetilado-entrecruzado (ACLS) fueron obtenidos de Corn Products (CPI, San Juan del Río, Qro, México). WCS se empleó para producir dos almidones modificados, el almidón oxidado (OS) y el almidón hidrolizado octenilsuccinilado (H-OSA). OS and H-OSA se prepararon siguiendo procedimiento previamente reportados (Kuakpetoon & Wang, 2001; Murúa-Pagola *et al.*, 2009). Para mejorar las propiedades hidrofóbicas de las películas se utilizaron dos lípidos, cera de abeja (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) y aceite de cártamo (Coral International, SLP, México).

El grupo carbonilo y carboxilo de los almidones fueron cuantificados de acuerdo a la metodología expuesta por Kuakpetoon and Wang (2001). La esterificación del almidón H-OSA siguiendo un procedimiento previamente reportado (Jeon *et al.*, 1999). El grado de entrecruzamiento se determinó comparando los valores de los picos máximos de viscosidad de los almidones WCS y ACLS, de acuerdo con Jyothi *et al.* (2006). El pico de viscosidad de la muestra se obtuvo usando un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Ostfildern, Alemania) acoplado con una celda y geometría especial para almidones ST24-2D/2V/2V30. La dispersión de almidón se cocinó de la misma manera que en las pruebas de pasteo.

La distribución del tamaño de cadena del almidón digerido enzimáticamente se caracterizó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto desempeño utilizando un detector amperométrico (HPAEC-PAD) de acuerdo a un método previamente descrito (Kasemsuwan *et al.*, 1995) y modificado por Chávez-Murillo *et al.* (2008). El sistema HPAEC-PAD (DX500, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) consistió en una bomba de gradiente GP50, un organizador LC20-1, un detector electroquímico ED40, una pre-columna CarboPac PA1, una columna analítica CarboPac PA1 y un automuestreador AS40. Para el análisis se añadieron 3.2 ml de agua desionizada en 10 mg de almidón y la mezcla se calentó en baño de agua por una hora para gelatinizar la muestra completamente. Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente y se añadieron 0.4 ml de buffer de acetatos 0.1M a pH de 3.5 y 5 μl de solución de isoamilasa a una concentración de 200 $\text{U}\mu\text{l}^{-1}$ (EC 3.2.1.68, 59000 U/mg, Hayashibara Biochemical Laboratories, Okayama, Japón). La mezcla fue incubada a 40 °C por 4 h. La reacción enzimática se detuvo con 0.21 ml de NaOH 0.2N seguido por un calentamiento en baño de agua hirviendo por 15 min. La

muestra se enfrió y filtró a través de una membrana (Millipore, Irlanda) y se colocaron 0.6 ml del filtrado en un vial para auto-inyección.

Se solubilizaron 20 mg de almidón desgrasado en 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) por agitación durante una hora en baño de agua hirviendo. La muestra fue agitada durante toda la noche y filtrada a través de una membrana de 5 μm de diámetro de poro. Las fracciones se resolvieron mediante cromatografía de exclusión de tamaño acoplada a un detector de índice de refracción (HPSEC-IR). El sistema consistió en una bomba 515 HPLC (Waters, Milford, MA, EUA), el volumen de inyección fue de 100 μL y un detector de índice de refracción de 2410 (Waters) mantenido a 40 $^{\circ}\text{C}$. Se emplearon columnas empacadas OHPaK KB-802 y KB-804 (Shodex, NY, EUA) mantenidas a 55 $^{\circ}\text{C}$. La fase móvil fue una solución acuosa de 0.1 M NaNO_3 y 0.02% de NaN_3 . El flujo fue de 0.7 mL min^{-1} .

Las curvas de cocimiento del almidón fueron obtenidas usando un reómetro Physica MCR 301 (Anton Paar, Ostfildern, Alemania) equipado con una celda y una geometría ST24-2D/2V/2V30 diseñadas para almidones. La suspensión de almidón fue primero agitada a 960 rpm por 60 s y después a 160 rpm por el resto de la prueba. La rampa de calentamiento se eligió con base en el método AACC 61-02 (1995) con algunas modificaciones. Las muestras fueron mantenidas a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 120 s, calentadas a 90 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 0.2 $^{\circ}\text{C s}^{-1}$, mantenidas a 90 $^{\circ}\text{C}$ por 600 s y después enfriadas a 50 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de 0.2 $^{\circ}\text{C s}^{-1}$. Las curvas de pasteo fueron obtenidas al menos en duplicado para concentraciones de 3, 4 y 5% (p/p).

Las soluciones filmogénicas (FFS) se prepararon calentando una dispersión de almidón (3%, w/w), a 90 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min. Después de enfriarlas, el sorbitol (Sigma), Tween

80 (Sigma) y los lípidos fueron añadidos a la concentración de 2.4, 0.02 y 0.2% (p/p) respectivamente. Debido a que las dispersiones al 4% de almidones ACLS, WCS y OS producen una dispersión difícil de manejar y vaciar con tendencia a atrapar burbujas de aire, se escogió la concentración de 3% para producir las películas. La cera de abeja como agente hidrofóbico se añadió como una microsuspensión. Esta se preparó por adición de cera fundida en agua caliente seguida por emulsificación a 21500 rpm (Ultraturrax, Staufen, Alemania) en presencia de ácido esteárico (Sigma) y morfolina (Sigma) de acuerdo con lo expuesto por Hagenmaier y Baker (1994). Se empleo aceite de cártamo o suspensión de cera de abeja en las SF incorporados mediante agitación a 21500 o 6000 rpm respectivamente. Posteriormente se vaciaron 10 ml de las SF en placas de vidrio de 10 X 10 cm y se dejaron secar al aire (~45% HR and 25 °C) por 24 h antes de despegar las películas.

Las muestras fueron sometidas a un cizallamiento programado que fue incrementando logarítmicamente de 0-500 s⁻¹. Esta prueba se hizo empleando al misma geometría que en el caso de las pruebas de pasteo para evitar problemas de sedimentación de los gránulos de almidón en las SF de almidón ACLS o floculación de las partículas dispersas. Previo al análisis, las muestras se dejaron reposar por 5 min para permitir la relajación de estreses inducidos durante su carga.

Los esfuerzos de fluencia estático y dinámico (σ_s and σ_d , respectivamente) se midieron a una velocidad de cizalla aparente de 0.05s⁻¹ empleando un reómetro Physica MCR 300. Se empleo una geometría tipo propela estrella de 6 paletas para determinar σ_s después de 1 h de reposo de la muestra mientras que σ_d fue obtenida después de un cizallamiento de la muestra empleando una rampa lineal de 0 a 100 s⁻¹.

La permeabilidad al vapor de agua se determinó acorde al método ASTM E96 (1995). El espesor se determinó empleando un micrómetro digital (IP65, Mitutoyo, Tokio, Japón), los valores fueron reportados como la media \pm DE de al menos seis mediciones aleatorias. Se analizaron al menos cuatro muestras de cada película.

La opacidad de las películas se determinó recortando cada película en un rectángulo y colocada en la parte interna de una celda de espectrofotómetro. El espectro de absorbancia fue registrado de 400 a 700 nm y la opacidad fue obtenida calculando el área bajo la curva formada por la absorbancia contra la longitud de onda (nm). Los resultados se expresaron como $A \times nm$. Al menos tres muestras de cada formulación fueron analizadas

La solubilidad de las películas se obtuvo de acuerdo a lo expuesto por Zamudio-Flores *et al.* (2008) con modificaciones. Brevemente, piezas de 2x3 cm de cada película fueron cortadas y colocadas en un desecador hasta peso constante. Enseguida se colocaron en viales con 80 ml de agua desionizada durante una hora con agitación ocasional de manera suave, para evitar dispersar la película. Posteriormente se recuperó la película por decantación y los viales se colocaron en un horno a 90 °C hasta peso constante. La materia soluble se expresó como porcentaje. Se analizaron tres muestras de cada formulación y los resultados se expresaron como la media \pm DE.

La microestructura de las películas fue observada empleando un microscopio electrónico de barrido Quanta 200F (FEI, Hillsboro, Oregon, USA) empleando el modo ambiental con la muestra en su estado nativo.

El grado de sustitución de los almidones se muestra en el cuadro 1. El contenido de carbonilos y carboxilos fue similar a aquellos determinados en almidón ceroso de maíz empleando el 3% (v/v) de NaOCl (Wang & Wang, 2003). Se observó un alto grado de

sustitución en el almidón H-OSA al compararlo con otros almidones OSA no hidrolizados de plátano y maíz (Bhosale & Singhal, 2006; Carlos-Amaya *et al.*, 2011). Las diferencias en el contenido de amilopectina así como el proceso de hidrolisis pueden ser los responsables de de esos valores.

De acuerdo con los análisis de HPSEC-IR se encontraron tres fracciones, designadas como FI, FII and FIII (Cuadro 2). La fracción FIII, que contuvo las moléculas de amilopectina de menor peso molecular, predominó en todos los almidones. Las moléculas de amilopectina del WCS mostraron una distribución de dos grupos de acuerdo con su tamaño molecular, mientras que los almidones OS, H-OSA and ACLS mostraron una fracción menor, designada como FI, que se asoció con moléculas de alto peso.

El almidón H-OSA mostró la menor fracción FI, mientras que el ACLS mostró la mayor. La aparición de FI en ACLS y OS se atribuyó a la formación de enlaces de entrecruzamiento entre las moléculas de amilopectina (Wang & Wang, 2003), mientras que en H-OSA fue probable debido a la formación de cúmulos estabilizados por asociaciones hidrofóbicas (Shogren *et al.*, 2000). Los almidones doblemente modificados mostraron un incremento en la fracción FII y una disminución simultánea de la fracción FIII. Hipotetizamos que la primera reacción de modificación se llevó a cabo en la zona amorfa del gránulo, afectando principalmente la amilopectina de alto peso molecular, mientras que la segunda modificación afectó las moléculas de bajo peso molecular que forman la zona semi-cristalina.

Los almidones desramificados con isoamilasa mostraron una disminución del tamaño promedio de la cadena. Este efecto fue más pronunciado en los almidones ACLS y H-OSA (Cuadro 2). La disminución en el contenido de cadenas B2 y B3+ después de la

modificación química se asoció con su localización en la zona amorfa del gránulo de almidón (Wang *et al.*, 2003; Kuakpetoon & Wang, 2008).

El alto contenido de moléculas de amilopectina de bajo peso molecular se ha relacionado con una mejor habilidad para reordenarse y formar una matriz compacta y fuerte (Mali *et al.*, 2004b). Entonces, para hacer una selección apropiada para diseño de películas, la estructura del almidón y la distribución de tamaño de cadena son factores clave para describir el comportamiento de las dispersiones gelatinizadas de almidón

El comportamiento pasteo evidenció la modificación (Fig. 1). El almidón WCS mostró un alto pico viscosidad (PV) y un colapso pronunciado, indicando la ruptura de los gránulos de almidón durante la gelatinización. El OS mostró un PV menor pero una menor reorganización después del enfriamiento que el WCS. La disminución de PV puede ser asociado con la desorganización producida durante la oxidación mientras que la mayor capacidad de reorganización molecular evidenciada durante el la reorganización de las moléculas (*setback*) es atribuida a los grupos carboxilo y carbonilo que son capaces de formar enlaces por puente de hidrógeno adicionales (Kuakpetoon & Wang, 2006; Chávez-Murillo *et al.*, 2008). Por otro lado, el comportamiento de pasteo de ACLS mostró restricción de hinchamiento (Fig. 1c). Este efecto se debe al entrecruzamiento (Rodríguez-Marín *et al.*, 2010; Carlos-Amaya *et al.*, 2011).

El almidón doble modificado H-OSA mostró una viscosidad reducida y la menor viscosidad de pico PV de todos los almidones evaluados (Fig. 4), y puede ser atribuida a la desramificación y erosión de los gránulos causados por la hidrólisis ácida durante su preparación (Wang *et al.*, 2003).

La tendencia a la reorganización de los almidones evaluados fue asociada con el control de la viscosidad; ésta propiedad puede ser útil para predecir la reestructuración de las FFS después del proceso de aplicación como recubrimientos.

El esfuerzo de fluencia dinámico indicó una mejor capacidad de reorganización del almidón OS comparado con el WCS (Fig. 3). Este comportamiento puede ser explicado por un refuerzo de las interacciones que ocurren entre las cadenas A y B1 de la amilopectina debido a los grupos carbonilo y carboxilo (Achayuthakan *et al.*, 2006). En el caso del almidón ACLS, la estructura de la FFS es marcadamente interrumpida al inicio de la prueba. Éste comportamiento es probablemente un resultado de las débiles interacciones entre partículas comparada con las que se dan en FFS formadas en dispersiones de gránulos de amilopectina completamente gelatinizados. Debido a su menor viscosidad, H-OSA no mostró un esfuerzo de fluencia medible.

Las dispersiones de almidones mostraron un incremento de la viscosidad aparente en presencia de los aditivos sorbitol o cera de abeja. Las SF de recubrimientos hechas con ACLS, WCS y OS mostraron un típico comportamiento no-Newtoniano de adelgazamiento a la cizalla (reo-adelgazante) mientras que el almidón H-OSA mostró un comportamiento de estructuración inducido por cizalla (Fig. 2d). El comportamiento reológico del almidón H-OSA fue atribuido a la introducción de un grupo hidrofóbico de cadena larga (octenil succinato) el cual causa repulsión con grupos polares de moléculas adyacentes. De aquí que bajo un incremento en la velocidad de cizalla las dichas fuerzas repulsivas son superadas resultando en una estructura más desordenada que se opone al flujo (Mleko & Foegeding, 1999; Kim *et al.*, 2002; Lazaridou *et al.*, 2003).

Se observó que de 4-5% (w/w) de concentración de almidón las FFS resultantes fueron difíciles de manejar con una tendencia a atrapar burbujas de aire, lo que comprometía la

continuidad del recubrimiento; mientras que al 3% (w/w) las dispersiones de ACLS y H-OSA mostraron una alta variabilidad en sus propiedades reológicas. Adicionalmente, ACLS mostró una tendencia a sedimentar con el tiempo. De aquí que la concentración al 4% (w/w) fuera necesaria para obtener curvas de flujo reproducibles con la geometría empleada. Sin embargo, se produjeron películas empleando la concentración del 3% (w/w) con fines comparativos.

El reemplazo del agua por sorbitol resultó en una viscosidad mayor debido a un incremento en la concentración de sólidos. Se especula que la alta viscosidad de las suspensiones de almidón añadidas con cera de abeja, puede deberse a las interacciones con partículas de lípidos que desaparecen cuando la velocidad de cizalla se incrementa (Fig. 2). Los valores de viscosidad encontrados para WCS, ACLS y OS estuvieron dentro del rango obtenido para el almidón acetilado obtenido por López *et al.* (2008).

Los almidones seleccionados conteniendo o no aditivos fueron capaces de formar películas continuas y transparentes. Comparando las películas sin aditivos hidrofóbicos solamente, ACLS produjo películas más permeables y solubles que los otros almidones (Cuadro 3). Esto puede ser explicado por la estructura producida es más abierta (Fig. 5f). La reducción de la WVP lograda con H-OSA tiene relación con la hidrofobicidad del grupo octenyl-succinato introducido.

La cera de abejas redujo efectivamente la WVP de las películas. En el caso de las películas producidas con ACLS, éste efecto se asoció con una separación de fases en las partículas de cera que redujo el área para la transferencia al vapor de agua (Fig. 5f). Debido a la baja viscosidad, se propuso el mismo efecto para las FFS producidas con H-OSA (Bravin *et al.*, 2004). Las películas hechas con WCS y OS mostraron una separación de fases además de un entrapamiento de partículas de cera (Fig. 5b and c).

Las películas producidas con FFS adicionadas de aceite de cártamo mostraron una mayor WVP comparadas con las contrapartes adicionadas con cera. Las diferencias encontradas en las películas elaboradas con H-OSA se atribuyeron a sus propiedades emulsificantes que favorecen la formación de complejos entre el octenil-succinato y los lípidos, obstaculizando el proceso de re asociación de las moléculas de amilopectina.

El espesor de los recubrimientos producidos osciló entre 29.3 y 40.1 μm . De acuerdo con Longares *et al.* (2004), este espesor permitiría al recubrimiento pasar inadvertido por el consumidor. Como se esperaba, ni el tipo de almidón o tipo de agente hidrofóbico afectó dicho parámetro ya que depende únicamente del la cantidad de sólidos depositados por unidad de área (Villalobos-Carvajal *et al.*, 2009).

