



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA (PROPAC)**

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS
NANOPARTÍCULADOS CON INGREDIENTES ALIMENTICIOS
COMO VECTORES PARA INCREMENTAR LA VIDA ÚTIL DE
ALIMENTOS.**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Presenta:

María de la Luz Zambrano Zaragoza

Dirigido por:

Dr. Edmundo Mercado Silva

Dr. David Quintanar Guerrero

Santiago de Querétaro, Qro., Enero 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL
CENTRO DE LA REPÚBLICA**

**DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE SISTEMAS NANOPARTICULADOS CON
INGREDIENTES ALIMENTICIOS COMO VECTORES PARA INCREMENTAR LA VIDA ÚTIL DE
ALIMENTOS**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias de los Alimentos

Presenta: María de la Luz Zambrano Zaragoza

Dirigido por:

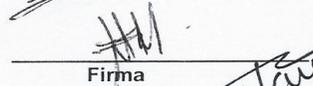
Asesor: Dr. Edmundo Mercado Silva

Co-Asesor: Dr. David Quintanar Guerrero

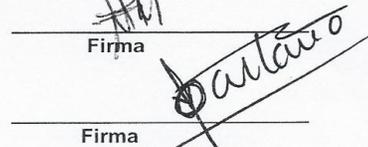
**Dr. Edmundo Mercado Silva
Presidente**


Firma

**Dr. David Quintanar Guerrero
Secretario**


Firma

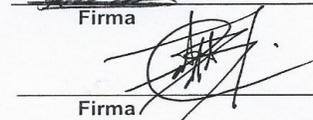
**Dr. Víctor Castaño Meneses
Vocal**


Firma

**Dra. Sandra Olimpia Mendoza Díaz
Suplente**


Firma

**Dr. Eduardo Castaño Tostado
Suplente**


Firma


**MSP Sergio Pacheco Hernández
Director de la Facultad de Química**


**Dr. Irineo Torres Pacheco
Director de Investigación y Posgrado**

Centro Universitario
Santiago de Querétaro, Qro.
Enero 2013
México

RESUMEN

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue investigar como incrementar la vida útil de fruta entera y cortada mediante el desarrollo de dispersiones a nivel nanométrico (nanocápsulas y nanopartículas lipídicas sólidas) con ingredientes aceptados para su uso en alimentos como modificadores de sistemas barrera convencionales y activos. Los sistemas de talla submicrónica se evaluaron en dos etapas, aplicados en manzana fresca cortada y guayaba entera, tomados como modelos con la finalidad de evaluar las posibilidades de las nanopartículas aplicadas como recubrimiento en la conservación de frutas. En la etapa 1, se prepararon nanocápsulas por el método de emulsificación-difusión, obteniéndose las condiciones óptimas para la preparación: 200 mg de polímero (poly- ϵ -caprolactona), 5 % de estabilizante (alcohol polivinílico), y velocidad de agitación de 4,000 rpms. Los sistemas estudiados fueron goma xantana, solución, nanocápsulas, nanoemulsión y emulsión con α -tocoferol. Los recubrimientos fueron preparados con 0.3 % de goma xantana y 2 g/L de dl- α -tocoferol. Se evaluó la efectividad de los sistemas en la conservación de manzana fresca cortada en relación a las variables que inducen el oscurecimiento del fruto y cambios fisicoquímicos. Los sistemas fueron estables por ocho semanas. Los tamaños de partícula promedio fueron de 300 nm y potencial zeta de -45 mV lo que indica que los sistemas fueron estables. Los sistemas de talla submicrónica fueron los más efectivos en el control del oscurecimiento, las nanocápsulas tuvieron un mejor control del índice de oscurecimiento de 34 con respecto a un inicial de 26, seguido por nanoemulsión 41 y nanoesferas de 43. Fue posible además corroborar que las nanocápsulas presentaron la menor actividad polifenoloxidasas (1038 U/mL), mínimas variaciones en el contenido de fenoles totales (430 mg EAg/g de muestra) y poca variación en la actividad fenilalaninamonio liasa (2.88 μ mol/g h). Las micrografías pusieron en evidencia la presencia de entidades capsulares distribuidas homogéneamente en el producto. En la etapa 2 se prepararon nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) a partir de lípidos sólidos (cera de candeuba), se aplicaron a guayaba entera que fue almacenada en refrigeración a 8°C. Las NLS se incorporaron en un recubrimiento con base en goma xantana (0.4 %), para estudiar su efecto sobre la vida útil. Los recubrimientos contenían de 6 a 8 % de una dispersión de 10 % de cera de candeuba en las NLS. Mediante microscopía electrónica, se logró evidenciar que a concentraciones por encima de 75 % de NLS se provoca a la falta de oxígeno, lo que desarrollo daño fisiológico. Demostrándose que las concentraciones que favorecen la conservación del fruto hasta por cinco semanas fueron con 60 y 65 % de nanopartículas lipídicas sólidas. Además se logró establecer que la utilización de nanocápsulas y nanopartículas lipídicas sólidas contribuyen a incrementar la vida útil de los frutos estudiados y que además tienen una mejor funcionalidad que los sistemas convencionales empleados comercialmente.

Palabras clave: Manzana, Guayaba, Nanocápsulas, Nanopartículas lipídicas sólidas, Recubrimientos.

SUMMARY

The main goal of this doctoral thesis was to develop nano-scale dispersions (solid lipid nanoparticles and nanocapsules) from acceptable food ingredients as modifiers of conventional barrier systems and active additives to increase the shelf-life on whole and fresh-cut fruit. Submicron size systems were evaluated on the surface of fresh-cut apple and whole guava; these fruits were used as fruit models to evaluate the potential effect of nanoparticles in conventional coatings on the preservation of fruit. In a first step, nanocapsules were prepared by emulsification-diffusion method, obtaining the optimal conditions of preparation: 200 mg of polymer (e. g. poly- ϵ -caprolactone), 5% of stabilizer (e. g. polyvinyl alcohol) and agitation rate of 4.000 rpm. The systems studied were: xanthan gum, "solution", nanocapsules, nanoemulsion and emulsion all with 2 g/L of dl- α -tocopherol (antioxidant agent). Coatings were prepared with 0.3 % of xanthan gum and 0.5 % propylenglycol. The systems effectiveness was evaluated in fresh-cut apples conservation. The stability of the systems was above eight weeks. The particle size was of 300 nm and zeta potential -45 mV suggesting high dispersion stability. Submicron size systems were the most effective to control the browning. Nanocapsules had the best browning index control with a value of 34 with respect to an initial condition of 26, followed by nanospheres with browning index of 41 and nanoemulsion with browning index of 43. It was also possible to confirm that the nanocapsules had the lowest polyphenol oxidase activity (1038 U/mL), negligible variation in total phenol content during storage time (430 mg EAG/g sample), and unchanged in phenilalaninamomie lyase activity (2.88 μ mol/g h). The micrographs showed the presence of capsular entities homogeneously distributed in the product. In a second step, solid lipid nanoparticles were prepared from acceptable solid lipids (e. g. candeuba wax), they were incorporated in a coating based on xanthan gum (0.4 %) in order to study its effect on the fruit shelf-life. Coatings containing between 60 to 80 % of a dispersion of 10 % candeuba wax of nanoparticles were applied on guava whole stored at refrigeration (8°C). Scanning electron microscopy confirmed that concentrations higher of 75 % of nanoparticles produced physiological damage due apparently to the lack of oxygen. Concentrations that improve guava preservation for five weeks were 60 and 65 % of lipid solid nanoparticles. It was possible to further provide that the use of solid lipid nanoparticles and nanocapsules help to increase the shelf-life of the fruits studied and also have better functionality than conventional commercial systems.

Keywords: Apple, Guava, Nanocapsules, Solid lipid nanoparticles, Coatings.

DEDICATORIAS

Este trabajo esta dedicado a esa mezcla genética que hizo posible mi existir, pensamiento y sentimiento, a esa pequeña semilla que fue sembrada en mi primera infancia y que ha sido la luz que ha alumbrado mi camino, al entorno que hizo la diferencia y a la vida que nos hace trascender en el espacio de tiempo, por ser un continuo en la humanidad que intenta ser superior a cualquier error de transcripción genética...

A mis hijos David Ybraim y Sebastian, quienes han sido pacientes observadores en este trayecto de vida, me han apoyado, tranquilizado y sonreído cuando más lo he necesitado, por su abrazo calido, por sus besos tiernos y su gran fortaleza... gracias por su tiempo, por ayudarme a enfrentar el mejor y más difícil reto de la vida, el de ser madre, por quererme y aceptar que no tuvieron una madre normal!

A David, mi compañero de vida, que escucha mis filosofías y que día día intenta entenderme sin lograrlo y como hacerlo....IMPOSIBLE, si las cosas se fueron sucediendo de forma inesperada, sin planearlo y sin mayor futuro que el ahora.... te amo y te estoy amando, gracias por estar, por hacerme tan feliz, aunque la queja continua sea mi forma de expresarlo... Soy y estoy feliz de estar a tu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradezco al Dr. David Quintanar, por dirigirme con el mayor interés, por hacer posible este trabajo por mezclar sus conocimientos con los poco que hubiese yo adquirido para aplicar lo ya aprendido a la conservación de alimentos, por su paciencia en el aprendizaje de la tecnología, por sus consejos, revisiones y desconfianzas para que este trabajo llegará a su conclusión.

Al Dr. Edmundo Mercado Silva, le agradezco el haber aceptado ser mi director de tesis cuando el futuro se veía desolador, por su paciencia y también por esa gran capacidad para formar, por creer en sus alumnos, apoyarlos y tener esa gran vocación por la investigación, me ha enseñado que todo es un proceso que hay que digerir y enfrentar... muchas gracias.

Al Dr. Eduardo Castaño Tostado, por sus grandes consejos para que el trabajo fuese aplicable no importando el origen del fruto, por estar dispuesto a enseñarme un poco de lo tanto que sabe de estadística, por corregir algunos de mis grandes errores de concepto para la interpretación de resultados, por hacerme reflexionar y estar dispuesto a revisar el trabajo con un ángulo que siempre retroalimenta la investigación.

A la Dra. Sandra Olimpia Mendoza, agradezco su paciencia y cooperación con las mejoras para este trabajo, por su disposición y aportación en el análisis de resultados y sus efectos de los detalles que siempre se pasan por alto cuando se hace un trabajo experimental.

Al Dr. Victor Castaño, por sus aportaciones y apoyo desde el inicio de la investigación.

A Alfredo Álvarez Cárdenas y Jaime Flores, por compartir conmigo su experiencia, por su apoyo incondicional, por compartir los proyectos, porque juntos hemos aprendido el uno del otro y hemos hecho posible la formación de recursos humanos.

A mis amigas de locuras, discusiones, proyectos, sueños y pensamientos, Elsa, Angie y Alicia quienes escuchan con paciencia mis exposiciones y pusieron un poco de sus conocimientos, tiempo y trabajo para que este momento llegará y me encuentre aquí pensando en lo que viene.

A mis amigas de toda la vida Charo y Yadira, con la que me he llenado de filosofías, de sueños, con las que he visto la luna una y mil veces escuchando una canción o riendo a carcajadas, con las que pase las etapas trascendentales en la vida la adolescencia y primera Juventud, gracias por acompañarme desde entonces y hasta ahora.

A mis compañeros de aula, fiesta, clase, casa y ciudad, quienes un día decidieron emprender una vida lejos del terruño y que en su primera etapa compartieron conmigo, porque juntos aprendimos a practicar la tolerancia que ha hecho posible que aún después de transcurridos tantos años continuamos viéndonos con el tiempo suspendido en el último día. Gracias Cirilo, Martín, Juan Pasos, Trini, Leo y Bruno.

A mis alumnos, quienes han contribuido de alguna manera a mi formación quienes me han enseñado mucho más de lo que pudiesen creer, porque cada que les explico algo reaprendo y

modifico mis errores, a todos esos que llegaron cuando desarrollaba este trabajo y que formaron equipo conmigo a Alicia, Claudia Idalid, Valentín, Erika, Moises, Verónica, Arnaldo, Vicky, Marytony, Irene y Carmen, quienes están en mi pensamiento como una de mis más satisfactorias experiencias. Gracias por estar en el momento preciso.

Agradezco a Ricardo Reza, el más terco y afin alumno-profesor con quien he compartido esta última etapa, porque aprendas lo mejor de las personas y seas siempre superior a tu guía, porque solo así sabremos que trascendimos y evolucionamos.

A mi hermano Paco, gracias por creer en mí por darme fortaleza y por hacerme sentir en la distancia que somos una amalgama difícil de separar, que compartimos la misma raíz, que modificamos nuestra historia a pesar de la estadística.

A mi hermana Gely y mis sobrinos Alejandra (por muchos años mi sobrina preferida), Carlos y Eduardo, de quienes tengo mucho que aprender como ser alivianda porque disto mucho de ver la vida como la ven, por enseñarme a ser feliz y por ese 2 de noviembre de 2007 en que todo cambio.

A mi hermano Omar con quien me siento compaginada y de quien puedo algunas veces predecir que pensaré, porque si me veo en un espejo veo a ese niño que nunca fue y que siempre deseo ser, a ese adolescente que vi crecer en la distancia en la soledad y la incertidumbre, al profesionalista que admiro al Médico filósofo que solo la vida y su observación pudo enseñar que mucho de lo que como pacientes sentimos esta en el pensamiento. Gracias Omar por ser mi hermano, por ser mí igual con el que me entiendo.

A mi Madre Socorro Zaragoza, quien dio de acuerdo a sus enseñanzas y a lo que creyó mejor, se que fue y se preocupo porque estuviéramos bien, quien observó mi crecimiento impávida sin decir palabra, a esa madre que imagina mi pensamiento y que se estrella con la realidad. Gracias por estar ahí siempre, cuando te necesito y cuando me siento débil.

A mi Papá José Zambrano quien inculco sin querer y sin saber el resultado, ese gran deseo por saber, aprender e investigar, quien me enseñó el camino con el ejemplo, quien me hizo tanta falta en mi vida con quien desee compartir tantos sueños y pensamientos que quedaron en el tintero, que me apoyo para salir adelante y quien dejo su obra inconclusa para que solo la vida logrará darle forma a su manera. Gracias papá solo tu sabes y sabras tu historia.

A mis Sobrinos que conozco, quiero y siento Andrea Sofía y Leonardo a quienes por ser tan pequeñitos me dan tanta ternura y quienes desconozco porque aún están en formación.

A mi cuñada Iris, por ser la esposa, compañera y madre que acompaña los pensamientos de mi hermano, por hacerlo feliz.

ÍNDICE

SUMMARY	i
RESUMEN	ii
DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LA LITERATURA.....	4
2.1 Nanotecnología	4
2.1.1. Nanopartículas.....	5
2.1.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)	6
2.1.3. Métodos de preparación de Nanopartículas	7
2.1.3.1. <i>Emulsificación/evaporación</i>	7
2.1.3.2. <i>Homogeneización a alta presión</i>	8
2.1.3.3. <i>Técnica de microemulsión</i>	8
2.1.3.4. <i>Desplazamiento del disolvente en medio acuoso</i>	9
2.1.3.5. <i>Emulsificación-difusión</i>	9
2.1.4. Estabilidad de sistemas coloidales.	11
2.1.4.1. Distribución de tamaños de partícula.....	12
2.1.4.2. <i>Potencial zeta (ζ)</i>	13
2.2 Nanotecnología en Alimentos	14
2.3. Recubrimientos comestibles	16
2.4 Características fisicoquímicas de los frutos	17
2.5. Frutos frescos cortados.....	19
2.6. Cambios fisiológicos y bioquímicos en frutas frescas cortadas	20
2.6.1. Pérdida de agua	20
2.6.2. Cambios de textura.....	20
2.6.3. Acumulación de metabolitos secundarios y cambio de color.....	21
2.6.4. Actividad de la fenilalanin amonio-liasa	25
2.6.5. Riesgos y Regulación en Nanotecnología	26
III. JUSTIFICACIÓN	30
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. OBJETIVOS.....	32