Las películas producidas con almidón OS sin aditivos hidrofóbicos fueron las menos solubles mientras que los producidos con H-OSA y ACLS mostraron el efecto contrario. La esterificación del almidón H-OSA pudo haber evitado la asociación de cadenas de amilopectina facilitando el proceso de hidratación de la película (Mehyar & Han, 2004; Bertuzzi *et al.*, 2007); mientras que la estructura abierta de las películas de ACLS pudo haber permitido la pérdida de materiales solubles de ésta. Éste efecto se incrementó mediante la introducción de partículas de cera porque producen un entorpecimiento adicional causado por la formación de complejos de lípido. Las micrografías de las películas de OS muestran que su reducida solubilidad puede deberse a la separación de partículas de cera. Algunas protegen la cara superior de la película de la hidratación mientras que otras permanecen embebidas dentro de la matriz de la película (Fig 5b and c). El mismo efecto es propuesto para las películas de WCS porque ambos almidones no interactúan con los lípidos debido a la falta de grupos funcionales hidrofóbicos.

Las películas que contuvieron aceite tuvieron una apariencia opaca y aceitosa, mientras que los adicionados con cera lograron una distribución homogénea, mostrando una transparencia similar a la de los preparados sin cera. Valores bajos de opacidad indican una película traslúcida y ésta propiedad puede afectar adversamente la selección de un producto recubierto por parte del consumidor (Mali *et al.*, 2004a; López *et al.*, 2008). Los valores de opacidad obtenidos en éste trabajo (21.6-38.8 UA·nm) fueron menores que los encontrados para películas elaboradas con almidón de tapioca y goma de hoja hsian-tsao (46-93 AU·nm) (Chen *et al.*, 2009), almidón acetilado (45.42-115.12 AU·nm) (López *et al.*, 2008) y almidón de yam (85-111 AU·nm) (Mali *et al.*, 2004a).

Las propiedades de las FFS y las películas producidas con almidones cerosos de maíz se correlacionan con la capacidad que exhiben las moléculas de amilopectina para reasociarse. El proceso de asociación de las moléculas de amilopectina depende principalmente del tamaño molecular y de la distribución de cadena, no obstante, la introducción de grupos funcionales o la inclusión de aditivos pueden promover o entorpecer dichas interacciones. Estos efectos pueden resultar en películas que muestran diferentes grados de organización permitiendo la producción de recubrimientos a la medida. Las películas formuladas con los almidones OS y ACLS exhibieron propiedades de WVP, espesor y solubilidad que indican que pueden ser utilizados como modelo de estudio para producir matrices para el soporte y entrega de compuestos antimicrobianos en la superficie de frutas frescas para incrementar su vida de anaquel.

RESEARCH ARTICLE

Effect of structural characteristics of modified waxy corn starches on rheological properties, film-forming solutions, and on water vapor permeability, solubility, and opacity of films

Alfonso Pérez-Gallardo¹, Luis A. Bello-Pérez², Blanca García-Almendárez¹, Gerardo Montejano-Gaitán³, Gustavo Barbosa-Cánovas⁴ and Carlos Regalado¹

¹ DIPA, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U., Querétaro, Mexico

² Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional Yauatepec, Morelos, Mexico

³ Departamento de Industrias Alimentarias, Instituto Tecnológico de Monterrey, Querétaro, Mexico

⁴ Department of Biological Systems Engineering, Washington State University, Pullman, Washington, USA

Waxy corn starch (amylopectin) and three of its chemical derivatives: acetylated cross-linked (ACLS), oxidized (OS), and octenyl-succinylated (OSA), were used together with additives such as Tween 80, sorbitol, and beeswax suspension or safflower oil to test their effect on film-forming solutions (FFS) and films. The objectives of this study were the starch structure characterization, and its correlation with rheological properties of FFS and solubility, opacity, and water vapor permeability (WVP) of the produced films. Analysis of starch structure, rheological characterization, and films micrographs revealed that the starches contained predominantly low MW amylopectin molecules and film properties depended on their ability to reorganize. Additionally, the interaction among groups introduced in modified starches or with additive molecules can hinder or promote starch reorganization, resulting in films with increased or reduced WVP, solubility and transparency properties. Films were obtained by casting and showed a thickness less than 41 μm . Films prepared with OS and beeswax exhibited the best reorganizing capacity of FFS, resulting in less soluble ($30.0 \pm 1.6\%$), highly transparent ($23.2 \pm 3.3 \text{ UA} \times \text{nm}$) and less permeable films ($0.485 \pm 0.016 \text{ g} \cdot \text{mm} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$). On the other hand, ACLS showed an opposite trend which was attributed to a more open film structure. These results contribute to understand the molecular interactions of waxy starch molecules in FFS which may be useful to design tailored coatings.

Received: March 17, 2011

Revised: July 3, 2011

Accepted: July 4, 2011

Keywords:

Beeswax / Edible films and coatings / Modified corn starch / Viscosity / Yield stress

Correspondence: Dr. Carlos Regalado, DIPA, PROPAC, Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, C.U., Cerro de las Campanas s/n, Col. Las Campanas, Querétaro, 76010 Qro., Mexico.
E-mail: regcarlos@gmail.com
Fax: +52-442-1921307

Abbreviations: ACLS, acetylated cross-linked starch; EC, edible coatings; FFS, film-forming solution; H-OSA, hydrolyzed-octenylsuccinylated starch; OS, oxidized starch; PV, peak viscosity; WCS, waxy corn starch; WVP, water vapor permeability

1 Introduction

Edible coatings (EC) can be defined as a thin layer of edible materials applied as a liquid dispersion and dried over the surface of a food product like fresh fruit, with the purpose of increasing their shelf-life [1, 2]. One trend in EC

Colour online: See the article online to view Figure 3 in colour.

technologies is a tailor-made design with highly functional performance, based on the selection of the most appropriate film-forming polymer (starch, protein among others) and additives (plasticizers, lipids, surfactants), the inclusion of active substances (antimicrobials) and assembling of the most effective arrangement as a composite film-forming solution (FFS) [3]. Although EC properties should be studied directly on the product surface, due to the irregular surface of some, this process is often difficult. Thus, study of coatings properties is usually done with films produced onto smooth and regular surfaces.

Edible coatings are relevant to preserve quality and increase shelf life of fresh fruits and vegetables since it can be used as a matrix for transport and delivery of active substances such as antimicrobials, but also because they can be used to retard water vapor loss [4].

Waxy corn starch (WCS) has been suggested as film-forming material because is inexpensive and abundant, it is compatible with low energy surfaces, and a lower extent of retrogradation is observed when compared to amylase. In addition, WCS is easily hydrated and highly soluble, which might be useful to produce undetectable EC during consumption and can be chemically modified to improve its usefulness [5–7]. Within the vast number of chemical modifications, oxidation, acetylation-crosslinking, and hydrolysis-octenylsuccinylation were considered as important because they can provide features of interest for both, FFS and EC. Carbonyl and carboxyl groups generated during oxidation can enhance hydrogen bonds among adjacent amylopectin molecules resulting in a more efficient association process. Crosslinking helps to prevent swelling and disruption of the starch granule during gelatinization, resulting in reduced water dispersibility properties of FFS. Esterification is used to increase hydrophobicity and lipid binding capacity of starches without substantially affecting their water dispersibility [8].

Since EC are usually applied as a liquid dispersion, knowledge of rheological behavior of FFS to design processing operations and predict its performance after application is needed. After FFS application viscosity and yield stress can have a primary role controlling the behavior of the film [9], in particular to prevent excessive draining. Waxy starches have the advantage of producing viscous dispersions but not gels after the gelatinization process, because the short chain lengths of amylopectin have little tendency to interact [10]. This is particularly useful because it helps restructuration control after the shearing process.

Therefore, the objective of this work was to study the structure of waxy starch and how functional groups introduced by chemical modification affect association among chains of amylopectin in FFS and their resulting films. This work also aimed to understand the waxy starch interactions with additives such as sorbitol or hydrophobic

substances and their effect on properties such as solubility, opacity, and water vapor permeability (WVP) of the produced films.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Four modified starches were used in this study. WCS and acetylated cross-linked starch (ACLS) were obtained from Corn Products (CPI, San Juan del Río, Qro, México). WCS was used to obtain two additional modified starches, the oxidized (OS) and hydrolyzed-octenylsuccinylation starch (H-OSA). OS and H-OSA were prepared following previously reported procedures [11, 12]. To improve films hydrophobic properties two different lipids were used, beeswax (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EUA) and safflower oil (Coral International, SLP, México).

2.2 Characterization of starches

2.2.1 Degree of substitution

Carbonyl and carboxyl groups quantification of modified starch was performed according to the methodology depicted by Kuakpetoon and Wang [11]. Esterification of H-OSA starch was determined following a previously described procedure [13]. The degree of crosslinking was determined by comparing the peak viscosity (PV) values of WCS and ACLS, according to Jyothi *et al.* [14]. The sample PV was recorded using a Physica MCR 301 rheometer (Anton Paar, Ostfildern, Germany) fitted with a starch cell and starch vane ST24-2D/2V/2V30. Starch slurry was cooked as indicated in pasting procedure.

2.2.2 Amylopectin chain-length distribution

The chain length distribution of enzymatically debranched starch was characterized by high performance anion exchange chromatography using amperometric detector (HPAEC-PAD) according to a previously described method [15] modified by Chávez-Murillo *et al.* [16]. The HPAEC-PAD (DX500, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) system consisted of a GP50 gradient pump, LC20-1 chromatography organizer, ED40 electrochemical detector, $4 \times 50 \text{ mm}^2$ CarboPac PA1 guard column, $4 \times 250 \text{ mm}^2$ CarboPac PA1 analytical column, and AS40 automated sampler. Deionized water (3.2 mL) was added to 10 mg of defatted starch and the mixture was heated in boiling water for 1 h to gelatinize the starch sample. After cooling to room temperature, 0.4 mL of 0.1 M acetate buffer pH 3.5 and $5 \mu\text{L}$ of 200 U/ μL isoamylase (EC 3.2.1.68, 59 000 U/mg,

Hayashibara Biochemical Laboratories, Okayama, Japan) solution in same buffer were added, and the mixture was incubated at 40°C for 4 h. Enzymatic reaction was stopped by adding 0.21 mL of 0.2 N NaOH, followed by heating in boiling water for 15 min. The sample was cooled, filtered through 0.45 µm pore size membrane (Millipore, Ireland) and 0.6 mL of filtrate was transferred into an auto-sampler vial for injection.

2.3 Starch structure characterization

Defatted starch (20 mg) was solubilized in 5 mL DMSO by stirring for 1 h in a boiling water bath. The sample was stirred at room temperature overnight and was filtered through a 5 µm pore size nylon membrane filter. Whole starch fractions were determined by injection into a HPSEC fitted with RI detector. This system consisted of a 515 HPLC pump (Waters, Milford, MA, USA), a sample loop of 100 µL, in-line degasser, and 2410 RI detector (Waters) maintained at 40°C. A series of OHPak KB-802 and KB-804 columns (Shodex, New York, USA) kept at 55°C were used, together with a column guard. The mobile phase was an aqueous solution of 0.1 M NaNO₃ and 0.02% NaN₃, and the flow rate was 0.7 mL/min.

2.4 Pasting properties

Pasting properties of starches were obtained using a Physica MCR 301 rheometer (Anton Paar, Ostfildern, Germany) fitted with a starch cell and starch vane ST24-2D/2V/2V30. Starch slurry was first stirred at 960 rpm for 60 s and then at 160 rpm for the remainder of the test. The heating ramp was chosen based on AACCS 61-02 method [17] with some modifications. Samples were held at 50°C for 120 s, heated to 90°C at a heating rate of 0.2 °C/s, and kept at 90°C for 600 s, then cooled to 50°C at a cooling rate of 0.2 °C/s. Pasting curves were done at

least in duplicate for 3, 4, and 5% w/w starch concentration.

2.5 Film preparation

Film-forming solutions were prepared by heating a starch slurry (3%, w/w), at 90°C for 10 min. After cooling, sorbitol (Sigma), Tween 80 (Sigma), and lipids were added at a final concentration of 2.4, 0.02, and 0.2% w/w, respectively. Since all starches produced highly viscous dispersions at concentration of 4% or higher, difficult to handle, pour, and with a tendency to trap small air bubbles 3% was chosen to produce the films. A beeswax suspension was prepared by adding molten wax to hot water, followed by high shear emulsification at 21 500 rpm (Ultraturrax, Staufen, Germany) in presence of stearic acid (Sigma) and morpholine (Sigma), according to Hagenmaier and Baker [18]. Safflower oil or beeswax was incorporated into the FFS by using a high speed mixer at 21 500 or 6000 rpm, respectively. Ten milliliters of FFS was cast on leveled square glass plates of 10 × 10 cm² and dried at room conditions (~45% HR and 25°C) for 24 h, before peeling the films.

Table 1. Degree of substitution of the starches used^{a)}

Starch	Measured substitution	Degree of substitution
WCS	ND	ND
H-OSA	Esterification	0.05 ± 0.01
ACLS	Crosslinking	94.88 ± 0.10
OS	Carboxyl content	0.20 ± 0.01
	Carbonyl content	0.14 ± 0.05

ND, not detected; WCS, waxy corn starch; OS, oxidized starch; H-OSA, hydrolyzed-octenylsuccinylated starch; ACLS, acetylated cross-linked starch.

a) Means of three replicates ± SD.

Table 2. Starch structure by HPSEC-IR of whole modified starches and chain length of isoamylase-debranched modified starches by HPAEC-PAD

Modified starch	HPSEC-IR of whole starches				HPAEC-PAD of isoamylase-debranched starches				
	FI	FII	FIII	FIII/FII	CL	A chain DP 6–12	B1 chain DP 13–24	B2 chain DP 25–36	B3+ chain DP >37
WCS	–	19.20	80.80	4.21	21.03 ± 0.06	23.43 ± 0.19	47.74 ± 0.16	18.10 ± 0.26	10.73 ± 0.09
OS	1.27	21.34	77.40	3.63	20.09 ± 0.07	25.70 ± 0.02	48.95 ± 0.40	16.30 ± 0.25	9.05 ± 0.13
H-OSA	0.47	32.44	67.09	2.07	18.71 ± 0.07	27.27 ± 0.18	53.06 ± 0.21	13.66 ± 0.37	6.02 ± 0.02
ACLS	2.31	31.27	66.42	2.12	19.00 ± 0.04	27.53 ± 0.13	51.37 ± 0.50	14.36 ± 0.25	6.76 ± 0.07

CL, average chain length; F, fraction.

Values are mean of two measurements ± SD. Modified starches abbreviations as in Table 1.

2.6 Flow curves

Samples were subjected to a programmed shear rate increasing logarithmically from 0 to 500 s^{-1} . This test was performed using the same geometry as in pasting to avoid sedimentation of starch granules in the FFS of ACLS or flocculation of solid and colloidal particles. Samples were previously rested for 5 min to allow stress relaxation.

2.7 Yield stress

Static and dynamic yield stresses (σ_s and σ_d , respectively) were measured at an apparent shear rate of 0.05 s^{-1}

using a Physica MCR 300 rheometer [19]. Six-blade star-shaped vane geometry was used to determine σ_s after 1 h of rest. σ_d was obtained after the sample was sheared using a linear ramp from 0 to 100 s^{-1} .

2.8 Film characterization

2.8.1 Water vapor permeability

Water vapor permeability of films was determined according to ASTM E96 method [20]. Thickness was determined using a digital micrometer (IP65, Mitutoyo, Tokio, Japan), reported values are an average of at least six random

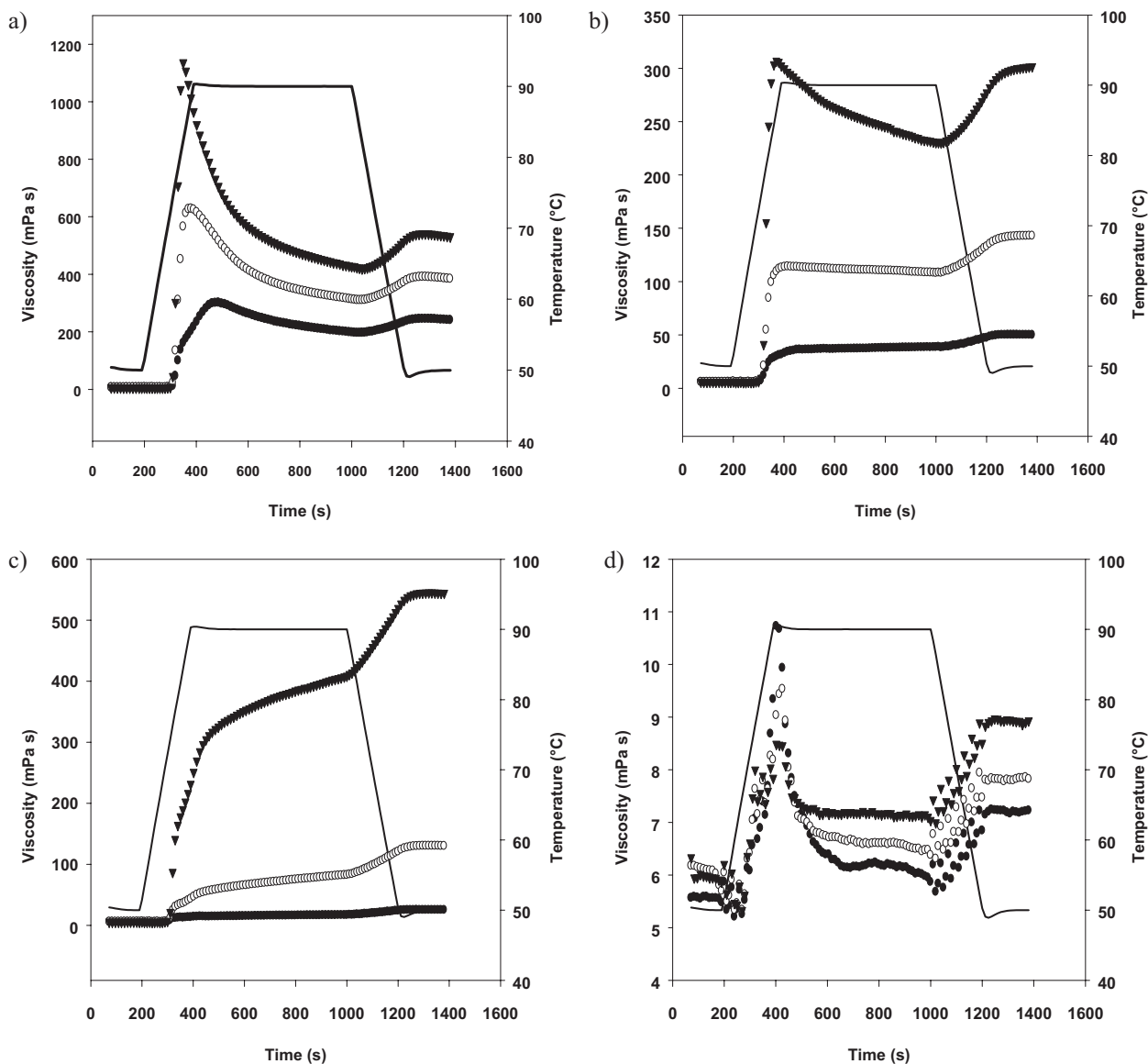


Figure 1. Pasting curves of starches at 3% (●), 4% (○), and 5% (▼) concentration w/w. (a) Waxy corn starch; (b) oxidized starch; (c) acetylated cross-linked starch; (d) hydrolyzed-octenyl succinylated starch. Curves were done at least in duplicate.

measurements. At least four samples of each film were tested.

2.8.2 Opacity

Films opacity was determined using the method of Kuakpetoon and Wang [11]. Film sample was cut into a rectangle and placed on the internal side of a spectrophotometer cell. The absorbance spectrum (400–700 nm) was recorded for each sample. Opacity was obtained by calculating the area under the absorbance versus wavelength (nm) curve, and expressed as $A \times \text{nm}$. At least three samples were measured for each type of film.

2.8.3 Film solubility in water

Film solubility was determined according to Zamudio-Flores et al. [21] with modifications. Pieces ($2 \times 3 \text{ cm}^2$) of each film were cut and stored at room temperature in a desiccator until constant weight, followed by placing in vials containing 80 mL deionized water, with occasional gentle stirring to avoid film disruption, for 1 h. After soaking the water was carefully removed, and vials were placed in an oven at 90°C to constant weight. Soluble matter was expressed as percentage. Three samples were analyzed for each formulation.

2.8.4 Films structure

Films structure was observed using a Quanta 200F environmental electron microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA), using the environmental mode with the sample in its native state.

3 Results and discussion

3.1 Starch structure and amylopectin chain-length distribution

The degree of substitution of tested starches is shown in Table 1. The carbonyl and carboxyl content of OS were similar to those determined in oxidized WCS using 3% v/v NaOCl [22]. Higher degree of substitution was observed in the H-OSA when compared with other non-hydrolyzed OSA banana and corn starches [23, 24]. The different amylopectin content and the hydrolysis process of H-OA may be responsible for these values.

According to HPSEC-IR analysis, three fractions designated as FI, FII, and FIII were found (Table 2). FIII which contained the amylopectin molecules of smallest MW was predominant among starch samples. WCS amylopectin molecules showed a distribution of two molecular size

groups, while OS, H-OA, and ACLS starches additionally showed a minor fraction, designated as FI, which was associated to high MW amylopectin. H-OA starch showed the lowest FI fraction, while ACLS showed the highest. Appearance of FI in ACLS and OS was attributed to the formation of cross-links among amylopectin molecules [22], while FI in H-OA is probably due to the formation of clusters stabilized by hydrophobic associations [25]. Dual modified starches showed an increased FII fraction and a simultaneous decrease in fraction FIII. We hypothesize that the first modification took place in the amorphous region of the starch granule, affecting mainly high MW amylopectin, while the second modification affected low MW molecules forming a semi-crystalline zone.

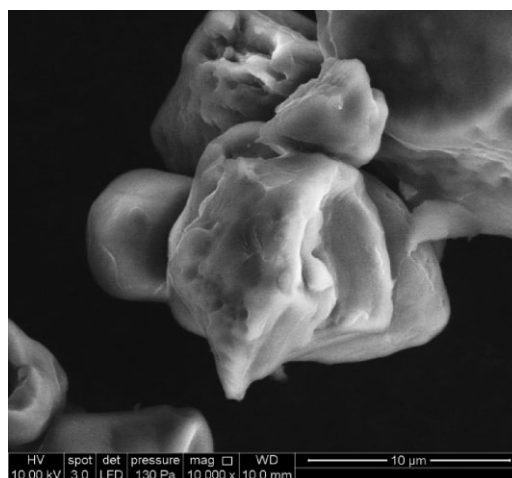


Figure 2. Eroded granules of H-OA starch due to dual modification.

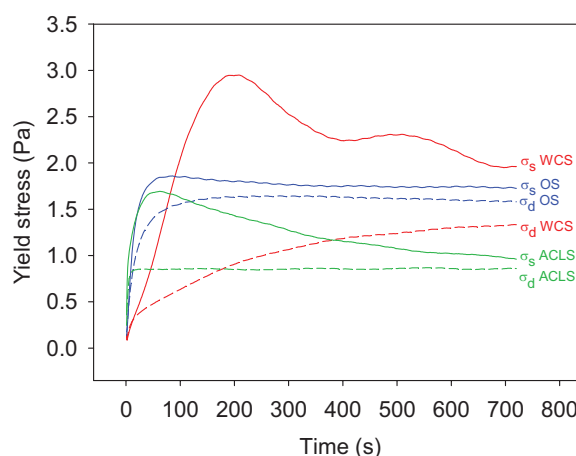


Figure 3. Stress versus time curves of static yield stress and dynamic yield stress of waxy corn starch (WCS), oxidized starch (OS), and acetylated cross-linked starch (ACLS).

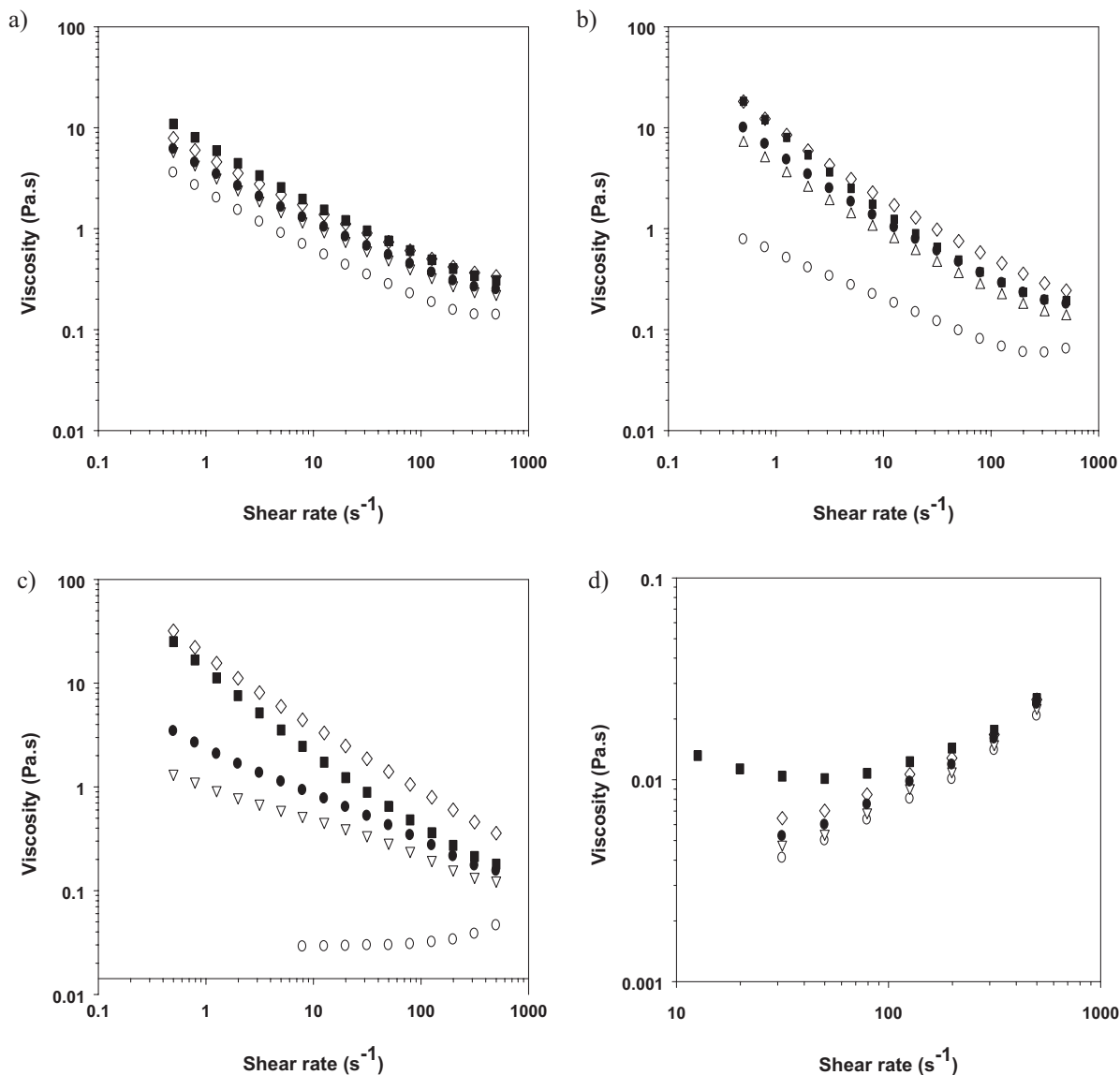


Figure 4. Viscosity curves of different starch dispersions and film-forming solutions (FFS). (a) Waxy corn starch; (b) oxidized starch; (c) acetylated cross-linked starch; (d) hydrolyzed-octenylsuccinylated starch. Void symbols indicate starch FFS without additives (○) 3%; (▽) 4%, and (□) 5% w/w. Filled symbols indicate starch FFS with additives (●) 4–3.2% w/w of starch–sorbitol FFS; (■) 4–3.2–0.2% starch–sorbitol–beeswax FFS. Results are the average of three replicates.

Isoamylase-debranched starches showed a decrease in the CL and this effect was higher in the dual modified starches ACLS and H-OSA (Table 2). The decrease of long chains B2 and B3+ after chemical modifications is associated to their location in the amorphous region of the starch granule [26, 27].

High content of low MW amylopectin has been related to an enhanced ability of re-ordering in a compact and strong matrix [10]. Thus, to make an appropriate selection for films design, starch structure, and chain length distribution analysis are key factors to describe the behavior of gelatinized starch dispersions.

3.2 Pasting properties

Pasting behavior evidenced the chemical modification of starches (Fig. 1). WCS showed high PV and pronounced breakdown, indicating starch granules disruption during gelatinization. OS showed a decreased PV but a better reorganization after cooling than WCS. PV decrease may be associated to disorganization during oxidation while higher ability of molecular reorganization evidenced by setback is attributed to functional carboxyl and carbonyl groups that are able to form additional hydrogen bonds [16, 28]. On the other hand, ACLS pasting behavior

showed swelling restriction (Fig. 1c). This effect may be due to crosslinking [24, 29].

The dual modified H-OSA starch showed reduced viscosity and the lowest PV of all evaluated starches (Fig. 1d), and may be attributed to the de-branching and erosion of the granule caused by acid hydrolysis during preparation (Fig. 2) [27].

Reorganization tendency of evaluated starches was associated to viscosity control and this property may be useful to predict restructuring of FFS after application as coatings.

3.3 Yield stress

Dynamic yield stress as a function of time indicated a better reorganization capacity of OS than WCS (Fig. 3). This behavior may be explained by reinforcement of the weak interactions occurring among outer chains of amylopectin by carbonyl and carboxyl groups [30]. In the case of ACLS, FFS structure is markedly interrupted at the beginning of the test. This behavior is probably a result of weaker interactions among particles than those of the FFS formed by completely gelatinized amylopectin molecules. Due to its low viscosity H-OSA did not show a measurable yield stress.

3.4 Viscosity curves

Starch dispersions showed an increase in apparent viscosity when sorbitol and beeswax was added (Fig. 4). ACLS, WCS, and OS dispersions showed a typical shear thinning behavior, while H-OSA showed a shear induced structuring pattern (Fig. 4d). Rheological behavior of H-OSA was attributed to introduction of long esters chains that caused repulsion among adjacent molecules. Therefore, under increased shear rate repulsive forces

were overcome resulting in a more disordered structure opposite to the flow of polymer layers at low shear rates [31–33].

We observed that at 4–5% w/w starch concentrations the resulting FFS was difficult to handle with a tendency to trap air bubbles which can compromise film continuity, while 3% w/w ACLS and H-OSA dispersions showed high rheological properties variability. Additionally, ACLS showed a tendency to settle with time. Thus, 4% w/w concentration of ACLS and H-OSA was needed to obtain reproducible flow curves results with the geometry used (Fig. 4c and d). However, 3% w/w starch concentration films were produced for comparative purposes.

Water replacement by sorbitol resulted in a higher viscosity because of an increased solid fraction. We speculate that higher viscosity of starch suspensions added with beeswax may be due to interactions with lipid particles that disappear when shear rate increases as shown in Fig. 4. Viscosity values found for WCS, ACLS, and OS were within the range of those obtained for acetylated starch [34].

3.5 Films characterization

Selected starches containing or not additives were capable to form continuous and transparent films. Comparing films without hydrophobic additives only, ACLS produced more permeable and soluble films than other starches (Table 3). This may be explained by the more open films structure produced (Fig. 5d and e). Reduction of WVP achieved with H-OSA was related to the hydrophobicity of octenyl-succinate group.

Beeswax effectively reduced the WVP of films. In the case of ACLS films this effect was associated to phase separation of beeswax particles which reduces the avail-

Table 3. Effect of film formulation on appearance and water vapor permeability of produced films^{a)}

Additive	Starch	WVP (g · mm · m ⁻² · h ⁻¹ · kPa ⁻¹)	Thickness (μm)	Solubility (%)	Opacity (UA × nm)
Sorbitol	WCS	0.588 ± 0.080 ^{abc}	33.7 ± 10.3 ^a	44.1 ± 1.5 ^{abc}	24.3 ± 1.5 ^{bc}
	ACLS	0.642 ± 0.010 ^a	35.9 ± 0.2 ^a	41.2 ± 0.8 ^b	31.6 ± 1.5 ^{bc}
	OS	0.572 ± 0.011 ^{abc}	35.4 ± 5.6 ^a	35.2 ± 2.2 ^{bc}	21.6 ± 0.19 ^c
	H-OSA	0.523 ± 0.016 ^{bcd}	29.7 ± 0.0 ^a	42.8 ± 0.4 ^{abc}	25.3 ± 0.39 ^{bc}
Sorbitol, beeswax	WCS	0.502 ± 0.034 ^{cd}	33.7 ± 0.4 ^a	29.1 ± 9.3 ^c	23.2 ± 6.3 ^c
	ACLS	0.452 ± 0.000 ^{de}	36.3 ± 4.6 ^a	55.9 ± 1.6 ^a	28.8 ± 2.1 ^{bc}
	OS	0.485 ± 0.016 ^{cd}	40.1 ± 3.2 ^a	30.0 ± 1.6 ^{bc}	23.2 ± 3.3 ^c
	H-OSA	0.357 ± 0.016 ^e	35.0 ± 1.2 ^a	55.4 ± 0.9 ^a	26.5 ± 2.2 ^{bc}
Sorbitol, safflower oil	WCS	0.497 ± 0.012 ^{cd}	32.3 ± 0.8 ^a	42.7 ± 1.8 ^{abc}	48.9 ± 5.2 ^a
	ACLS	0.626 ± 0.010 ^{ab}	40.0 ± 3.7 ^a	41.6 ± 0.7 ^{abc}	32.5 ± 5.3 ^{bc}
	OS	0.480 ± 0.006 ^{cd}	29.3 ± 0.4 ^a	34.7 ± 5.4 ^{bc}	38.8 ± 6.3 ^{ab}
	H-OSA	0.593 ± 0.039 ^{abc}	30.9 ± 2.5 ^a	48.6 ± 10.6 ^{ab}	24.4 ± 1.6 ^{bc}

a) Values are mean of three replicates ± SD. Means in column not sharing the same letter are significantly different ($p < 0.05$). Modified starches abbreviations as in Table 1.