5.1. Objetivo General	32
5.2. Objetivos Particulares	32
VI. METODOLOGÍA	33
6.1. Desarrollo Experimental.....	33
Etapa 1 Aplicación de Nanocápsulas	35
6.1. Optimización para preparación de nanocápsulas	35
6.1.1. Preparación de nanocápsulas	35
6.1.2. Diseño Experimental para nanocápsulas	36
6.1.3. Análisis Estadístico nanocápsulas.....	37
6.1.4. Optimización del modelo para nanocápsulas	38
6.1.5. Comprobación de repetibilidad lote a lote.....	38
6.2 Caracterización de nanocápsulas	38
6.2.1. Mediciones de tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI)	38
6.2.2. Potencial Zeta (ζ).....	39
6.2.3. Densidad de los sistemas de talla submicrónica (ρ_{np})	39
6.2.4. Microscopía electrónica de barrido	40
6.3 Desarrollo de dispersiones coloidales (recubrimientos)	41
6.3.1 Preparación de nanocápsulas con dl- α -tocoferol	41
6.3.2. Preparación de nanoesferas.....	42
6.3.3. Preparación de la emulsión	42
6.3.4. Preparación de la nanoemulsión	42
6.3.5 Preparación de la solución de α -tocoferol	43
6.4. Estabilidad de los sistemas coloidales	43
6.5. Aplicación de recubrimientos en manzana fresca cortada	43
6.5.1. Material Biológico	43
6.5.2. Tratamiento de manzanas frescas cortadas	43
6.6. Caracterización morfológica de los recubrimientos en manzana	45
6.7. Cambios físicos y químicos en manzana	45
6.7.1. Pérdida liquido drenado.....	45
6.7.2. Color	46
6.7.3. Textura	46
6.7.4. pH.....	47

6.7.5. Sólidos Solubles Totales (SST)	47
6.7.6. Acidez	47
6.8. Cambios enzimáticos y contenido de fenoles	47
6.8.1. Determinación de la actividad polifenoloxidasas (PFO)	47
6.8.2. Medición de fenoles totales	48
6.8.3. Determinación de la actividad Fenil-alanina-amonioliasa	49
6.9. Tratamiento estadístico para comparación de recubrimientos	49
Etapa 2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) en Guayaba	49
6.10. Preparación de NLS	50
6.10.1. Caracterización de Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)	50
6.10.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB) para NLS y guayaba ..	50
6.10.3. Estabilidad de las NLS	51
6.11 Desarrollo de recubrimientos de NLS	51
6.11.1. Evaluación del efecto de la concentración de NLS	51
6.12. Aplicación de recubrimientos con NLS en guayaba	52
6.12.1. Material Biológico	52
6.12.2. Aplicación del Recubrimiento con NLS	52
6.13. Cambios fisicoquímicos en guayaba con NLS	54
6.13.1. Pérdida de peso	54
6.13.2. Cambios químicos	54
6.13.3. Cambios de color	54
6.13.4. Cambios de Firmeza	55
6.14. Análisis estadístico para recubrimientos en guayaba	55
VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
Etapa 1. Resultados Nanocápsulas	56
7.1. Preparación y optimización de nanocápsulas	56
7.1.1. Ajuste del modelo	57
7.1.2. Tamaño de Partícula	58
7.1.3. Índice de polidispersión (PDI)	61
7.1.4. Potencial zeta (ζ)	63
7.1.5. Densidad (ρ_{nc})	65
7.1.6. Establecimiento de condiciones de preparación de nanocápsulas.	65
7.1.7. Morfología de Nanocápsulas	66

7.1.8. Verificación del modelo y versatilidad del método	67
7.2. Sistemas con α -tocoferol	68
7.2.1. Nanocápsulas	68
7.2.2. Nanoemulsión.....	69
7.2.3. Estabilidad de las dispersiones sin goma	72
7.2.4. Estabilidad de las dispersiones con goma xantana	74
7.2.5. Morfología de las dispersiones	76
7.3. Evaluación del efecto de recubrimientos en manzana fresca cortada	77
7.3.1 Calidad visual de manzana tratada con diferentes recubrimientos con dl- α -tocoferol	77
7.3.2 <i>Cambios de color</i>	81
7.3.2.1 <i>Luminosidad (L*)</i>	81
7.3.2.2 <i>Cambios en a*</i>	83
7.3.2.3 <i>Cambios en Índice de oscurecimiento</i>	85
7.3.3. Caracterización fisicoquímica después de la inmersión	87
7.3.3. Cambios en la ultraestructura de rebanadas de manzana tratadas con los recubrimientos de talla submicrónica.	88
7.3.4. Cambios fisicoquímicos durante el almacenamiento refrigerado....	92
7.3.4.1. <i>Pérdida de líquido drenado</i>	92
7.3.3.2. <i>Sólidos solubles Totales (SST)</i>	93
7.3.3.3. <i>Acidez titulable</i>	94
7.3.3.4 <i>Cambios en pH durante el almacenamiento</i>	95
7.3.4 Cambios de textura.....	97
7.3.5. Cambios en actividad de polifenoloxidasas (PFO)	100
7.3.7 Cambio en el contenido de fenoles totales	105
7.3.8 Actividad fenilalanin amonioliasa (PAL) en manzana	107
7.4. Establecimiento de condiciones de preparación de las NLS.....	110
7.4.1. Tamaño de partícula.....	110
7.4.2 Índice de polidispersión (PDI)	111
7.4.3 Potencial zeta (ζ)	112
7.5. Desarrollo del recubrimiento con NLS.....	113
7.5.1. Estabilidad de los recubrimientos de NLS/goma xantana.....	114
7.5.1.1. <i>Tamaño de partícula e PDI durante el almacenamiento</i>	116
7.5.1.2. <i>Cambios de ζ durante almacenamiento</i>	117

7.6. Caracterización Superficial de NLS.....	119
7.7. Calidad visual del Fruto durante el desarrollo experimental.....	119
7.7.1 Aspecto visual de guayaba previ3 a la aplicaci3n de los recubrimientos	121
7.7.2 Cambios en calidad visual de guayaba durante el almacenamiento	122
7.8 Observaciones de microscopía electr3nica de guayabas recubiertas.....	125
7.9 Cambios de color en Guayaba recubierta con NLS	131
7.10.1. P3rdida de peso.....	135
7.10.2. Cambios en S3lidos Solubles Totales (SST)	139
7.10.3. Cambios en acidez titulable	142
7.10.4. Cambios en firmeza de los frutos	144
IX REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍCAS.....	149