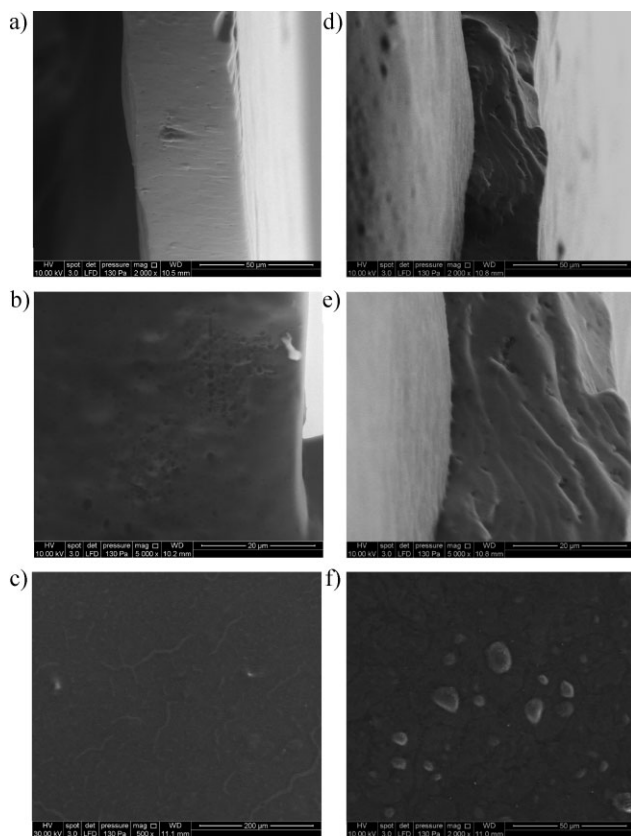


Figure 5. SEM micrographs of films based on OS and ACLS evidencing organization differences due to their mechanism of formation. (a) OS based films showing a compact structure; (b) OS based film added with beeswax showing its retention into the polymer matrix; (c) OS based film surface showing partial separation of beeswax particles; (d and e) ACLS based films showing a disorganized structure; (f) ACLS based film surface showing both, mechanism of film formation due to granules juncture and separation of beeswax particles.

able area for water vapor transfer (Fig. 5f). The same effect was also proposed for H-OSA films due to the low viscosity of their FFS [2]. Films based on WCS and OS showed additional phase separation and entrapment of beeswax particles (Fig. 5b and c).

Films prepared with FFS containing safflower oil showed an increased WVP when compared with their counterparts added with beeswax. Differences found in H-OSA films were attributed to their emulsifying properties which favor the octenyl succinate–lipid complex formation, hindering the re-association process of amylopectin molecules.

The thickness of all produced films was between 29.3 and 40.1 μm (Table 3). According to Longares et al. [35] this thickness range is unnoticed by the consumer. As expected, neither the kind of starch nor the type of hydrophobic agent influenced films thickness, a property mainly dependent on the quantity of solids deposited per unit area [36].

Films produced using OS starch without hydrophobic additives, were the least soluble while H-OSA and ACLS starches showed the opposite effect. The esterification of the H-OSA starch can hinder association of amylopectin molecules resulting in easier hydration [7, 37], while the open structure obtained with ACLS may permit loss of soluble material from the film. This effect is increased by introducing wax molecules because they produce an additional hindering caused by lipid-complex formation. Micrographs of OS films added with beeswax showed that their reduced solubility occurs because beeswax particles separate, some protect the upper film face from hydration while others remain embedded in the carbohydrate matrix (Fig 5b and c). The same effect is proposed for WCS because both starches do not interact with lipids due to lack of hydrophobic functional groups.

Films containing oil were cloudy and oily in appearance, while those added with beeswax achieved a homogeneous distribution showing a transparency similar to those without it. Low opacity values indicate a translucent film and this property may adversely affect selection of a coated product by the consumer [21, 38]. Opacity values obtained in this work (21.6–38.8 $\text{UA} \cdot \text{nm}$) were lower than those found for tapioca starch/hsian-tsao leaf gum (46–93 $\text{AU} \cdot \text{nm}$) [39], acetylated starch (45.42–115.12 $\text{AU} \cdot \text{nm}$) [34], and yam starch (85–111 $\text{AU} \cdot \text{nm}$) [38].

4 Conclusions

Properties of FFS and films based on WCSs are correlated with the ability of amylopectin molecules to re-associate. The association process of amylopectin molecules depends mainly on their molecular size and chain length distribution, but introduction of chemical groups or inclusion of additives can promote or hinder interactions. These effects may result in films showing different organization levels allowing the production of tailored coatings.

Films formulated using OS and ACLS exhibited WVP, thickness, and solubility properties which upon further research may be used as study models to produce matrices for the support and delivery of antimicrobial compounds on the surface of fresh fruits leading to longer shelf life.

We appreciate the financial support of CONACYT-Mexico for PhD scholarship 290549, the advice of Dr. Carmen Nuñez-Santiago (Ceprobi-IPN-México), and help with chromatography analysis by Dr. Guadalupe Mendez Montealvo of the Department of Food Science at the University of Arkansas.

The authors have declared no conflict of interest.

5 References

- [1] Lin, D., Zhao, Y., Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2007, 6, 60–75.
- [2] Bravin, B., Peressini, D., Sensidoni, A., Influence of emulsifier type and content on functional properties of polysaccharide lipid-based edible films. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 6448–6455.
- [3] Vargas-Torres, A., Zamudio-Flores, P. B., Salgado-Delgado, R., Bello-Pérez, L. A., Biodegradation of low-density polyethylene-banana starch films. *J. Appl. Polym. Sci.* 2008, 110, 3464–3472.
- [4] Olivas, G. I. I., Barbosa-Cánovas, G., in: Embuscado, M. E., Huber, K. C. (Eds.), *Edible Films and Coatings for Food Applications*, Springer, New York, USA 2009, pp. 211–244.
- [5] Ratnayake, W. S., Jackson, D. S., A new insight into the gelatinization process of native starches. *Carbohydr. Polym.* 2007, 67, 511–529.
- [6] Rindlav-Westling, A., Stading, M., Hermansson, A.-M., Gatenholm, P., Structure, mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films. *Carbohydr. Polym.* 1998, 36, 217–224.
- [7] Mehyar, G., Han, J., Physical and mechanical properties of high-amylose rice and pea starch films as affected by relative humidity and plasticizer. *J. Food Sci.* 2004, 69, E449–E454.
- [8] Mason, W. R., in: James, B., Roy, W. (Eds.), *Starch*, 3rd Edn., Academic Press, San Diego 2009, pp. 745–795.
- [9] Peressini, D., Bravin, B., Lapasin, R., Rizzotti, C., Sensidoni, A., Starch-methylcellulose based edible films: Rheological properties of film-forming dispersions. *J. Food Eng.* 2003, 59, 25–32.
- [10] Mali, S., Karam, L. B., Ramos, L. P., Grossmann, M. V. E., Relationships among the composition and physicochemical properties of starches with the characteristics of their films. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7720–7725.
- [11] Kuakpetoon, D., Wang, Y.-J., Characterization of different starches oxidized by hypochlorite. *Starch/Stärke* 2001, 53, 211–218.
- [12] Murúa-Pagola, B., Beristain-Guevara, C. I., Martínez-Bustos, F., Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. *J. Food Eng.* 2009, 91, 380–386.
- [13] Jeon, Y.-S., Lowell, A. V., Gross, R. A., Studies of starch esterification: Reactions with alkenylsuccinates in aqueous slurry systems. *Starch/Stärke* 1999, 51, 90–93.
- [14] Jyothi, A. N., Subramoney, N. M., Rajasekharan, K. N., Effect of cross-linking with epichlorhydrin on the properties of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) starch. *Starch/Stärke* 2006, 58, 292–299.
- [15] Kasemsuwan, T., Jane, J., Schnable, P., Stinard, P., Robertson, D., Characterization of the dominant mutant amylose-extender (Ae1-5180) maize starch. *Cereal Chem.* 1995, 72, 457–464.
- [16] Chávez-Murillo, C. E., Wang, Y. J., Bello-Pérez, L. A., Morphological, physicochemical and structural characteristics of oxidized barley and corn starches. *Starch/Stärke* 2008, 60, 634–645.
- [17] AACC. Approved methods of the AACC 11th (Ed.). Method 61-02. 01. Determination of the pasting properties of rice with the rapid visco analyser. Approved November 3, 1999. AACC International, St. Paul, MN, USA.
- [18] Hagenmaier, R. D., Baker, R. A., Wax microemulsions and emulsions as citrus coatings. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 899–902.
- [19] Genovese, D. B., Rao, M. A., Vane yield stress of starch dispersions. *J. Food Sci.* 2003, 68, 2295–2301.
- [20] ASTM. Annual Book of ASTM Standards. Standard E96-95. Standar test methods for water vapor transmission of materials. April, 1999. ASTM International, West Conshohocken, PA, USA.
- [21] Zamudio-Flores, P. B., Bautista-Baños, S., Salgado-Delgado, R., Bello-Pérez, L. A., Effect of oxidation level on the dual modification of banana starch: The mechanical and barrier properties of its films. *J. Appl. Polym. Sci.* 2009, 112, 822–829.
- [22] Wang, Y.-J., Wang, L., Physicochemical properties of common and waxy corn starches oxidized by different levels of sodium hypochlorite. *Carbohydr. Polym.* 2003, 52, 207–217.
- [23] Bhosale, R., Singhal, R., Process optimization for the synthesis of octenyl succinyl derivative of waxy corn and amaranth starches. *Carbohydr. Polym.* 2006, 66, 521–527.
- [24] Carlos-Amaya, F., Osorio-Díaz, P., Agama-Acevedo, E., Yee-Madeira, H., Bello-Pérez, L. A., Physicochemical and digestibility properties of double-modified banana (*Musa paradisiaca* L.) starches. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 1376–1382.
- [25] Shogren, R. L., Viswanathan, A., Felker, F., Gross, R. A., Distribution of octenyl succinate groups in octenyl succinic anhydride modified waxy maize starch. *Starch/Stärke* 2000, 52, 196–204.
- [26] Kuakpetoon, D., Wang, Y.-J., Locations of hypochlorite oxidation in corn starches varying in amylose content. *Carbohydr. Res.* 2008, 343, 90–100.
- [27] Wang, Y.-J., Truong, V.-D., Wang, L., Structures and rheological properties of corn starch as affected by acid hydrolysis. *Carbohydr. Polym.* 2003, 52, 327–333.
- [28] Kuakpetoon, D., Wang, Y.-J., Structural characteristics and physicochemical properties of oxidized corn starches varying in amylose content. *Carbohydr. Res.* 2006, 341, 1896–1915.
- [29] Rodríguez-Marín, M. L., Núñez-Santiago, C., Wang, Y.-J., Bello-Pérez, L. A., Physicochemical and structural characteristics of cross-linked banana starch using three cross-linking reagents. *Starch/Stärke* 2010, 62, 530–537.
- [30] Achayuthakan, P., Suphantharika, M., Rao, M. A., Yield stress components of waxy corn starch-xanthan mixtures: Effect of xanthan concentration and different starches. *Carbohydr. Polym.* 2006, 65, 469–478.
- [31] Mleko, S., Foegeding, E. A., Formation of whey protein polymers: Effects of properties a two-step heating process. *J. Texture Stud.* 1999, 30, 137–149.
- [32] Kim, S., Willett, J. L., Carriere, C. J., Felker, F. C., Shear-thickening and shear-induced pattern formation in starch solutions. *Carbohydr. Polym.* 2002, 47, 347–356.
- [33] Lazaridou, A., Biliaderis, C. G., Kontogiorgos, V., Molecular weight effects on solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydr. Polym.* 2003, 52, 151–166.

- [34] López, O. V., García, M. A., Zaritzky, N. E., Film forming capacity of chemically modified corn starches. *Carbohydr. Polym.* 2008, 73, 573–581.
- [35] Longares, A., Monahan, F. J., O’Riordan, E. D., Sullivan, M. O., Physical properties and sensor y evaluation of WPI films of varying thickness. *LWT – Food Science Technol.* 2004, 37, 545–550.
- [36] Villalobos-Carvajal, R., Hernández-Muñoz, P., Albors, A., Chiralt, A., Barrier and optical properties of edible hydroxypropyl methylcellulose coatings containing surfactants applied to fresh cut carrot slices. *Food Hydrocolloids* 2009, 23, 526–535.
- [37] Bertuzzi, M. A., Armada, M., Gottifredi, J. C., Physicochemical characterization of starch based films. *J. Food Eng.* 2007, 82, 17–25.
- [38] Mali, S., Grossmann, M. V. E., García, M. A., Martino, M. N., Zaritzky, N. E., Barrier, mechanical and optical properties of plasticized yam starch films. *Carbohydr. Polym.* 2004, 56, 129–135.
- [39] Chen, C.-H., Kuo, W.-S., Lai, L.-S., Rheological and physical characterization of film-forming solutions and edible films from tapioca starch/decolorized hsian-tsau leaf gum. *Food Hydrocolloids* 2009, 23, 2132–2140.

5. Resumen en extenso del segundo artículo publicado

Effect of native and acetylated-crosslinked waxy corn starch-beeswax coatings on quality attributes of raspberries during storage

Pérez-Gallardo, Alfonso¹, Mattinson, Scott D.³, Lazcano-Peralta, Alma¹, Fellman, John K.³,
Barbosa-Cánovas, Gustavo², García-Almendárez, Blanca, Regalado, Carlos^{1*}

Los recubrimientos comestibles (EC) pueden ser definidos como una delgada capa de material comestible, usualmente una mezcla de polímeros y lípidos, aplicada en estado líquido y secada sobre la superficie de un producto alimenticio con el propósito de incrementar su vida de anaquel. Entre otras propiedades, los EC son relevantes para preservar la calidad de las frutas porque actúan como barreras selectivas a gases dependiendo de su composición. De aquí que, puedan modificar la composición de la atmósfera interna de las frutas (Park, 1999; Ribeiro *et al.*, 2007).

Sin embargo, el efecto de los EC en la preservación de los parámetros de calidad de frutas y vegetales, ha demostrado un efecto diverso debido a la variabilidad en la tolerancia de los tejidos a la modificación de su atmósfera interna (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008). De aquí que sea importante evaluar su efecto directamente sobre el producto de interés. Los atributos de calidad como firmeza, color y contenido de compuestos antioxidantes son parámetros relacionados con el almacenamiento de la frambuesa (Haffner *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2004), mientras que la tasa de respiración y la producción de etileno pueden indicar la tasa de maduración (Fonseca *et al.*, 2002).

Las propiedades de barrera a gases como O₂ and CO₂ dependen de muchos factores incluyendo la naturaleza del polímero, la presencia de plastificantes, la humedad ambiental y el

ensamble estructural de los materiales (Rindlav-Westling *et al.*, 1998; Dole *et al.*, 2004). El almidón de maíz ceroso fue escogido para este estudio porque es barato y abundante, soluble o fácilmente dispersable en agua y puede ser usado para producir recubrimientos delgados que sean indetectables durante su consumo (Bertuzzi *et al.*, 2007).

En un estudio previo demostramos que la amilopectina del almidón ceroso de maíz (WCS) y el almidón acetilado-entrecruzado puede formar recubrimientos continuos con una permeabilidad al vapor de agua intermedia que puede ser mejorada adicionando emulsión de cera de abeja (Pérez-Gallardo *et al.*, 2011). De esta manera, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los recubrimientos compuestos elaborados con WCS y ACLS adicionados con cera de abejas en los parámetros de calidad de frambuesas frescas durante periodos cortos de almacenamiento en frío.

En este estudio se emplearon los almidones de maíz ceroso (WCS) y acetilado-entrecruzado (ACLS) que fueron un regalo de Corn Products (CPI, San Juan del Río, México). El sorbitol, ácido esteárico, Tween 80 y la morfolina fueron adquiridos en Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA). Todos los demás reactivos fueron grado analítico.

Las soluciones de recubrimiento se prepararon de acuerdo a lo expuesto por Pérez-Gallardo *et al.* (2012). Brevemente, se gelatinizó una suspensión de almidón y después de su enfriamiento se añadió sorbitol, Tween 80 y cera de abeja (Grupo Aselac, México) a una concentración final de 3.2, 0.02 y 0.2% (w/w) respectivamente. La suspensión de cera de abeja se preparó mediante emulsificación de una mezcla de ácido esteárico-cera de abejas-morfolina (Hagenmaier & Baker, 1994) a 21500 rpm (Ultraturrax, Staufen, Alemania) en agua caliente por 5 min. La emulsión resultante fue rápidamente enfriada a temperatura ambiente y filtrada.

Se utilizaron frambuesas compradas a un productor local en estado de madurez comercial de tamaño uniforme, visiblemente libres de daño físico y de infección fúngica. Las frutas fueron colocadas sobre una rejilla recubierta de teflón y la solución de recubrimiento fue aplicada por aspersión a una proporción de 1L por 10 kg de fruta. Posteriormente fueron secadas con aire a 20 °C utilizando un flujo de aire a 2 m s^{-1} durante 2 h. Se emplearon frutas sin recubrir como controles. Las frutas se colocaron en contenedores plásticos ventilados de 6 onzas y se almacenaron en refrigeración a 4 °C and 88% de humedad relativa. Todas las superficies en contacto con las frambuesas fueron previamente sanitizadas para prevenir contaminación.

Para medir la tasa de respiración, se colocaron aproximadamente 200 g de fruta en cámaras cerradas. Se midieron las concentraciones de dióxido de carbono (CO_2) y etileno (C_2H_4) de de cada cámara de manera automática cada 8 h, empleando un cromatógrafo de gases HP 5890A (Agilent, Avondale, PA, EUA) (Patterson & Apel, 1984). El sistema consistió en una columna GS-Q-PLOT de 0.53 mm x 30 m (Agilent Technologies), un detector de conductividad térmica (TCD) para medir el CO_2 , un detector de ionización de flama (FID) conectado después de una columna GS-Q-PLOT de 0.53 mm x 15 m (Agilent Technologies) para medir el etileno y dos válvulas de control electrónico para leer de cada flujo. El horno, inyector y TCD se mantuvieron a 30, 200 y 90 °C respectivamente, mientras que el FID se mantuvo a 200 °C. La columna para medir CO_2 tuvo un flujo de 8 ml min^{-1} . La temperatura de la cámara donde se mantuvo la fruta fue de 15 °C. Las mediciones fueron hechas por triplicado y se reportaron como la media \pm DE

Los compuestos volátiles se cuantificaron empleando la técnica de micro-extracción en fase solida (SPME) (Yang & Peppard, 1994), seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS). La muestra se preparó mezclando y moliendo 50 g de fruta con 100 ml de agua desionizada. La pulpa se separó por filtración y 20 ml del filtrado de

colocaron en un vial de plástico, tapado y se congelaron hasta su análisis. Después de descongelar el contenido del vial se colocaron 1ml del filtrado diluido en 1 ml de agua desionizada conteniendo 0.65 g de NaCl y se agitaron con una barra magnética de de 6 mm. Posteriormente se introdujo una fibra estándar de SPME (0.65 mm de espesor, fase estacionaria PDMS/DVB, Supelco Inc., Bellfonte, PA) la cual se mantuvo por 30 min para absorber los compuestos volátiles. Los compuestos adsorbidos en la fibra SPME se inyectaron en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890II (Agilent, Avondale, PA) acoplado a un detector selectivo de masas 5970. Los volátiles fueron desorbidos en el puerto de inyección durante 5 min a 200 °C. El modo de inyección fue sin división durante 2 min. La línea de transferencia fue mantenida a 250 °C. El gas acarreador fue helio a una velocidad de 30.1 cm/s a través de una columna capilar de sílica fundida DB-1 (J&W, Folsom, CA) de 60m X 32 mm y 0.32 μm de espesor. Los compuestos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención y espectro de masas de aquellos contenidos en la librería Wiley/NBS así como por comparación contra estándares (Birla *et al.*, 2005). Las mediciones fueron realizadas por triplicado y son reportadas como la media \pm DE.

El contenido de fenoles totales de los extractos se determinó de acuerdo con el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965) modificado por Dewanto *at al.*, (2002). Brevemente, se mezclaron 100 μL de extracto de frambuesas que fueron oxidados con 250 μL de 1 N de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma). Después de 5 min se añadieron 1250 μL de una solución al 20% (p/v) de Na_2CO_3 (Sigma) para detener la reacción y se guardó la muestra en oscuridad por 2 h. La absorbancia de la muestra fue leída a 760 contra un blanco preparado previamente. Empleando una curva de calibración, los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (GAE) por gramo de fruta fresca.

El contenido de antocianinas totales se determinó mediante el método de pH diferencial (Giusti & Wrolstad, 2001). Las muestras fueron diluidas en soluciones amortiguadoras de 0.2 M HCl/KCl (pH 1.0) y 0.2 M ácido acético/acetato de sodio (pH 4.5) respectivamente. La absorbancia fue leída a 510 y 700 nm empleando una celda de 1 cm de ancho. Las antocianinas totales fueron expresadas como cianidina-3-glucósido (Cyd-3-glu) por 100 g de muestra fresca (FW), empleando un coeficiente de extinción (ϵ) of $26900 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ y un peso molecular de 449 g mol^{-1} .

Para medir la pérdida de peso se emplearon lotes de frambuesa de 200 g se pesaron al inicio del experimento y se registró la pérdida de peso a los 0, 2, 4, 6 y 8 días. La pérdida de peso se expresó como porcentaje respecto al peso inicial.

El color de las frambuesas se evaluó empleando in colorímetro Minolta CM2002 (Minolta, Japón), calibrado y acoplado con un aditamento especial para reducir el área de muestreo. Los parámetros de luminosidad (L^*), rojo (a^*) y amarillo (b^*) se registraron a los 0, 2, 4 y 6 y 8 días. Para cada fruta se midieron tres sitios diferentes. Los valores de chroma y °hue fueron empleados para indicar cambios de color de acuerdo a lo expuesto por (McGuire, 1992).

La firmeza fue medida empleando un texturómetro TA-TX Texture Analyzer (Stable Micro Systems, Surry, Inglaterra). El sistema estaba equipado con un celda de compresión de 5 Kg con una sonda cilíndrica de 50 mm de diámetro que se ajustó a un movimiento de 1 mm s^{-1} hasta un 80% de compresión de la muestra. Se emplearon frambuesas de tamaño y forma similar. La firmeza se midió como la máxima compresión (N) alcanzada durante la prueba. Cinco frutas por lote escogidas al azar fueron usadas para cada tiempo de almacenamiento. Este análisis se realizó a los 0, 2, 4 y 6 y 8 días.

La estructura de los recubrimientos fueron analizados mediante la técnica de microscopía electrónica de barrido (Quanta 200F, FEI, Hillsboro, Oregon, USA) empleando la técnica de bajo vacío con la muestra en su estado nativo.

La tasa de respiración (RR, $\text{mmol CO}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) medida a 15 °C después de un periodo de equilibrio inicial fue de 3.62 ± 0.05 para WCS, 3.7 ± 0.03 para ACLS y 3.32 ± 0.13 Para las frambuesas sin recubrir. Sin embargo, las frambuesas sin recubrir mostraron un súbito incremento en la RR después de las 16 h de almacenamiento lo que las llevó hacia tasas más altas de respiración que sus contrapartes recubiertas después de las 40 h de almacenamiento (Fig. 1A). Después de las 56 h de almacenamiento la RR fue de $4.5 \pm 0.28 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para las frambuesas no recubiertas y disminuyó a $4.2 \pm 0.27 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para las recubiertas con ACLS y a 4.1 ± 0.08 para las recubiertas con WCS.

La reducción en la tasa de respiración observada en las frambuesas recubiertas se puede atribuir a la oclusión de las estomas (Fig. 2A y B) por un recubrimiento que muestra una permeabilidad selectiva a CO_2 sobre el O_2 , lo cual es típico de los recubrimientos hechos de almidón (Rindlav-Westling *et al.*, 1998; Park, 1999; Fonseca *et al.*, 2002; Amarante & Banks, 2010). Aunque las frambuesas almacenadas en atmósferas modificadas y controladas son tolerantes al CO_2 (Kader, 2003; Wang, 2003), la permeabilidad selectiva puede inducir desordenes de respiración como la acumulación de CO_2 y reducción de O_2 interno. Al respecto, se ha observado la acumulación de CO_2 en tejidos de manzana, plátano (Banks, 1984,1985), mango (Kittur *et al.*, 2001) y guayaba (Thommohaway *et al.*, 2007) recubiertos con películas de almidón y otros carbohidratos. Sin embargo, la modificación de la atmósfera interna de los frutos y vegetales recubiertos ha mostrado depender de los materiales empleados en la formulación de recubrimientos (Hernández-Muñoz *et al.*, 2008). De aquí que las diferentes tasas de respiración

encontradas aquí para las frambuesas recubiertas con ACLS o WCS puedan ser asociadas con diferencias estructurales en los recubrimientos producidos con esos materiales (Fig. 2C and D). Los recubrimientos de ACLS están formados por la agregación de gránulos de almidón hinchados mientras que los de WCS contienen moléculas de amilopectina enzarzadas. Lo anterior se refleja en una estructura más cerrada y por lo tanto en películas con una diferente permeabilidad a gases (Pérez-Gallardo *et al.*, 2011).

Se observó una reducción en la producción de etileno en las frambuesas recubiertas en comparación con las frambuesas sin recubrir (Fig. 1B). Ésta tendencia fue similar a la observada en la medición de la RR debido a que la producción de etileno fue de $0.043 \pm 0.005 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para muestras sin recubrir después de 56 h, mientras que las muestras recubiertas con ACLS y WCS tuvieron una RR de 0.034 ± 0.004 and $0.035 \pm 0.003 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Esos resultados sugieren un posible efecto en el control de la maduración de la frambuesa, especialmente cuando se considera que niveles bajos de etileno pueden estar asociados con una disminución en la velocidad de senescencia. Éste efecto se ha observado en zarzamoras variedad *Navaho*, en las cuales una producción significativa de etileno se relacionó con una menor vida de anaquel (Perkins-Veazie *et al.*, 2000). Por otro lado, la producción de etileno en etapas finales de maduración se ha asociado con crecimiento o deterioro microbiano (Fonseca *et al.*, 2002; Aguayo *et al.*, 2006).

Los recubrimientos producidos con WCS y ACLS indujeron la producción de etanol y acetato de etilo, así como la reducción en la producción de terpenos para el día 8 de almacenamiento (Table 1, Fig. 3 A and B). El metabolismo fermentativo puede ser promovido por factores de estrés incluyendo el ambiental (daño por frío, abusos de temperatura, condiciones de hipoxia), biótico (desarrollo microbiano) o interno (maduración y envejecimiento de tejidos).

La acumulación de CO₂ en el tejido interno debido a la permeabilidad selectiva de los recubrimientos de amilopectina pudo causar este efecto. La aparición de metabolitos de fermentación se ha encontrado en fresas (Pelayo *et al.*, 2003; Allende *et al.*, 2007), cerezas (Petracek *et al.*, 2002) y frambuesas (Van der Steen *et al.*, 2002) almacenadas en atmósferas altas en CO₂. Además, la reducción en la generación de compuestos característicos del aroma de las frambuesas como α - and β -ionona y otros terpenos (Malowicki *et al.*, 2008; Blanch *et al.*, 2011). Esto puede deberse a una disminución en la eficiencia de la ruta metabólica de β -oxidación debido a condiciones de hipoxia (Harb *et al.*, 2008; Defilippi *et al.*, 2009).

El incremento en el contenido de antocianinas de las frambuesas sin recubrir y las recubiertas con WCS se incrementó durante el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, las frutas recubiertas con ACLS alcanzaron su máximo contenido al día 6 pero éste disminuyó para el día 8 (Cuadro 2). Éstos resultados sugieren que el contenido de antocianinas no fue afectado por el recubrimiento de WCS bajo las condiciones de almacenamiento. Por otro lado, ésta tendencia fue notablemente afectada en los frutos recubiertos con ACLS lo que resultó en el más alto contenido de antocianinas para el día 6 seguido de una posterior disminución. El incremento inicial en el contenido de antocianinas durante el almacenamiento seguido de un posterior decremento ha sido reportado en uvas y zarzamoras (Perkins-Veazie & Collins, 2002; Romero *et al.*, 2008). La reducción en el contenido de antocianinas pudo haberse debido a la degradación enzimática por la glicosidasa y la polifenoloxidasa más que por oxidación con especies reactivas de oxígeno. Los procesos oxidativos pueden no estar involucrados, por la posible acumulación de dióxido de carbono que ocasiona una correspondiente reducción en el contenido de oxígeno de los tejidos internos.

El contenido de fenoles totales de las frambuesas recubiertas con ACLS y de las no recubiertas se incrementó al inicio del tiempo de almacenamiento hasta el día 4, posteriormente su concentración se redujo ligeramente (Cuadro 2). Por otro lado, las frambuesas recubiertas con WCS no mostraron ningún cambio significativo el contenido de fenoles durante el tiempo de almacenamiento evaluado, sugiriendo un efecto protector provocado por el recubrimiento. La preservación del contenido de fenoles totales puede estar relacionado con un bajo nivel de oxígeno en los tejidos internos (Zheng *et al.*, 2007). Al respecto, se ha reportado que los compuestos fenólicos de tejidos de manzana y arándano azul son relativamente estables durante el almacenamiento en frío bajo condiciones de atmósferas controladas enriquecidas con CO₂, Éste comportamiento puede ser asociado con la ausencia de reacciones oxidativas por especies reactivas de oxígeno (Fawbush *et al.*, 2009; Chiabrandó & Giacalone, 2011).

Los recubrimientos afectaron adversamente la pérdida de peso y la firmeza de las frambuesas (Fig. 1C and D). La pérdida de peso de las frutas no recubiertas fue de $3.76\pm 0.1\%$ para el día 8, mientras que para los frutos recubiertos con ACLS y WCS fue de $7.33\pm 0.55\%$ y $7.46\pm 0.26\%$ respectivamente. La pérdida de vapor de agua se lleva a cabo por difusión a través de la cutícula (Amarante & Banks, 2010) y posteriormente a través de la matriz del recubrimiento. Sin embargo, los recubrimientos de amilopectina adicionados con cera de abeja han demostrado reducir la permeabilidad al vapor de agua (Pérez-Gallardo *et al.*, 2011) lo que sugiere que la pérdida de peso se debe a un daño en la epidermis. Por otro lado, la firmeza disminuyó de manera drástica en las frambuesas recubiertas con ACLS (Fig. 1D), que nos lleva a asumir que el proceso de ablandamiento natural de la frambuesa aparentemente es disparado por los recubrimientos. Por lo anterior, el incremento en la pérdida de peso y la reducción de la firmeza puede ser atribuida a dos razones: (1) daños a los tejidos internos debido a los bajos

niveles de oxígeno que llevan a la producción de metabolitos de fermentación como alcoholes (Smith & Skog, 1993) y (2) una hidratación excesiva de la epidermis causada por los recubrimientos (Han *et al.*, 2004). La pérdida de peso de las frambuesas sin recubrir concuerdan con los resultados de Haffner *et al.* (2002), quienes reportan que la pérdida de peso no es un parámetro limitante de la vida de anaquel de las frambuesas. Sin embargo, en éste estudio, dicho parámetro es útil para comparar efectos adversos causados por los recubrimientos.

La cromaticidad de las frambuesas no recubiertas aumentó durante el tiempo de almacenamiento mientras que en las frambuesas no recubiertas mostró una ligera disminución. Los cambios en el ángulo de tono (*Hue*^o) siguieron una ligera disminución en todos los tratamientos (Cuadro 2). El retraso en los cambios de intensidad de color de las frambuesas puede ser atribuido a una disminución en la velocidad del proceso de maduración, en la cual no se lleva a cabo la producción de antocianinas o su degradación es afectada; esto debido a que las antocianinas son los pigmentos que contribuyen mayoritariamente al color de las frambuesas (Han *et al.*, 2004). El incremento de la cromaticidad de las frambuesas sin recubrir es normal durante su evolución poscosecha durante el almacenamiento. Esto puede ser atribuido a la síntesis de antocianinas y su involucramiento en reacciones de co-pigmentación con compuestos fenólicos que puede además contribuir con color debido al pardeamiento enzimático (Han *et al.*, 2004; Vicente *et al.*, 2007). La aceptación visual de las frambuesas puede ser afectada por el incremento en la rojez y la pérdida de luminosidad porque los consumidores asocian esos cambios con frutos con sobre maduración (Gonçalves *et al.*, 2007; Krüger *et al.*, 2011).

Los recubrimientos de almidón ceroso nativo y acetilado-entrecruzado de maíz pueden retardar los procesos de maduración de un fruto al controlar la tasa de respiración y la producción de etileno. Adicionalmente, dichos cambios permitieron la preservación de los parámetros de

calidad como apariencia visual sin afectar los compuestos relacionados con la capacidad antioxidante. Sin embargo, los recubrimientos promovieron cambios adversos en la firmeza, la pérdida de peso y la producción de metabolitos de fermentación relacionados con un daño a los tejidos. La reducción en la producción de terpenos, el incremento en alcoholes y fenoles y la ausencia de degradación de antocianinas, sugieren la acumulación de dióxido de carbono y una probable disminución del O₂ en los tejidos de la frambuesa.