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro		Página
2.1	Características de estabilidad con diferentes valores de ζ	14
2.2	Resumen de las aplicaciones de la nanotecnología en la cadena de producción de alimentos.)	15
2.3	Composición fisicoquímica de guayaba a diferentes estados de madurez.	18
6.1	Materiales utilizados para la elaboración de nanocápsulas	35
6.2	Variables independientes codificadas en el modelo de superficie de respuesta	37
6.3	Recubrimientos desarrollados para el tratamiento de manzana fresca cortada.	41
7.1	Resultados respecto a la media de las nanocápsulas preparadas por lote experimental.	57
7.2	ANOVA y coeficientes de regresión sobre las variables de respuesta respecto a los factores estudiados.	58
7.3	Caracterización de nanocápsulas formadas con otros materiales y empleados en la validación del método de emulsificación-difusión.	68
7.4	Caracterización inicial de manzana después de aplicación de los recubrimientos.	88
7.5	Actividad enzimática PFO de manzanas sin tratamiento.	101
7.6	Caracterización inicial de muestras NLS-goma xantana.	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1.	Nanopartículas biodegradables	6
2.2.	Descripción del mecanismo para la formación de nanopartículas por el método emulsificación-difusión con base en el mecanismo de “diffusion-stranding” a) antes de la etapa de difusión, b) durante la etapa de difusión	11
2.3	Distribución de tamaño de partícula en sistemas coloidales	13
2.4	Cinética de oxidación de o-difenol (catecol [A]) y monofenoles (fenol [B]) por la polifenoloxidasasa	24
2.5	Biosíntesis de compuestos fenólicos	25
6.1	Desarrollo metodológico para la aplicación de sistemas nanoparticulados en frutas	34
6.2	Procedimiento de preparación de nanopartículas por el método emulsificación-difusión	36
6.3	Marcadores de densidad utilizados en la determinación de densidad de sistemas coloidales	40
6.4	Diagrama de Bloques, Elaboración de manzanas frescas cortadas	44
6.5	Procedimiento utilizado para los estudios de recubrimientos de guayaba	53
7.1	Comparación de densidad para nanoemulsión, nanoesferas y nanocápsulas (con diferentes concentraciones poli- ϵ -caprolactona).	56
7.2	Superficie de Respuesta para el tamaño de partícula de nanocápsulas en función de: a) velocidad de agitación vs alcohol polivinílico a una concentración de 200 mg de poli- ϵ -caprolactona, b) velocidad de agitación vs poli- ϵ -caprolactona (mg) a 5 % de alcohol polivinílico y c) alcohol polivinílico vs poli- ϵ -caprolactona a 4000 rpm	60
7.3	Superficie de Respuesta PDI de nanocápsulas en función de: a) velocidad de agitación vs alcohol polivinílico a una concentración de 200 mg de poli- ϵ -caprolactona, b) velocidad de agitación vs poli- ϵ -caprolactona (mg) a 5 % de alcohol polivinílico y c) alcohol polivinílico vs poli- ϵ -caprolactona a 4000 rpm	62
7.4	Superficie de Respuesta PDI de nanocápsulas en función de: a) velocidad de agitación vs alcohol polivinílico a una concentración de 200 mg de poli- ϵ -caprolactona, b) velocidad de agitación vs poli- ϵ -caprolactona (mg) a 5 % de alcohol	64

polivinílico y c) alcohol polivinílico vas poli- ϵ -caprolactona a 4000 rpm.

7.5	Micrografías de nanocápsulas a condiciones de preparación óptimas	66
7.6	Distribución de tamaño de partícula nanocápsulas preparadas a 4000 rpm, 5 % pluronic F-127 y 186 mg de poli- ϵ -caprolactona.	69
7.7	Tamaño de partícula de nanoemulsiones en función a los ciclos de homogenización.	70
7.8	Distribución de tamaño de partícula para la emulsión (E), nanoemulsión (NE), nanocápsulas (NCS) y nanoesferas (NESF).	71
7.9	Cambios de tamaño de partícula e Índice de polidispersión de los sistemas: nanocápsulas (NCs), nanoemulsión (NE), emulsión (E).	72
7.10	Variación en el ζ , durante el almacenamiento	74
7.11	Fluctuación de tamaño de partícula por efecto de la incorporación de goma xantana a los sistemas: nanocápsulas/goma xantana (NCS + GX), emulsión/goma xantana (E + GX), nanoemulsión/goma xantana (NE + GX).	75
7.12	Variación en el potencial zeta en muestras con 0.3 % de goma xantana	76
7.13	Morfología de los sistemas desarrollados (a) NCS = nanocápsulas, (b) NE = nanoemulsión y (c) E = emulsión.	76
7.14	Aspecto visual de las muestras de manzana tratada con sistemas submicrónicos	77
7.15	Aspecto visual de las muestras de manzana antes del almacenamiento.	79
7.16	Cambios en aspecto visual en manzana fresca cortada control respecto a recubrimientos con emulsión, solución y goma xantana	80
7.17	Cambios en aspecto visual en manzana fresca cortada para recubrimientos de talla submicrónica respecto al control	81
7.18	Cambios en Luminosidad en manzana almacenada a 4 °C para los diferentes recubrimientos. NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.	82
7.19	Cambios en "a*" durante almacenamiento a 4 °C por efecto de los diferentes recubrimientos. NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana	84
7.20	Cambios en índice de oscurecimiento en manzana a 4°C para los diferentes recubrimientos. NE = nanoemulsión, NCS =	85

	nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.	
7.21	Superficie de un corte de la manzana Red Delicious, sin tratamiento	89
7.22	Micrografías del tejido de manzana tratado con los diferentes recubrimientos: a) GX = goma xantana, b) NCS = nanocápsulas, c) NESF = nanoesferas, d) NE = nanoemulsión, e) TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, f) E = emulsión.	91
7.23	Pérdida de peso por líquido drenado para los diferentes recubrimientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, E = emulsión, GX = goma xantana.	92
7.24	Cambio en sólidos solubles durante el almacenamiento refrigerado (4°C) de manzana con diferentes tratamientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.	93
7.25	Cambios en acidez durante el almacenamiento de manzana con diferentes recubrimientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.	94
7.26	Cambios en pH durante el almacenamiento a 4°C para los diferentes tratamientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.	96
7.27	Cambios de firmeza durante el almacenamiento a 4°C para los diferentes recubrimientos utilizados: E/GX = emulsión, GX = goma xantana, NCS/GX = nanocápsulas, NE/GX = nanoemulsión, NESF/GX = Nanoesferas, Sol = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato	97
7.28	Comportamiento del módulo de compresión para manzana almacenada con diferentes recubrimientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.	99
7.29	Actividad de PFO en manzana fresca cortada durante almacenamiento con diferentes tratamientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.	102
7.30	Estructura, hidrólisis y función antioxidante de TPGS	104
7.31	Variación en el contenido de fenoles totales: E = emulsión, GX = goma xantana, NCS = nanocápsulas, NE = nanoemulsión, NESF = nanoesferas, Sol = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato	106

7.32	Actividad fenilalanin amonioliasa en manzanacon durante almacenamiento. NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, GX = goma xantana	107
7.33	Distribución del tamaño de partículas de NLS en relación a los ciclos de homogenización	111
7.34	Variación del potencial zeta por efecto del número de ciclos de homogenización (10,000 rpm/min) para dispersiones de cera de candeuba.	112
7.35	Efecto de la temperatura de aplicación, concentración de goma xantana y uso de plastificante (propilenglicol) sobre la cantidad de recubrimiento depositado en el fruto	114
7.36	Distribución del tamaño de partícula de los recubrimientos con diferentes concentraciones de NLS y concentración constante de 0.4 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol comparadas con NLS solas.	115
7.37	Variación del tamaño de partícula en función al tiempo de almacenamiento y % deNLS a una concentración constante de 0.4 % de goma xantana.	117
7.38	Variaciones el potencial zeta durante el almacenamiento de NLS con concentración constante de goma xantana (0.4%) y propilenglicol (0.5%)	118
7.39	Micrografías de Nanopartículas Lipídicas Sólidas de cera candeuba (suspensión al 10 %).	119
7.40	Fotos de los recubrimientos con goma xantana/plastificante. a) 0.3 % goma xantana, b) 0.4 % goma xantana y c) 0.5 % goma xantana aplicados a 20°C. d) solubilización del recubrimiento en agua	120
7.41	Distribución de recubrimientos con diferentes concentraciones de goma xantana, 60 % NLS y 0.5 % de propilenglicol a) 0.3 % de goma xantana, b) 0.4 % de goma xantana, c) 0.5 % de goma xantana.	121
7.42	Guayaba variedad Media china al inicio de la experimentación con diámetro promedio de 4.44 cm	122
7.43	Cambios en el aspecto visual de frutos de guayaba durante el almacenamiento refrigerado a 8°C.	123
7.44	Cambios en el aspecto visual de guayabas transferidas 5 días a temperatura ambiente después del periodo de almacenamiento refrigerado poner temperatura 8°C.	125
7.45	Micrografía del corte lateral de guayaba sin tratamiento.	126
7.46	Micrografía de guayaba con recubrimiento a base de goma xantana (0.4 %) y propilenglicol (0.5%).	126
7.47	Micrografía guayaba con recubrimiento 60 % de NLS, 0.4 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol.	127
7.48	Distribución de recubrimiento con 60 % de NLS en el pericarpio de guayaba.	128

7.49	Micrografía de guayaba con 65 % de NLS, 0.4 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol.	129
7.50	Superficie de guayaba recubierta con 70 % de NLS, 0.4 % de goma xantna y 0.5 % de propilenglicol.	129
7.51	Superficie de guayaba recubierta con 75 % de NLS, 0.4 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol.	130
7.52	Micrografía de guayaba recubierta con 80 % de NLS, 0.4 % goma xantana y 0.5 % propilenglicol, con agregados de NLS.	131
7.53	Cambios en ángulo de matíz (Hue) en guayaba refrigerada a diferentes concentraciones de NLS y una concentración constante de 0.3 % de goma xantana y 0.5 % de propilenlicol.	132
7.54	Cambios de color de guayabas refrigeradas + 5 días a temperatura ambiente	134
7.55	Pérdida de peso de guayaba refrigerada a 8°C durante almacenamiento	136
7.56	Pérdida de peso en guayaba transferida a temperatura ambiente después del periodo correspondiente de refrigeración.	138
7.57	Cambios en sólidos solubles totales en guayaba refrigerada a 8°C con diferentes proporciones de NLS, goma xantana (0.4 %) y propilenglicol (0.5 %).	139
7.58	Cambios en SST para guayabas almacenadas a temperatura de refrigeración + 5 días a tempertura ambiente.	141
7.59	Variación en la acidez titulable durante el almacenamiento refrigerado a 8°Cpara los diferentes recubrimientos	143
7.60	Cambios de acidez titulable en guayaba refrigerada+5 días ambiente.	144
7.61	Cambios de textura en guayaba refrigerada a diferentes concentraciones de NLS, 0.3% de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol.	145
7.62	Cambios de firmeza de guayabas refrigeradas + 5 días a temperatura ambiente.	147

I. INTRODUCCIÓN

Hasta hace algunos años era poco frecuente encontrar palabras que utilizaran el prefijo *nano* (milmillonésima parte de una unidad, 10^{-9}), es de llamar la atención como sin haberlo percibido se han incorporado estas palabras al lenguaje común. En alimentos, la nanotecnología no comenzó a tomar importancia sino hasta la década pasada cuando se comenzaron a desarrollar gran parte de las aplicaciones que ahora impactan el envasado de alimentos, dadas las potencialidades que ofrece las aplicaciones se han ampliado a otros campos de la industria de los alimentos en particular a sistemas de liberación nanoparticulados (micelas, liposomas, nanoemulsiones, nanopartículas, etc.) Es importante resaltar que en la industria de alimentos, la aplicación de la nanotecnología es aún limitada, teniendo impacto en la producción de envases activos e inteligentes por ejemplo la utilización de sistemas antimicrobianos, potenciadores de sabor, inhibidores de producción de etileno, etc. Recientemente se han identificado cuatro áreas del proceso productivo de alimentos donde se puede emplear nanotecnología: 1) desarrollo de nuevos materiales funcionales, 2) procesamiento a micro- y nano-escala, 3) desarrollo de nuevos productos y 4) métodos de instrumentación (Chen *et al.*, 2006a; Chau *et al.*, 2007).

El desarrollo de recubrimientos comestibles constituye una estrategia potencial para reducir los efectos perjudiciales que se presentan en los tejidos vegetales de frutas frescas, en las operaciones previas al pre-enfriamiento y almacenamiento. Razón por la que se vio en la nanotecnología una vía con alta potencialidad para resolver el problema e incrementar la vida útil de los frutos, infiriendo los posibles mecanismos por los que pudiesen ser afines con los frutos frescos enteros o cortados.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar dispersiones nanométricas (nanocápsulas y nanopartículas lipídicas sólidas) que contribuyan a incrementar la vida útil de frutas frescas enteras y cortadas, con ingredientes aceptables para su uso en alimentos que permitan la aplicación de sistemas barrera y, aditivos. El trabajo se dividió en dos etapas: Etapa 1. Aplicación de recubrimientos

comestibles con base en nanocápsulas cargadas con dl- α -tocoferol aplicadas a manzana fresca cortada para evaluar su comportamiento e inferir sobre la acción de los sistemas de talla nanométrica en la conservación del producto. Etapa 2. Aplicación de recubrimientos con base en nanopartículas lipídicas sólidas en la conservación de guayaba variedad media china determinando los cambios fisicoquímicos durante su conservación en refrigeración a 8 °C y el efecto de la transferencia a temperatura ambiente.

En la Etapa 1, se empleó el método de emulsificación-difusión propuesto por Quintanar-Guerrero *et al.* (1998a), llevando a cabo la optimización de la preparación (concentración de polímero, estabilizante y velocidad de agitación), considerando como variables de respuesta el tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI), potencial zeta (ζ) y densidad. Una vez optimizadas las condiciones de preparación se evaluó la repetitividad del método utilizando aceites de soya, girasol y dl- α -tocoferol. Las nanocápsulas con dl- α -tocoferol fueron probadas en manzana cortada en gajos y almacenada a 4 °C, evaluando los cambios de calidad y determinando su efectividad en reducir el índice de oscurecimiento e incremento de la vida útil del producto. Además se determinó el contenido de fenoles totales, actividad de polifenoloxidasa y fenilalaninamonio liasa (PAL), con la finalidad de explicar el mecanismo de acción de los sistemas. Fue posible obtener sistemas de talla submicrónica capaces de distribuirse homogéneamente en la superficie de manzana e infiltrarse en el tejido del fruto, lo que fue evidenciado a través de las micrografías obtenidas por microscopia electrónica de barrido. Es posible atribuir al dl- α -tocoferol el efecto antioxidante y modificador del potencial de membrana lo que posibilita la disminución del oscurecimiento enzimático. Todos los sistemas de talla submicrónica limitaron la transferencia de oxígeno, por lo que la actividad de polifenoloxidasa y fenilalaninamonio liasa se ven disminuidas, lo que además se contrastó con el contenido de fenoles totales.

El hecho de que se formarán sistemas de talla submicrónica como nanoemulsión y nanocápsulas posibilita un aparente efecto a nivel celular,

permitiendo el incremento de vida útil del producto. Esto no fue posible cuando se emplearon solución de TPGS y emulsión con dl- α -tocoferol, ya que mostraron una mayor actividad de polifenoloxidasas y fenilalaninamonio liasa.

La manzana fresca cortada con nanocápsulas, nanoemulsión y nanoesferas fueron las que tuvieron el menor índice de oscurecimiento y por ende menor actividad polifenoloxidasas y fenilalaninamonio liasa, además de que lograron conservar el producto por al menos 21 días en refrigeración con modificaciones de textura menores del 30 % con respecto a la condición inicial.

En la etapa 2 se prepararon las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) por el método de alto corte (rotor-estator) a alta temperatura empleando cera de candeúba. Con las NLS formadas se llevó a cabo el desarrollo de un recubrimiento con base en goma xantana. Se obtuvieron por microscopia electrónica de barrido evidencias de la formación de nanoesferas sólidas con distribución de tamaño homogéneo. Las variaciones en concentración de cera de candeuba en el recubrimiento fueron desde 60 al 80 % partiendo de una suspensión de NLS con 10 % de cera de candeuba. En concentraciones superiores al 75 % de NLS se evidenció la formación de agregados de NLS, lo que explico porque estas concentraciones no funcionaron ya que provocaron daño fisiológico. Así las mejores concentraciones fueron 65 y 70 % de NLS con las que se logró prolongar la vida útil de guayaba hasta por 5 semanas, sin daño aparente por efecto de la temperatura cuando las muestras son transferidas a temperatura ambiente, continuando su proceso de maduración que fue comprobado con la obtención de fotografías, cambios de color y modificaciones fisicoquímicas en el producto.