1 **Effect of native and acetylated-crosslinked waxy corn**
2 **starch-beeswax coatings on quality attributes of**
3 **raspberries during storage**

4

5

6 Pérez-Gallardo, Alfonso¹, Mattinson, Scott D.³, Lazcano-Peralta, Alma¹, Fellman,
7 John K.³, Barbosa-Cánovas, Gustavo², García-Almendárez, Blanca, Regalado,
8 Carlos^{1*}

9

10 ¹DIPA, PROPAC, Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro,
11 C.U., Cerro de las Campanas s/n, Col. Las Campanas, Querétaro, 76010 Qro.,
12 México. Email: regcarlos@gmail.com

13 ²Department of Biological Systems Engineering. Washington State University,
14 Pullman Washington. USA.

15 ³Postharvest Laboratory, Department of Horticulture and Landscape Architecture,
16 Washington State University, Pullman, Washington, USA.

17

18

19

20 *Author whom correspondence should be addressed

21 **Running title: Effect of starch based coatings on quality of raspberries.**

22 **Abstract**

23 Edible coatings are a thin layer of a mixture of edible materials, applied in the liquid
24 state and dried over the surface of a food product to maintain its quality during storage.
25 This work was aimed to study the effect of edible coatings made from waxy corn starch
26 (WCS) or acetylated-crosslinked starch (ACLS) added with beeswax on fresh raspberry
27 quality attributes during short term cold storage. Freshly harvested fruits were coated,
28 dried, packed in plastic trays and stored up to eight days at 4 °C. During storage quality
29 parameters such as firmness, respiration rate, anthocyanins content, total phenols,
30 color changes and weight loss were evaluated. A clear effect on control of respiration
31 rate was observed in coated raspberries. Respiration rate of uncoated fruit was
32 $4.5 \pm 0.28 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and decreased to 4.2 ± 0.27 for ACLS and to $4.1 \pm 0.08 \text{ mmol kg}^{-1}$
33 h^{-1} for WCS coated raspberries, after 56 h of storage at 15 °C. Ethylene production
34 followed a similar trend under these conditions decreasing from 0.043 ± 0.005 to
35 $0.034 \pm 0.004 \text{ mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for uncoated and ACLS coated fruits respectively, indicating
36 an effect on ripening control. Additionally, ACLS and WCS coatings permitted the
37 preservation of color without affecting anthocyanins content. However, the presence of
38 anaerobic metabolites and reduction of terpenes production in cold stored coated
39 raspberries indicated hypoxic conditions, which can adversely affect shelf-life quality
40 attributes of raspberries such as firmness and weight loss.

41

42 **Keywords:** waxy corn starch, acetylated-crosslinked starch, beeswax, edible coating,
43 raspberries.

44

45 **1. Introduction**

46 Edible coatings (EC) can be defined as a thin layer of a mixture of edible materials,
47 usually a mixture of polymers and lipids, applied in the liquid state and dried over the
48 surface of a food product with the purpose of increasing its shelf-life. Among other
49 properties, EC are relevant to preserve fruit quality because they can act as selective
50 gas barriers depending on their composition. Thus, they may modify the composition of
51 the fruit internal atmosphere [1-2].

52 However, the effect of EC on the preservation of quality attributes of fruits and
53 vegetables has shown to be diverse due to variable tissue tolerance to modification of
54 its internal atmosphere [3]. Therefore, it is important to evaluate their effect directly onto
55 the commodity. Quality attributes like firmness, color and antioxidants content are
56 parameters related with raspberry storage [4-5], while respiration rate and ethylene
57 production may indicate the rate of senescence [6].

58 Gas barrier properties to O₂ and CO₂ depend of many factors including the nature of the
59 polymer, the presence of plasticizers, environmental moisture and structural assembly
60 of the materials [7-8]. Waxy corn starch was chosen for this study because it is
61 inexpensive and abundant, soluble or easily dispersable, and can be used to produce a
62 thin coating which remains undetectable during consumption [9].

63 In a previous study we have shown that amylopectin from waxy corn starch (WCS) and
64 acetylated corn starch (ACLS) can form transparent and continuous coatings with
65 intermediate moisture barrier properties which may be improved by adding edible
66 beeswax emulsion [10]. Thus, the aim of this work was to study the effect of composite

67 edible coatings made from WCS and ACLS added with beeswax on fresh raspberry
68 quality attributes during short term cold storage.

69

70 **2. Materials and methods**

71 Waxy corn starch (WCS) and acetylated cross-linked starch (ACLS) were a gift from
72 Corn Products (CPI, San Juan del Río, Mexico). Sorbitol, stearic acid, Tween 80, and
73 morpholine were purchased from Sigma (Sigma, St. Louis, MO, USA). All other
74 chemicals used were of analytical grade or better.

75 **2.1. Preparation of coating solutions**

76 Coating solutions were prepared according to Pérez-Gallardo *et al.* [10]. Briefly, starch
77 slurry was gelatinized and after cooling, sorbitol, Tween 80, and beeswax (Grupo
78 Aselac, Mexico) suspension were added at a final concentration of 3.2, 0.02 and 0.2 %
79 (w/w) respectively. Beeswax suspension was prepared by emulsification of a mixture of
80 stearic acid-beeswax-morpholine [11] at 21500 rpm (Ultraturrax, Staufen, Germany) in
81 hot water for 5 min. The resulting emulsion was rapidly cooled at room temperature
82 using an ice bath and filtered using cheese cloth.

83 **2.2. Fruit treatments and storage**

84 Raspberries at a commercial ripening stage of uniform size, visually free of physical
85 damage and fungal infection were purchased from a local producer. Fruits were placed
86 over a Teflon coated grid, sprayed with the coating solution (1 L:10 kg ratio), and air
87 dried at 20°C using an air flow of 2 m s⁻¹ during 2 h. Uncoated fruits were used as
88 control. Coated fruits were packed in ventilated 6 ounces clamshells and stored in at 4

89 °C and 88% relative humidity. All surfaces in contact with raspberries were previously
90 sanitized to avoid possible contamination.

91 **2.3. Fruit physicochemical quality analyses**

92 **2.3.1. Respiration rate**

93 Approximately 200 g of fruits were placed into closed chambers. The carbon dioxide
94 (CO₂) and ethylene (C₂H₄) concentrations from treatment chamber were automatically
95 measured every 8 h using a HP 5890A gas chromatograph (Agilent, Avondale, PA,
96 USA), as described by Patterson and Apel [12]. The system was equipped with a 0.53
97 mm x 30 m GS-Q-PLOT column (Agilent) with a thermal conductivity detector (TCD), for
98 measuring CO₂, while a flame ionization detector (FID) connected to a 0.53 mm x 15 m
99 GS-Q-PLOT column (Agilent) was used to measure ethylene. The system comprises
100 two electronic switching valves to read from each flow path. The oven, injector, and
101 TCD were held at 30 °C, 200 °C, and 90 °C, respectively; whereas the FID was held at
102 200 °C. The columns measuring CO₂ and ethylene had flow rates of 8 and 10 ml min⁻¹,
103 and measurements were conducted in triplicate at 15 °C.

104 **2.3.2. Analysis of volatiles**

105 Samples were prepared by blending 50 g of fruit with 100 ml distilled water and 20 ml of
106 filtrate was poured into a plastic vial, capped, and stored at -20 °C until analysis. Aroma
107 related compounds were quantified using the solid-phase-micro-extraction (SPME)
108 technique as described by Yang and Peppard [13]. GC/MS analysis was conducted
109 using a Hewlett-Packard (Agilent), 5890II gas chromatograph interfaced with a 5970
110 mass selective detector system, as described by Birla *et al.* [14]. Compound

111 identification was based on comparison of GC retention indices and mass spectra with
112 those of authentic compounds.

113

114 **2.3.3. Total phenol content**

115 Total phenolic content of the extracts was determined according to the Folin-Ciocalteu
116 colorimetric method [15] modified by Dewanto *at al.*, [16]. Briefly, 100 μL of the extracts
117 were oxidized with 250 μL of 1 N Folin-Ciocalteu reagent (Sigma). After 5 min, 1250 μL
118 of a 20% (w/v) Na_2CO_3 (Sigma) solution was added to stop the reaction and the sample
119 was stored for 2 h. The absorbance was measured against a prepared blank at 760 nm.
120 From a calibration curve, results are expressed as mg gallic acid equivalents (GAE) (g
121 fresh fruit)⁻¹.

122 **2.3.4. Total anthocyanins**

123 Total anthocyanins content was determined using the pH differential method [17].
124 Samples were diluted in 0.2 M HCl/KCl (pH 1.0), and 0.2 M acetic acid/sodium acetate
125 (pH 4.5) buffers, and absorbance measurements were made at 510 and 700 nm on a
126 Shimadzu UV-2550 UV/Vis spectrophotometer, using 1 cm path length disposable cells.
127 Total anthocyanins content was expressed as cyanidin-3-glucoside (Cyd-3-glu) [100 g
128 of fresh weight (FW)]⁻¹, using an extinction coefficient (ϵ) of 26900 $\text{L cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$ and a
129 molecular weight of 449 g mol^{-1} .

130 **2.3.5. Weight loss**

131 Lots of 200 g of fruit were weighed at days 0, 2, 4, 6 and 8. Fresh weight loss was
132 expressed as a percentage loss of the initial total weight.

133 **2.3.6. Surface color development**

134 Raspberry color was evaluated with a Minolta spectrophotometer CM2002 (Minolta,
135 Japan), calibrated and attached to an appropriate device to reduce sampling area. L*
136 (lightness), a*(redness) and b* (yellowness) values were registered after 0, 2, 4, 6 and 8
137 days of storage. For each fruit three different sites were measured. Chroma and hue
138 angle were used to indicate changes in color according to McGuire [18].

139 **2.3.7. Firmness tests**

140 Firmness was performed using a TA-TX texture analyzer (Stable Micro Systems,
141 Surrey, England). The system was equipped with a compression cell of 5 kg and a
142 cylindrical probe 50 mm in diameter moving at 1 mm s⁻¹, until 80% sample compression.
143 Fruits of similar size and weight were used to avoid variability caused by differences in
144 size and area. Firmness was measured as maximum compression force (N) reached
145 during the test. Five raspberries of each lot were used for each storage time, which
146 were 0, 2, 4, 6 and 8 days.

147 **2.4. Structure of coating over fruit surface**

148 Fruit surface structure was observed using a Quanta 200F environmental scanning
149 electron microscope (FEI, Hillsboro, Oregon, USA), using low vacuum mode with the
150 sample in its native state.

151

152 **3. Results and discussion**

153 **3.1. Respiration rate**

154 Respiration rate (RR, mmol CO₂ kg⁻¹ h⁻¹) measured at 15 °C after initial equilibration
155 period was 3.62±0.05 for WCS, 3.7±0.03 for ACLS and 3.32±0.13 for uncoated

156 raspberries. However, uncoated raspberries showed a sharp increase in RR after 16 h
157 of cold storage leading to higher rates than coated counterparts after 40 h (Fig. 1A).
158 After 56 h of storage RR was 4.5 ± 0.28 mmol kg⁻¹ h⁻¹ for uncoated samples and
159 decreased to 4.2 ± 0.27 mmol kg⁻¹ h⁻¹ for ACLS and to 4.1 ± 0.08 for WCS.

160 Reduced respiration rate after coating may be attributed either to the occlusion of
161 stomata (Fig. 2A and B) by a coating with selective permeability to CO₂ over O₂, typical
162 of amylopectin and other starch coatings [1, 6, 8, 19]. Although raspberries under
163 modified and controlled atmospheres are tolerant to CO₂ [20-21], the selective
164 permeability favoring CO₂ over O₂ transfer can produce respiration disorders associated
165 with CO₂ accumulation and reduction of internal O₂. These effects have been observed
166 in tissues of apple, banana [22-23], mango [24] and guava [25]. However, modification
167 of the internal atmosphere of coated fruits and vegetables has been shown to depend
168 on the materials used for coatings formulation [3]. Thus, the different respiration rates
169 found here for raspberries coated with either ACLS or WCS may be associated to
170 structural differences of these edible materials (Fig. 2C and D). ACLS coatings were
171 formed by aggregation of swollen granules while WCS coatings comprised entangled
172 amylopectin molecules leading to a more closely packed structure and thus to films with
173 different gas permeability [10].

174 A reduction in ethylene production was observed in coated raspberries when compared
175 to uncoated fruits (Fig. 1B). This trend is similar to that observed for RR, since ethylene
176 production was 0.043 ± 0.005 mmol kg⁻¹ h⁻¹ for uncoated samples after 56 h, while ACLS
177 and WCS showed 0.034 ± 0.004 and 0.035 ± 0.003 mmol kg⁻¹ h⁻¹. These results suggest a
178 possible effect on control of raspberry ripening, especially when considering that lower

179 ethylene levels may be associated with a decrease in fruit senescence. This effect has
180 been observed in “Navaho” blackberries where significant ethylene production has been
181 related with shorter shelf life [26]. On the other hand, ethylene production at final stages
182 of ripening has been associated with microbial growth [6, 27].

183 **3.2. Aroma analysis**

184 WCS and ACLS EC induced production of ethanol and ethyl acetate and reduction in
185 terpenes content by day 8 (Table 1, Fig. 3 A and B). Fermentative metabolism can be
186 promoted in fruits by several stress factors including environmental (chilling injury,
187 temperature, hypoxic conditions), biotic (microbial infection) and internal (ripening,
188 senescence). Accumulation of CO₂ in internal tissue due to selective permeability of
189 amylopectin coatings may cause this effect. Generation of fermentative metabolites has
190 been found in strawberries [28-29], sweet cherries [30] and raspberries [31] stored
191 under high CO₂ atmospheres. Coatings also promoted a reduction in the concentration
192 of characteristic compounds found in ripe raspberry aroma such as α - and β -ionone and
193 total terpenes (Table 1, Fig. 3B) [32-33]. The reduction of volatile terpenes may
194 probably be associated to lower efficiency of the β -oxidation metabolic pathway due to
195 hypoxic conditions [34-35].

196 **3.3. Total phenols and anthocyanins**

197 Anthocyanins content of WCS coated and uncoated raspberries increased with storage
198 time. However, ACLS coated fruits reached the highest value at day 6 but decreased at
199 day 8 (Table 2). These results suggest that anthocyanins content was not affected by
200 WCS coating under conditions of the evaluated storage time. On the other hand, this
201 trend was notably affected by ACLS coating which resulted in the highest anthocyanins

202 content at day 6 of storage followed by their further decrease. Initial increase of
203 anthocyanins during storage followed by their further decrease has been reported in
204 grapes and blackberries [36-37]. Reduction of anthocyanins content may be due to
205 enzymatic degradation by glycosidase and polyphenoloxidase rather than oxidation by
206 active oxygen species. Oxidative processes may not be involved, because of possible
207 CO₂ accumulation with concomitant depletion of internal O₂ on internal tissues.

208 Phenols content of ACLS coated and uncoated raspberries initially increased with
209 storage time up to day 4 and later their concentration slightly decreased, where ACLS
210 coated fruits reached the highest value at day 2 (Table 2). On the other hand WCS
211 coated raspberries did not show any significant change in phenols content during the
212 evaluated storage time, suggesting a protective effect of this coating. Preservation of
213 total phenols content of WCS coated raspberries (Table 2) may be related to low
214 oxygen levels in tissues [38]. Phenolic compounds in apple and blueberry tissues have
215 been reported to be relatively stable during cold storage under controlled atmospheres
216 enriched with CO₂. This behavior may be associated with the absence of oxidative
217 reactions by reactive oxygen species [39-40].

218 **3.4. Weight loss and changes in firmness**

219 Coatings adversely affected the weight loss and firmness of raspberries (Fig. 1C and
220 D). Fresh weight loss for uncoated fruits was about 3.76±0.14% at day 8, while coatings
221 resulted in significantly higher losses (p<0.05), reaching 7.33±0.55% and 7.46±0.26%
222 for ACLS and WCS, respectively. The primary mechanism of water loss in coated fruits
223 takes place by water vapor diffusion from the cuticle [19] and then through the coating
224 structure. However, modified amylopectin films added with beeswax have shown

225 reduced water vapor permeability [10] which suggests that weight loss increase is
226 driven by epidermis damage. On the other hand, firmness decrease was sharper in fruit
227 coated with ACLS formulation (Fig. 1D), which leads us to assume that the natural
228 softening process of raspberry appears to be triggered by coatings. Thus, the increase
229 in weight loss and reduction of firmness may be attributed to two reasons: (1) internal
230 tissue damage due to reduction of endogenous oxygen leading to production of
231 fermentative substances like alcohols [41]; and (2) excessive hydration of the epidermis
232 caused by the coatings [5]. Weight losses of uncoated raspberries agrees with the
233 results of Haffner *et al.* [4], who indicated that weight loss is not a limiting parameter of
234 raspberry shelf-life. However, in this work it was useful to compare adverse effects
235 caused by coatings.