Finalmente, de acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo fue posible establecer que los sistemas de talla submicrónica tienen una mejor funcionalidad para la conservación de fruta fresca entera y cortada que aquellos sistemas de talla superior o convencionales, demostrándose que pueden ser empleados dentro de recubrimientos que incrementan, debido a su talla, la distribución e interacción sobre la superficie del producto, su interacción y su efecto lo que permite incrementar de manera considerable la vida útil del fruto.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1 Nanotecnología

Tradicionalmente, los recubrimientos comestibles se han utilizado como una barrera para reducir al mínimo la pérdida de agua y retrasar el envejecimiento natural de los frutos recubiertos a través de permeabilidad selectiva a los gases. Sin embargo, la nueva generación de recubrimientos comestibles está especialmente diseñada para permitir la incorporación de antioxidantes, vitaminas productos nutracéuticos por medio de la aplicación de tecnologías prometedoras como la nanoencapsulación. Debido a las propiedades que presentan los sistemas de talla submicrónica, la nanotecnología ofrece diversas posibilidades de aplicación en el área de alimentos (Quintanilla-Carvajal *et al.*, 2010; Weiss *et al.*, 2006; Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2010; Rojas-Graü *et al.*, 2010; Zambrano-Zaragoza, *et al.*, 2011). Algunos aspectos nanotecnológicos aplicados a alimentos y ligados a la presente investigación serán discutidos a continuación.

En el área de la conservación de alimentos la nanotecnología es una nueva y novedosa área que trata acerca de medir, ver, manipular y fabricar materiales a escalas individuales y muy pequeñas en un rango que va de 1 a 1000 nanómetros. Un nanómetro es la millonésima parte de un milímetro; como referencia tenemos que un virus mide entre 20 y 300 nanómetros, y un cabello humano aproximadamente 80,000 nanómetros (Bhushan, 2003; Rao *et al.*, 2004; Foladori e Ivernizzi, 2005; Azeredo, 2009). Es una tecnología fusionada y altamente multidisciplinaria que se ha convertido en un área de investigación vital y activa y que se está desarrollando rápidamente y se extiende a casi todos los campos de la tecnología (Islam y Miyazaki, 2009).

La materia a escala tan pequeña manifiesta propiedades diferentes a como se conoce en mayores tamaños (Nagarajan *et al.*, 2009), por ejemplo la reactividad química y la conductividad eléctrica con las que se pueden hacer productos que cumplan múltiples funciones, que sean más eficientes y que interactúen de manera inteligente con el medio (Foladori e Ivernizzi, 2008).

Existen dos técnicas de consolidación que se usan actualmente en la nanotecnología: *top-down*, (de arriba hacia abajo), en la que las estructuras nanométricas se obtienen por la reducción de tamaño de materiales a granel; y el *bottom-up*, (de abajo hacia arriba), la cual permite la construcción de nanoestructuras a partir de átomos individuales o moléculas capaces de conectarse (Kelsall *et al.*, 2005; Azeredo, 2009).

Dentro de los sistemas coloidales con potencial función como acarreadores de sustancias de interés alimenticio (antioxidantes, antimicrobianos, antihumectantes, saborizantes, colorantes, etc.), se encuentran: micelas, liposomas, cubosomas, nanoemulsiones, nanocápsulas y nanopartículas. A continuación se comentaran aquellos que fueron de interés para el trabajo de investigación realizado.

2.1.1. Nanopartículas

Desde el punto de vista químico–biológico, se denomina nanopartícula a un sólido coloidal, formado de materiales aceptados como seguros (polímeros biodegradables o no, lípidos, proteínas, etc.) en los que una sustancia de interés “activo” puede ser incorporada, adsorbida o unida químicamente con un tamaño que oscila entre los 10 y 1000 nm (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998b).

Los principales factores que influyen en el paso de una micropartícula a nanopartícula, son la disminución del tamaño de partícula y el incremento de la relación superficie/volumen. El término es utilizado para definir tanto nanoesferas como nanocápsulas. En la Figura 2.1 se esquematizan las diferencias entre nanoesferas y nanocápsulas, estas tienen que ver con su morfología y arquitectura. Las nanoesferas están formadas por una matriz polimérica densa, mientras que las nanocápsulas están compuestas de un líquido (por lo general oleoso) rodeado por una membrana polimérica (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996). Las nanopartículas presentan varias ventajas respecto de los sistemas coloidales; tienen estabilidad física durante el almacenamiento; conservan su integridad al contacto con fluidos biológicos; son de fácil preparación con diversas técnicas disponibles y reproducibilidad en la producción lote a lote.

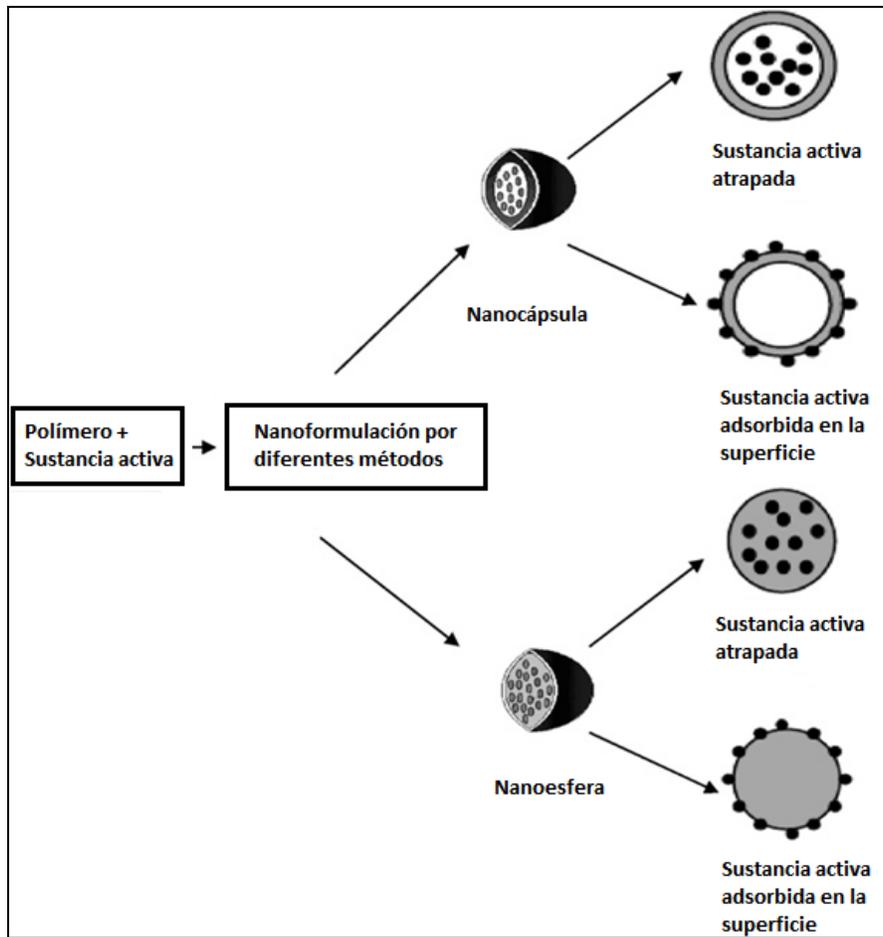


Figura 2.1. Nanopartículas biodegradables: nanocápsulas y nanoesferas.

Kumari *et al.*, 2010

2.1.2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

Una modalidad muy interesante de nanopartículas fue propuesta a inicio de los 90's, las denominadas nanopartículas lipídicas sólidas (Weiss *et al*, 2008). Estas se presentan como una nueva alternativa a los sistemas acarreadores de activos. Las nanopartículas lipídicas sólidas se forman a partir de lípidos sólidos y no de polímeros. Estos lípidos presentan baja toxicidad, alta biocompatibilidad, estables y con una capacidad regular para encapsular activos.

Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) combinan las ventajas de las nanopartículas poliméricas y emulsiones aceite/agua. Presentan buena tolerancia para su consumo, alta biocompatibilidad para la administración oral, acarreador, fácil escalamiento para su producción a nivel industrial; sin embargo, también tienen limitaciones como son la baja capacidad de carga y expulsión de activos

durante el almacenamiento. Considerando que en los alimentos además de acarrear nutraceuticos es necesario tambien protegerlos de las condiciones ambientales a las que se exponen durante su almacenamiento, distribucion y comercializacion, la utilizacion de nanoparticulas polimericas representa un potencial desarrollo en sistemas de barrera con permeabilidad selectiva. Ademas dado los metodos de obtencion tambien son sistemas termodinamicamente mas estables con lo que es posible tener mayor funcionalidad para su aplicacion como recubrimientos (Mehnert y Mäder, 2001; Weiss *et al.*, 2008).