236 **3.5. Surface color development**

237 Chroma of uncoated raspberries increased while for coated fruits this value showed a
238 little reduction. Changes in *Hue*^o followed a slight decrease for all treatments (Table 2).
239 Delayed changes in color intensity of coated raspberries may be attributed to a slowed
240 ripening process where no anthocyanins production is carried out or its degradation
241 reactions are impaired, since these compounds are the main color contributing
242 pigments [5]. Chroma increase of uncoated raspberries is normal during ripening. This
243 may be attributed to anthocyanin synthesis and its involvement in further co-
244 pigmentation reactions with phenolic compounds which may also contribute with color
245 due to enzymatic browning [5, 42]. Visual acceptance of raspberries may be affected by
246 increase in redness and darkness because consumers associate these changes with
247 overripe fruit [43-44].

248 **4. Conclusions**

249 Waxy corn starch and acetylated corn starch based coatings may retard the ripening
250 process by controlling respiration rate and ethylene production. Additionally, these
251 changes permitted the preservation of quality attributes such as visual appearance
252 without affecting antioxidants related compounds. However, coatings promoted adverse
253 changes in firmness, fresh weight loss and off-flavor compounds production associated
254 with tissue damage. Reduction in terpenes production, increase in alcohols and
255 phenols, and absence of anthocyanins degradation suggests accumulation of CO₂ and
256 a probable decrease of O₂ in fruit tissues. We are at present conducting experiments
257 increasing content of beeswax in the formulation and reducing modified starches
258 concentration to avoid stomata occlusion to avoid hypoxic conditions.

259

260 **Acknowledgements**

261 We appreciate the help of Valerie Lynch of the Franceschi Microscopy & Image center of
262 WSU for the SEM examination of samples and the help of Mr. Frank Younce of the pilot
263 plant of the Food Science department of WSU. We are also grateful to CONACyT for
264 PhD grant to APG, and financial support for project No. 166751.

265 The authors have no conflict of interest to declare.

266

267

268 **References.**

269 [1] Park, H. J., Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends Food Sci.*
270 *Tech.* 1999, 10, 254-260.

- 271 [2] Ribeiro, C., Vicente, A. A., Teixeira, J. A., Miranda, C., Optimization of edible coating
272 composition to retard strawberry fruit senescence. *Postharvest Biol. Tec.* 2007, 44, 63-
273 70.
- 274 [3] Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Valle, V. D., Velez, D., Gavara, R., Effect of
275 chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry
276 (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chem.* 2008, 110, 428-
277 435.
- 278 [4] Haffner, K., Rosenfeld, H. J., Skrede, G., Wang, L., Quality of red raspberry *Rubus*
279 *idaeus* L. cultivars after storage in controlled and normal atmospheres. *Postharvest Biol.*
280 *Tec.* 2002, 24, 279-289.
- 281 [5] Han, C., Zhao, Y., Leonard, S. W., Traber, M. G., Edible coatings to improve
282 storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x*
283 *ananassa*) and raspberries (*Rubus idaeus*). *Postharvest Biol. Tec.* 2004, 33, 67-78.
- 284 [6] Fonseca, S. C., Oliveira, F. A. R., Brecht, J. K., Modelling respiration rate of fresh
285 fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. *J Food Eng.* 2002,
286 52, 99-119.
- 287 [7] Dole, P., Joly, C., Espuche, E., Alric, I., Gontard, N., Gas transport properties of
288 starch based films. *Carbohydr. Polym.* 2004, 58, 335-343.
- 289 [8] Rindlav-Westling, A., Stading, M., Hermansson, A. M., Gatenholm, P., Structure,
290 mechanical and barrier properties of amylose and amylopectin films. *Carbohydr. Polym.*
291 1998, 36, 217-224.
- 292 [9] Bertuzzi, M. A., Armada, M., Gottifredi, J. C., Physicochemical characterization of
293 starch based films. *J. Food Eng.* 2007, 82, 17-25.

- 294 [10] Pérez-Gallardo, A., Bello-Pérez, L. A., García-Almendárez, B., Montejano-Gaitán,
295 G., *et al.*, Effect of structural characteristics of modified waxy corn starches on
296 rheological properties, film-forming solutions, and on water vapor permeability,
297 solubility, and opacity of films. *Starch - Stärke* 2012, 64, 27-36.
- 298 [11] Hagenmaier, R. D., Baker, R. A., Wax microemulsions and emulsions as citrus
299 coatings. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 899-902.
- 300 [12] Patterson, M. E., Apel, G. W., A computer operated controlled atmosphere
301 research facility. *HortScience* 1984, 19, 551.
- 302 [13] Yang, X., Peppard, T., Solid-phase microextraction for flavor analysis. *J. Agric.*
303 *Food Chem.* 1994, 42, 1925-1930.
- 304 [14] Birla, S. L., Wang, S., Tang, J., Fellman, J. K., *et al.*, Quality of oranges as
305 influenced by potential radio frequency heat treatments against Mediterranean fruit flies.
306 *Postharvest Biol. Tec.* 2005, 38, 66-79.
- 307 [15] Singleton, V. L., Rossi, J. A., Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-
308 phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.* 1965, 16, 144-158.
- 309 [16] Dewanto, V., Wu, X., Adom, K. K., Liu, R. H., Thermal processing enhances the
310 nutritional value of tomatoes by Increasing total antioxidant activity. *J. Agric. Food*
311 *Chem.* 2002, 50, 3010-3014.
- 312 [17] Giusti, M. M., Wrolstad, R. E., *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John
313 Wiley & Sons, 2001, pp. F1.2.2-F1.2.13.
- 314 [18] McGuire, R. G., Reporting of objective color measurements. *HortScience* 1992, 27,
315 1254-1255.

- 316 [19] Amarante, C., Banks, N. H., in Janick, J. (Ed.), *Horticultural Reviews* vol. 26, John
317 Wiley & Sons, Hoboken 2010, pp. 161-238.
- 318 [20] Wang, C. Y., Maintaining postharvest quality of raspberries with natural volatile
319 compounds. *Int. J. Food Sci. Tech.* 2003, 38, 869-875.
- 320 [21] Kader, A. A., A summary of CA requirements and recommendation for fruits other
321 than apples and pears. *Acta Hort. (ISHS)*. 2003, 600, 737-740.
- 322 [22] Banks, N. H., Internal atmosphere modification in Pro-long coated apples. *Acta*
323 *Hort. (ISHS)*. 1985, 157, 105-112.
- 324 [23] Banks, N. H., Some effects of TAL Pro-long coating on ripening bananas. *J. Exp.*
325 *Bot.* 1984, 35, 127-137.
- 326 [24] Kittur, F. K., Saroja, N. S., Habibunnisa, H., Tharanathan, R. T., Polysaccharide-
327 based composite coating formulations for shelf-life extension of fresh banana and
328 mango. *Eur. Food Res. Technol.* 2001, 213, 306-311.
- 329 [25] Thommohaway, C., Kanlayanarat, S., Uthairatanakij, A., Jitareerat, P., Quality of
330 fresh-cut guava (*Psidium guajava*) as affected by chitosan treatment. *Acta Hort. (ISHS)*.
331 2007, 746, 449-454.
- 332 [26] Perkins-Veazie, P., Clark, J. R., Huber, D. J., Baldwin, E. A., Ripening physiology in
333 'Navaho' thornless blackberries: color, respiration, ethylene production, softening, and
334 compositional changes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 2000, 125, 357-363.
- 335 [27] Aguayo, E., Jansasithorn, R., Kader, A. A., Combined effects of 1-
336 methylcyclopropene, calcium chloride dip, and/or atmospheric modification on quality
337 changes in fresh-cut strawberries. *Postharvest Biol. Tec.* 2006, 40, 269-278.

338 [28] Pelayo, C., Ebeler, S. E., Kader, A. A., Postharvest life and flavor quality of three
339 strawberry cultivars kept at 5 °C in air or air +20 kPa CO₂. *Postharvest Biol. Tec.* 2003,
340 27, 171-183.

341 [29] Allende, A., Marín, A., Buendía, B., Tomás-Barberán, F., Gil, M. I., Impact of
342 combined postharvest treatments (UV-C light, gaseous O₃, superatmospheric O₂ and
343 high CO₂) on health promoting compounds and shelf-life of strawberries. *Postharvest*
344 *Biol. Tec.* 2007, 46, 201-211.

345 [30] Petracek, P. D., Joles, D. W., Shirazi, A., Cameron, A. C., Modified atmosphere
346 packaging of sweet cherry (*Prunus avium* L., cv. 'Sams') fruit: metabolic responses to
347 oxygen, carbon dioxide, and temperature. *Postharvest Biol. Tec.* 2002, 24, 259-270.

348 [31] Van der Steen, C., Jacxsens, L., Devlieghere, F., Debevere, J., Combining high
349 oxygen atmospheres with low oxygen modified atmosphere packaging to improve the
350 keeping quality of strawberries and raspberries. *Postharvest Biol. Tec.* 2002, 26, 49-58.

351 [32] Blanch, G. P., Flores, G., Ruiz del Castillo, M. L., Influence of methyl jasmonate in
352 conjunction with ethanol on the formation of volatile compounds in berries belonging to
353 the Rosaceae. *Postharvest Biol. Tec.* 2011, 62, 168-178.

354 [33] Malowicki, S. M. M., Martin, R., Qian, M. C., Volatile composition in raspberry
355 cultivars grown in the Pacific northwest determined by stir bar sorptive extraction-gas
356 chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 4128-4133.

357 [34] DeFilippi, B. G., Manríquez, D., Luengwilai, K., González-Agüero, M., in: Kader, J. -
358 C., Delseny, M. (Eds.), *Advances in Botanical Research* Vol. 56, Academic Press, San
359 Diego 2010, pp. 1-37.

360 [35] Harb, J., Bisharat, R., Streif, J., Changes in volatile constituents of blackcurrants
361 (*Ribes nigrum* L. cv. 'Titania') following controlled atmosphere storage. *Postharvest Biol.*
362 *Tec.* 2008, 47, 271-279.

363 [36] Romero, I., Sanchez-Ballesta, M. T., Maldonado, R., Escribano, M. I., Merodio, C.,
364 Anthocyanin, antioxidant activity and stress-induced gene expression in high CO₂-
365 treated table grapes stored at low temperature. *J. Plant Physiol.* 2008, 165, 522-530.

366 [37] Perkins-Veazie, P., Collins, J. K., Quality of erect-type blackberry fruit after short
367 intervals of controlled atmosphere storage. *Postharvest Biol. Tec.* 2002, 25, 235-239.

368 [38] Zheng, Y., Wang, S. Y., Wang, C. Y., Zheng, W., Changes in strawberry phenolics,
369 anthocyanins, and antioxidant capacity in response to high oxygen treatments. *LWT -*
370 *Food Sci. Technol.* 2007, 40, 49-57.

371 [39] Fawbush, F., Nock, J. F., Watkins, C. B., Antioxidant contents and activity of 1-
372 methylcyclopropene (1-MCP)-treated 'Empire' apples in air and controlled atmosphere
373 storage. *Postharvest Biol. Tec.* 2009, 52, 30-37.

374 [40] Chiabrando, V., Giacalone, G., Shelf-life extension of highbush blueberry using 1-
375 methylcyclopropene stored under air and controlled atmosphere. *Food Chem.* 2011,
376 126, 1812-1816.

377 [41] Smith, R. B., Skog, L. J., Enhancement and loss firmness in strawberries stored in
378 atmospheres enriched with carbon dioxide. *Acta Hort. (ISHS)*. 1993, 348, 328-333.

379 [42] Vicente, A. R., Ortugno, C., Powell, A. L. T., Greve, L. C., Labavitch, J. M.,
380 Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of
381 Raspberry (*Rubus idaeus*). *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 4119-4124.

382 [43] Krüger, E., Dietrich, H., Schöppl, E., Rasim, S., Kürbel, P., Cultivar, storage
383 conditions and ripening effects on physical and chemical qualities of red raspberry fruit.
384 *Postharvest Biol. Tec.* 2011, 60, 31-37.

385 [44] Gonçalves, B., Silva, A. P., Moutinho-Pereira, J., Bacelar, E., *et al.*, Effect of
386 ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in
387 cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chem.* 2007, 103, 976-984.

388

389 CAPTIONS TO FIGURES

390

391 **Figure 1.** Physicochemical analyses and respiration rate of ripe coated raspberries
392 during cold storage at 4 °C and 88% RH. (A) Respiration rate; (B) Ethylene production;
393 (C) Weight loss; (D) Firmness. ACLS = acetylated cross-linked starch; WCS = waxy
394 corn starch.

395

396 **Figure 2.** Micrographs of uncoated and coated raspberries. A and B, uncoated
397 raspberry surface showing open stomata; C and D, surface of coated raspberry with
398 ACLS composite coating showing a continuous but porous structure formed by
399 aggregation of swollen granules and wax particles.

400

401 **Figure 3.** Volatile content in uncoated and coated raspberries during cold storage at
402 4°C and 88% RH.

403

404

Table 1. Volatiles detected (ng ml⁻¹) in uncoated and coated raspberries during cold storage at 4 °C and 88% RH.

		Treatment			
		Uncoated day 0	Uncoated day 8	ACLS day 8	WCS day 8
Esters	Ethyl acetate	11,357.6±607.4	7,606.2±2683.0	51,421.7±606.7	50,647.5±10522.3
	Propyl acetate	636.9±168.0	2,422.8±2965.9	1,550.1±722.4	705.0±235.4
	Butyl acetate	23.7±2.3	75.8±24.2	79.9±4.1	61.0±9.3
	2-methyl propyl acetate	6.7±1.6	123.1±43.3	99.1±4.2	58.5±7.5
	Ethyl hexanoate	0.3±0.0	ND	ND	ND
Alcohols	Ethanol	584.9±193.9	166.5±95.8	2,231.0±575.9	2,095.6±601.3
	1,2-Propanediol	0.0±0.0	ND	1172.8±477.3	460.4±123.5
	z-3-Hexen-1-ol	149.2±15.9	161.5±42.2	100.2±12.5	53.9±8.6
	1-Hexanol	7.4±1.0	19.3±5.2	12.3±2.5	12.0±1.9
	2-Heptanol	88.0±8.5	241.8±90.1	105.0±13.5	106.4±27.3
	6-methyl-5-hepten-2-ol	5.6±0.8	18.9±8.5	8.3±0.3	9.0±2.6
	Linalool	6.0±1.0	895.0±277.1	163.7±26.4	178.6±19.9
	L-4-terpineol	0.9±0.0	10.4±3.5	ND	4.9±1.2
	Trans-geraniol	5.2±0.5	67.0±39.1	22.4±7.1	14.6±3.8
	Ionol-2	27.6±21.2	122.6±65.7	89.9±57.7	134.6±116.6
Aldehydes	3-methyl butanal	ND	ND	146.8±0.0	ND
	2-pentanal	ND	ND	191.1±20.4	96.0±12.9
	cis-3-hexanal	820.0±37.3	260.2±92.6	240.8±18.2	160.6±52.3
	Hexanal	2,619.2±137.6	4,285.2±1037.5	3,044.1±143.5	2,971.4±383.3
	E-2-Hexanal	152.8±12.1	101.6±21.8	88.4±5.5	76.5±12.6
	Nonanal	1.5±0.9	ND	ND	5.0±0.0
Ketones	2-Heptanone	3.4±0.3	12.4±2.5	29.8±3.2	40.2±6.7
	1-2-Furanyl ethanone	ND	2.0±0.0	ND	2.6±0.0
	2-Nonanone	0.0±0.0	11.0±4.2	5.3±0.6	9.4±1.3
Terpenes	α-Pinene	ND	ND	ND	24.7±0.0
	Sabinene	5.4±0.9	16.0±1.3	24.6±0.0	17.2±1.2
	2-β-Pinene	ND	20.7±4.2	ND	ND
	1,8-Cineole	27.0±0.8	63.9±8.0	84.2±21.4	55.9±13.6
	L-Limonene	0.0±0.0	57.9±0.0	0.0±0.0	71.8±7.3
	Trans-β-ionone	17.3±1.8	28.9±8.8	21.3±3.2	21.1±1.1
	α-Ionone	42.1±2.7	70.1±25.4	36.4±6.5	30.9±4.9
	Trans-caryophyllene	2.7±0.6	ND	ND	ND
β-Ionone	22.1±1.6	70.2±27.6	31.3±6.0	28.2±5.3	

Values reported as the mean ± standard deviation. ND = Not detected. ACLS = acetylated cross-liked starch;

WCS = waxy corn starch.

Table 2. Differences in evolution of color parameters ($L^*a^*b^*$), anthocyanins and total phenols of coated and uncoated raspberries during cold storage at 4 °C and 88% RH.

	Time (days)				
	0	2	4	6	8
ACLS coating					
L^*	31.14±3.25 a	29.51±2.78 a	30.49±3.19 a	31.31±2.28 a	29.69±3.58 a
a^*	26.13±4.34 a	23.09±3.48 a	25.08±3.08 a	25.82±2.35 a	25.17±2.93 a
b^*	11.69±3.16 a	8.69±2.02 b	10.08±1.50 ab	10.22±1.39 ab	9.20±2.00 b
<i>Chroma</i>	28.65±5.24 a	24.69±3.94 b	27.04±3.32 ab	27.78±2.60 ab	26.82±3.37 ab
<i>Hue</i> [°]	23.79±2.19 a	20.41±1.91 b	21.89±1.75 ab	21.55±1.71 b	19.95±2.28 b
Phenols [mg GAE (g FW) ⁻¹]	36.72±2.78 c	61.40±2.48 a	59.28±1.54 a	48.66±3.49 b	50.36±0.38 b
Anthocyanins [mg cyd-3-glu (100 g FW) ⁻¹]	14.10±0.65 d	26.21±0.52 b	24.23±0.72 c	30.01±0.51 c	24.35±0.26 a
WCS coating					
L^*	31.96±2.15 ab	29.29±3.08 b	32.49±3.37 a	31.53±2.67 ab	29.50±3.17 b
a^*	25.79±3.28 ab	27.42±2.85 a	25.35±2.52 ab	25.46±2.17 ab	24.45±2.25 b
b^*	11.11±2.54 ab	12.50±2.12 a	10.35±1.62 b	9.95±1.81 b	9.18±1.29 b
<i>Chroma</i>	28.10±3.99 ab	30.14±3.45 a	27.40±2.83 ab	27.35±2.65 ab	26.13±2.48 b
<i>Hue</i> [°]	23.10±2.11 ab	24.38±1.53 a	22.13±2.03 bc	21.19±2.08 bc	20.52±1.65 c
Phenols [mg GAE (g FW) ⁻¹]	50.65±1.08 a	52.70±0.57 a	56.63±8.03 a	51.38±0.43 a	46.55±3.14 a
Anthocyanins [mg cyd-3-glu (100 g FW) ⁻¹]	18.94±0.40 c	22.43±0.15 b	22.57±1.00 b	23.01±1.83 b	27.46±0.31 a
Uncoated					
L^*	33.33±2.54 a	33.80±2.04 a	33.96±2.58 a	32.95±2.27 a	31.70±2.48 a
a^*	26.33±3.71 a	25.02±1.66 a	24.52±1.82 a	24.00±2.60 a	24.33±2.21 a
b^*	11.61±2.45 a	10.09±1.31 ab	9.85±1.16 b	9.36±1.41 b	9.95±0.96 b
<i>Chroma</i>	28.79±4.31 b	42.08±2.04 a	41.91±2.76 a	40.79±3.08 a	39.99±2.92 a
<i>Hue</i> [°]	23.61±2.26 a	21.91±1.88 ab	21.85±1.52 ab	21.27±1.80 b	22.29±2.00 ab
Phenols [mg GAE (g FW) ⁻¹]	48.81±1.50 bc	52.64±6.56 b	63.55±3.60 a	42.64±1.11 c	44.41±3.10 bc
Anthocyanins [mg cyd-3-glu (100 g FW) ⁻¹]	19.21±0.10 c	20.41±0.22 c	21.34±0.13 bc	24.01±0.62 ab	26.78±2.30 a

Different letters indicate differences at ($p>0.05$). Data comparisons are presented along storage time not among treatments. Values reported are mean ± standard deviation. GAE= gallic acid equivalents, cyd-3-glu = equivalents of cyaniding-3-glucoside. FW = fresh weight. ACLS = acetylated cross-linked starch; WCS = waxy corn starch; FW = fresh weight.

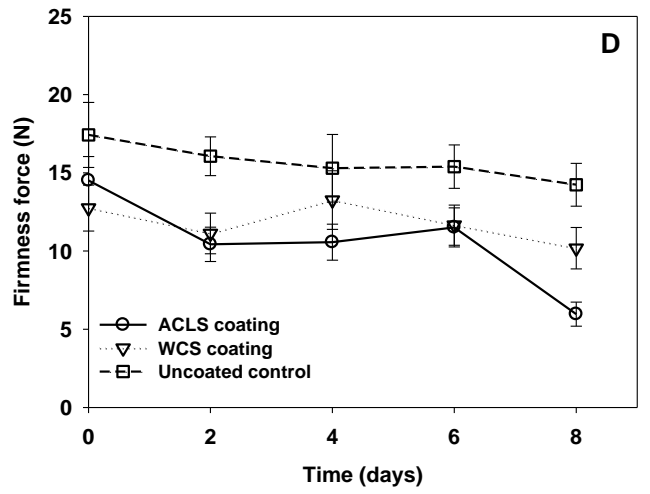
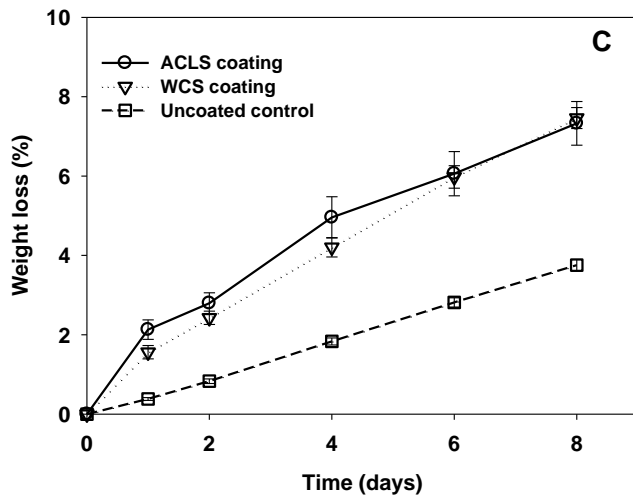
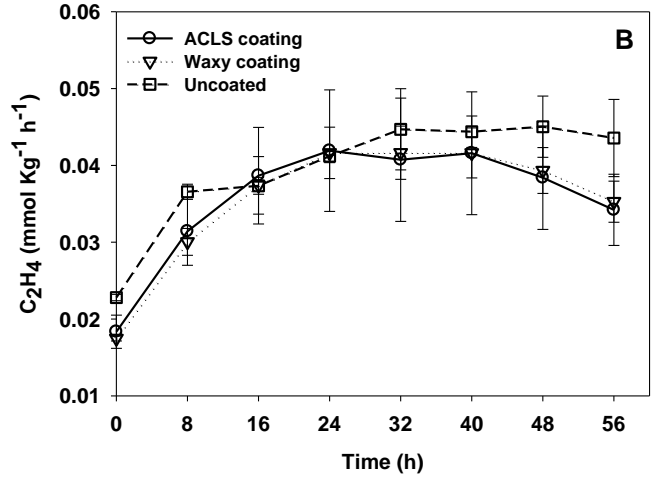
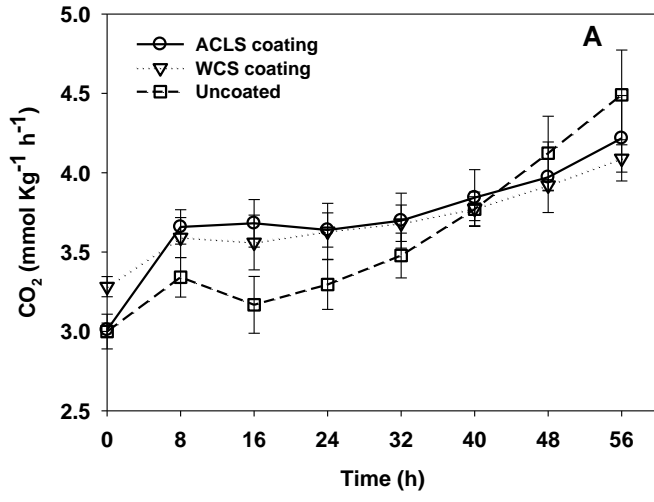


Figure 1

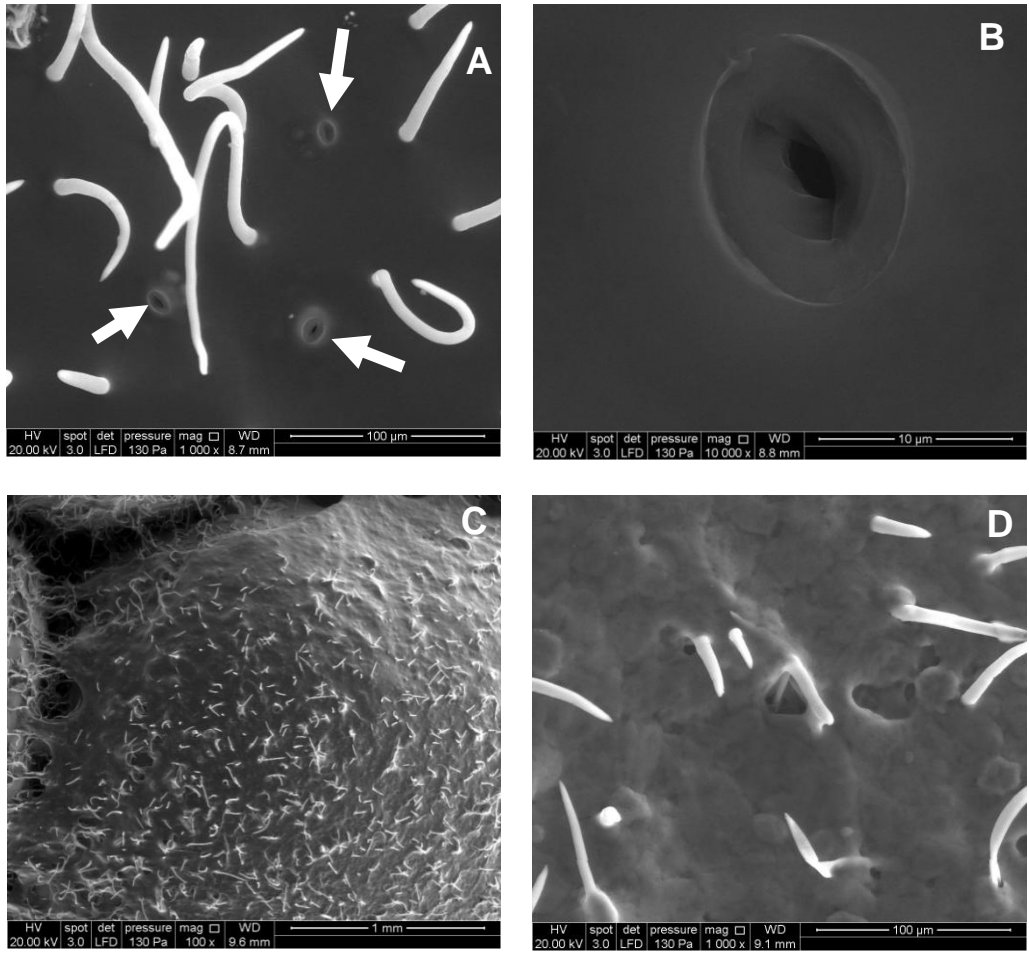


Figure 2

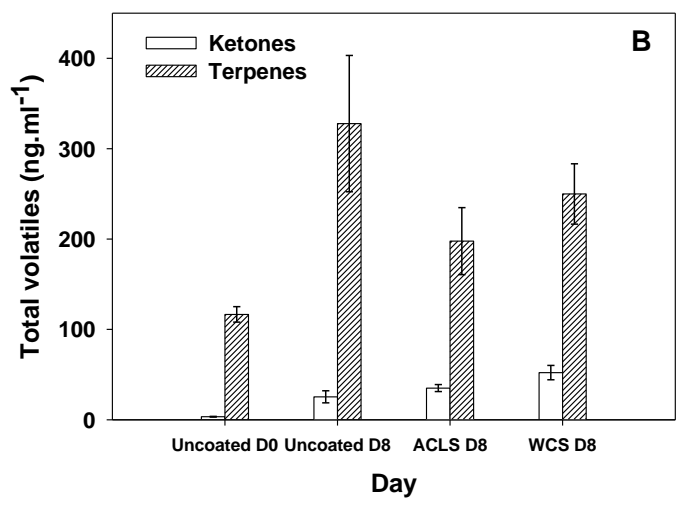
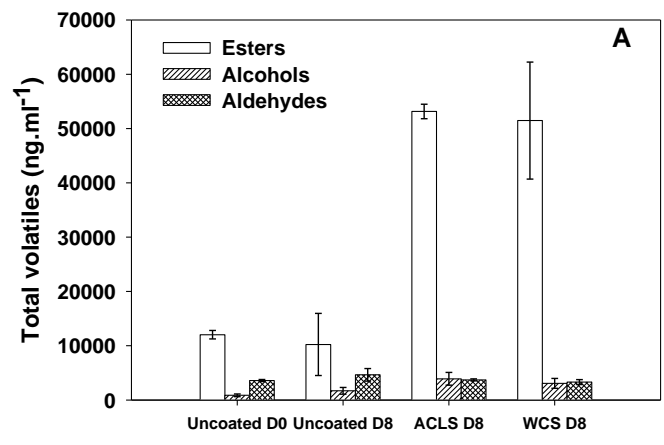


Figure 3

6. Conclusiones generales

Las propiedades de las soluciones de recubrimiento elaboradas con almidones cerosos, se correlacionan con la habilidad de las moléculas de amilopectina que los constituyen, para reasociarse después de un cizallamiento. El proceso de estructuración depende principalmente del tamaño molecular y del tamaño de las cadenas A y B1. Sin embargo, la introducción de grupos funcionales o inclusión de aditivos como sorbitol o lípidos pueden interactuar con dichos grupos ocasionando la promoción o entorpecimiento de dichas asociaciones. Los efectos de la estructuración de una solución filmogénica o de recubrimiento, se reflejan también en las propiedades de una película. Las películas elaboradas con almidón de maíz ceroso oxidado y almidón de maíz acetilado entrecruzado mostraron una permeabilidad al vapor de agua, espesor y solubilidad adecuada para producir recubrimientos resistentes a la humedad, transparentes, delgados y con un buen desempeño durante su aplicación. Por otro lado, el almidón de maíz ceroso también mostró un buen desempeño en cuando a las películas pero un pobre desempeño en forma de solución filmogénica. La ventaja de almidón de maíz ceroso es que al ser no-modificado puede ser aceptado de mejor manera por los consumidores. Por otro lado, se encontró que los recubrimientos de almidón pueden retardar los procesos de maduración de las frambuesas debido a que controlan la producción de etileno y la tasa de respiración. Sin embargo, pueden inducir daños en los tejidos de la frambuesa debido a condiciones de hipoxia ocasionadas por su permeabilidad selectiva al CO_2 sobre el O_2 que favorece la acumulación de dióxido de carbono en el interior del tejido del fruto.

Santiago de Querétaro, 27 de Febrero de 2012

**H. CONSEJO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
FACULTAD DE QUÍMICA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
PRESENTE**

Por este conducto me permito solicitar a este Consejo su aprobación para iniciar el proceso de titulación del estudiante de Doctorado en Ciencia de los Alimentos **M. C. Alfonso Pérez Gallardo**, con No. de Expediente **149443**. Esto en base a la publicación de dos artículos en revistas indexadas, que a continuación se describen:

Pérez-Gallardo, A., Bello-Pérez, L. A., García-Almendárez, B., Montejano-Gaitán, G., Barbosa-Cánovas, G., & Regalado, C. (2012). Effect of structural characteristics of modified waxy corn starches on rheological properties, film-forming solutions, and on water vapor permeability, solubility, and opacity of films. *Starch - Stärke*, 64(1), 27-36. DOI 10.1002/star.201100042. ISSN 1521-379X.

Pérez-Gallardo, Alfonso, Mattinson, Scott D., Lazcano-Peralta, Alma, Fellman, John K., Barbosa-Cánovas, Gustavo, García-Almendárez, Blanca, Regalado, Carlos. Effect of native and acetylated-crosslinked waxy corn starch-beeswax coatings on quality attributes of raspberries during storage. *Starch - Stärke*, En prensa.

Dichos artículos respaldan el tema de su tesis doctoral.
Sin otro particular, quedo de ustedes.

Atentamente,
Dr. Carlos Regalado González



*Se anexa el correo de aceptación de la segunda publicación por parte del editor de la revista

WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaa, Boschstraße 12, 69469 Weinheim, Germany

Alfonso Pérez-Gallardo
DIPA, PROPAC, Facultad de Química.
Universidad Autónoma de Querétaro,
C.U., Cerro de las Campanas s/n, Col. Las
Campanas, Querétaro, 76010 Qro.,
México

Ihre Zeichen/Your reference

Unsere Zeichen/Our reference
CM/HJK

TEL
+49-6201-606-380

FAX
+49-6201-606-525

E-MAIL
cmayer@wiley.com/
starch@wiley.com

Datum/Date
07.03.2012

Formal letter of acceptance for publication
star.201200005

To whom it may concern:

This is to confirm that the manuscript

**“Effect of native and acetylated-crosslinked waxy corn
starch-beeswax coatings on quality attributes of raspberries
during storage”**

was accepted for publication in our journal Starch/Stärke on February 16th, 2012.
This manuscript is planned to be published in issue 07/2012, online publication is due
shortly. The DOI for online access will be 10.1002/star.201200005.

With kind regards,



Dr. Christine Mayer
Starch/Stärke
Editorial Office