2.1.3. Métodos de preparación de Nanopartículas

Existen un gran número de métodos para preparar nanopartículas, pero debido a que el propósito de esta investigación fue generar vectores para uso alimentario, en esta sección se resumen sólo aquellos métodos que pudieran tener susceptibilidad de ser aplicados para este fin, en particular los que prefieren utilizar materiales preformados.

Las nanopartículas obtenidas por reacciones de polimerización no son revisadas considerando sus potenciales desventajas, como son los residuos monoméricos no biodegradables, productos alternos no compatibles, probables reacciones entrecruzadas con el activo (aditivos, enriquecedores, fortificantes, antimicrobianos, etc.) o degradación de los componentes de la nanopartícula, principalmente cuando alguna radiación es utilizada para inducir la polimerización. Tampoco serán revisadas las nanopartículas formadas de origen natural debido a la incertidumbre de la fuente, la pureza de la macromolécula y su potencial antigenicidad.

2.1.3.1. Emulsificación/evaporación

En este método se producen nanopartículas por medio de la precipitación de un polímero o un lípido, disuelto en una fase orgánica inmiscible en agua (ej. Cloroformo, cloruro de metileno) con el que posteriormente se formará una emulsión en donde la fase acuosa incluye un estabilizante, la emulsión se prepara utilizando un sistema de agitación mecánica de velocidad variable, seguida de una

homogenización a alta presión para lograr la reducción de tamaño del sistema formado. Posteriormente se evapora el disolvente y se precipita el material constituyente en la fase acuosa, provocándose de esta manera la formación de las nanopartículas (Sjöström y Bergenståhl, 1992; Siekmann y Westesen, 1996).

2.1.3.2. Homogeneización a alta presión

Esta técnica se emplea para la preparación de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), estas se producen por medio de la homogeneización a altas presiones de los lípidos fundidos dispersados en una solución acuosa conteniendo el estabilizante. Las gotas de lípido solidifican y se forman las NLS.

Los dos métodos que con mayor frecuencia son utilizados para la preparación de NLS son la técnica de homogeneización a alta presión (*High Pressure Homogenization*) en caliente y en frío. La homogeneización a alta presión empuja el líquido a una presión de entre 100 a 2000 bar a través de un espacio pequeño, el fluido es acelerado en un tiempo muy corto a una alta velocidad (mayor a 1000km/h). La cavitación y la turbulencia forzan a las partículas a reducir su tamaño a una talla submicrónica (Wissing *et al* 2004). La homogeneización de este método puede realizarse en frío o en caliente y en ambos casos como paso previo se debe incorporar el ingrediente activo por medio de una dispersión al lípido fundido (Mehnert *et al* 2001).

2.1.3.3. Técnica de microemulsión

La preparación de nanopartículas por microemulsión (μ E) consiste en dispersar una μ E caliente (aceite/agua) en un medio acuoso frío bajo agitación mecánica (McClements *et al.*, 2009). La μ E está compuesta del material (lípido ó polímero) surfactante (p.ej. polisorbato 20, polisorbato 60 y fosfatidilcolina de soya), co-surfactante(s) (p.ej. etanol, butanol, etc.) y agua. Con lo que se forma un sistema transparente y termodinámicamente estable. El éxito para obtener una μ E depende de que los componentes se encuentren en las proporciones adecuadas. En general se usan diagramas ternarios para evidenciar las zonas de formación de la μ E. La microemulsión caliente 65-70 °C se adiciona a un medio acuoso frío (2-3

°C) bajo agitación mecánica, lo que asegura la precipitación del material produciéndose partículas de talla semejante a la de la μE . Comúnmente las proporciones entre la μE y el agua son de 1:25 a 1:50 (Cavalli *et al.*, 1999).

2.1.3.4. Desplazamiento del disolvente en medio acuoso

En este método, el material y el activo se disuelven completamente en un disolvente polar (p. ej. acetona o etanol). La solución resultante se vierte bajo agitación mecánica sobre un medio acuoso que contiene un estabilizante (p.ej. poloxámeros o alcohol polivinílico). Las nanopartículas se producen rápidamente por la difusión del disolvente, el que es eliminado de la suspensión a presión reducida. El mecanismo de formación de nanopartículas se explica por la turbulencia interfacial generada durante el desplazamiento del disolvente. Una fuerza de difusión es observada debido a la mutua miscibilidad entre los disolventes. Gotas de disolvente, probablemente de talla nanométrica, son acarreadas de la interfase. Estas gotas son rápidamente estabilizadas por el agente estabilizante, cuando la difusión del solvente se completa, el polímero se agrega en forma de nanopartículas (Hu *et al.*, 2002).

2.1.3.5. Emulsificación-difusión

El método de emulsificación-difusión se puede considerar como una modificación del proceso de “*salting-out*” pero sin el uso de sales, lo que evita los subsecuentes pasos de purificación así como los problemas relacionados con la compatibilidad entre los “activos” y los electrolitos empleados. La originalidad del método de emulsificación-difusión consiste en el uso de disolventes parcialmente miscibles en agua, generalmente aceptados para su uso farmacéutico y alimenticio. Al desarrollar este método para la preparación de nanopartículas poliméricas se usó alcohol bencílico como disolvente (Leroux *et al.*, 1995a,b). Las nanopartículas se preparan al formar una emulsión (aceite/agua) entre la solución del polímero en alcohol bencílico y una solución acuosa que contiene al hidrocoloide estabilizante, seguido de la dilución de la emulsión con agua.

Posteriormente, se introdujo una modificación en la metodología que fue la saturación del disolvente parcialmente miscible en agua. Esta saturación de la fase orgánica con agua y de la fase acuosa con el disolvente orgánico permite mejorar el equilibrio termodinámico del sistema (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996). La técnica consiste en la formación de una emulsión (aceite/agua), entre la solución de un polímero biodegradable (según el método propuesto inicialmente) en el disolvente saturado con agua (p.ej. propilencarbonato) y una fase acuosa que contiene el estabilizante (p.ej. alcohol polivinílico), previamente saturada con el disolvente orgánico. La subsecuente adición de agua al sistema causa que el disolvente difunda hacia la fase externa, lo que trae como resultado la formación de nanopartículas del polímero. La adición de un estabilizante adecuado evita la formación de grumos de polímero, pues éste actúa como un agente protector tanto para formar la emulsión como para estabilizar las nanopartículas formadas. El método de emulsificación-difusión presenta las siguientes ventajas: (1) se puede usar equipo de laboratorio convencional; (2) se emplean disolventes farmacéuticamente aceptables; (3) es posible reciclar los disolventes; (4) es adaptable a varios tipos de polímeros; (5) es de fácil escalamiento; además (6) presenta un alto grado de reproducibilidad y eficiencia y (7) permite la obtención de nanopartículas (incluyendo lipídicas y nanocápsulas).

Se ha demostrado que cada gota de la emulsión primaria formará varias nanopartículas y que estas son formadas por fenómenos interfaciales durante la difusión del solvente. Sin embargo, estos fenómenos no pueden ser totalmente explicados por efectos de convección causados por la turbulencia interfacial. Los autores sugieren que las nanopartículas se forman debido a una inestabilidad química producida por el transporte del solvente, por un mecanismo similar a aquel usado para explicar los procesos de emulsificación espontánea (diffusion-stranding). La idea básica es que la difusión del solvente desde los glóbulos acarrea moléculas hacia la fase acuosa, constituyendo regiones locales de supersaturación en las que los nuevos agregados de polímero (no totalmente desolvatados) serán formados (Quintanar-Guerrero, *et al* 1997a). La estabilización de estas protonanopartículas por la presencia de estabilizante es muy importante,

con el objeto de evitar su coalescencia y la formación de aglomerados. En la Figura 2.2 se muestra el mecanismo de formación de nanocápsulas, considerando que si el estabilizante se encuentra en la interfase líquido-líquido durante el proceso de difusión y considerando que tienen un buen efecto estabilizante, se provocará la formación de nanopartículas una vez que se lleve a cabo la difusión del disolvente.

2.1.4. Estabilidad de sistemas coloidales.

Los sistemas coloidales se encuentran en estabilidad termodinámica por efecto de los surfactantes utilizados, sin embargo; al existir una desestabilización hay un aumento de tamaño de partícula de las más grandes a expensas de las pequeñas. Por lo que la probabilidad de floculación, cremado o coalescencia depende en gran medida del grado de polidispersión de las gotas y las posibles interacciones entre estas (Aranberri *et al*, 2006). Una manera de evaluar los cambios en estabilidad de los sistemas coloidales es monitorear durante el almacenamiento los cambios en tamaño de partícula, índice de polidispersión y potencial zeta (ζ).

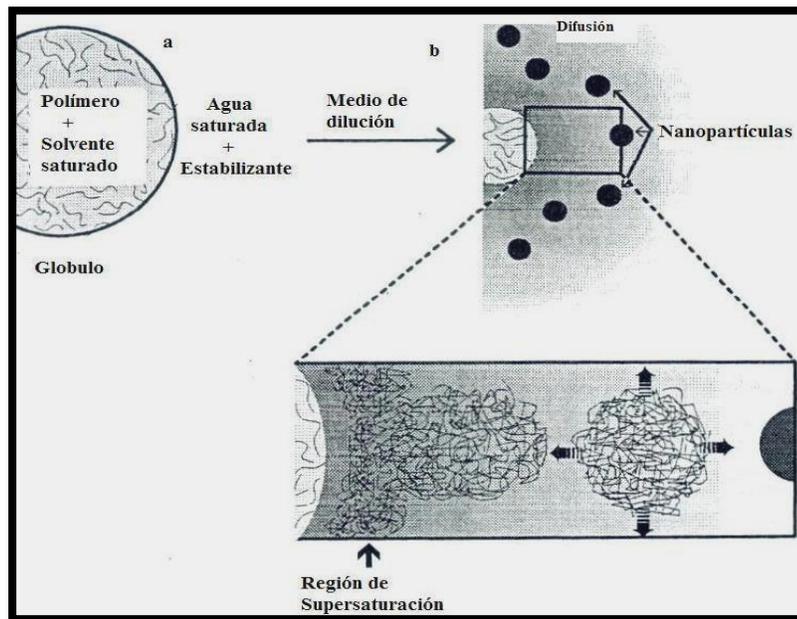


Figura 2.2. Descripción del mecanismo para la formación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión con base en el mecanismo de "diffusión-stranding" a) antes de la etapa de difusión, b) durante la etapa de difusión.

2.1.4.1. Distribución de tamaños de partícula

El tamaño de las partículas es uno de los parámetros más importantes para la caracterización de las nanopartículas en dispersiones coloidales. En primer lugar, la distribución del tamaño de partícula no se define por el valor de la media del tamaño, sino por la forma en que se define el “medio”. La media, la mediana y la moda son los descriptores igualmente válidas. Además, la propia población puede ser definida por el número o volumen de las partículas presentes, y estos son sólo dos de los diversos sistemas de ponderación que pueden ser empleados. La propia forma de la partícula es importante también, una forma esférica presenta una dispersión de la luz diferente de una que es rectangular. Las determinaciones de tamaño de las partículas son en su mayoría para confirmar que el rango deseado del tamaño coloidal se ha obtenido durante la preparación y que se mantiene durante el almacenamiento o la transformación posterior (Nastruzzi, 2005).

La Figura 2.3 muestra los diferentes tipos de distribución que pueden encontrarse en los sistemas coloidales, en un sistema monodisperso, las partículas son de un tamaño uniforme, generalmente se produce cuando la agitación es homogénea, en cambio un mezclado incompleto o mal efectuado puede dar paso a una distribución polidispersa que genera un amplio rango de tamaños de partículas. La distribución de tipo bimodal es producido por una mezcla de dos emulsiones, mostrándose dos poblaciones (Bosquez-Molina *et al.*, 2003).

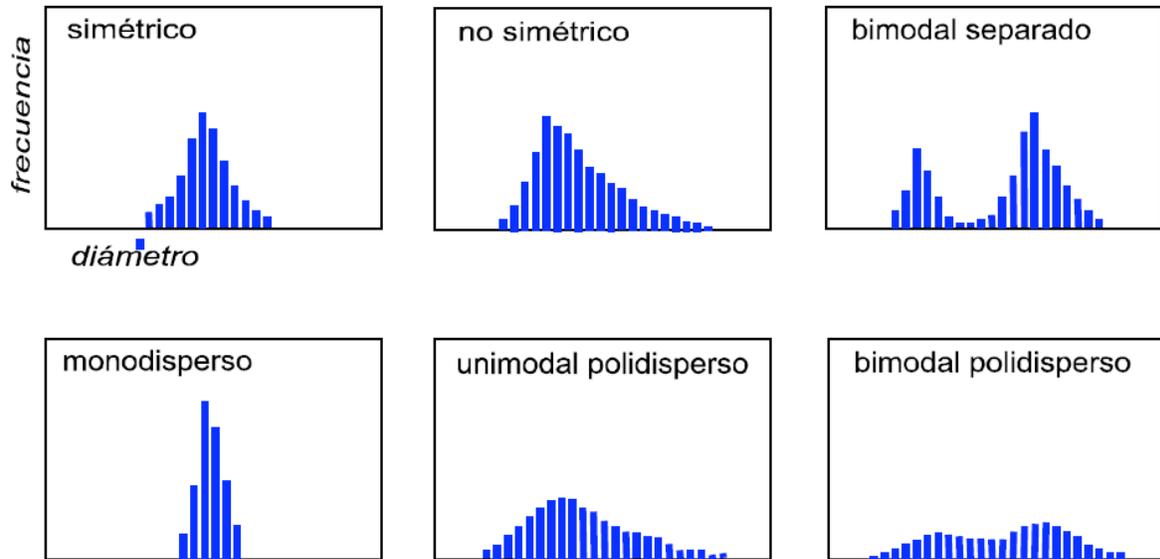


Figura 2.3 Distribuciones de tamaño de partícula en sistemas coloidales.
 Hernández, 2004.

2.1.4.2. Potencial zeta (ζ)

Los fenómenos electrocinéticos es un término genérico aplicado a los efectos asociados con el movimiento de las soluciones iónicas cerca de las interfaces cargadas. La determinación de la estructura detallada de la doble capa eléctrica de polímeros coloidales son de gran importancia en problemas de estabilidad y reología de sistemas dispersos (Hidalgo-Álvarez, 1996).

La capa de contra iones que rodean la partícula cargada es llamada doble capa difusa y la concentración en la doble capa difusa es función de la distancia de la superficie de la partícula. Cuando la partícula cargada se mueve con respecto a su envoltorio (electroforesis), hay un plano de corte entre las dos fases y el potencial eléctrico del plano se llama ζ . Se puede medir experimentalmente por el movimiento electrocinético de las partículas. Debido a que el ζ determina las fuerzas interpartículas entre sistemas electrostáticamente estabilizados esta es una medida de estabilidad relativa (Karlsson *et al.*, 2005). En el Cuadro 2.1 se muestran los valores de ζ y su relación con la estabilidad del sistema.

Cuadro 2.1. Características de estabilidad con diferentes valores de ζ

Características de estabilidad	ζ (mV)
Máxima aglomeración y precipitación	+ 3 a 0
Excelente aglomeración y precipitación	-1 a -4
justa aglomeración y precipitación	-5 a -10
umbral de aglomeración	-11 a -20
plataforma de estabilidad ligera (pocos aglomerados)	-21 a -30
estabilidad moderada (no aglomerados)	-31 a -40
buena estabilidad	-41 a -50
muy buena estabilidad	-51 a -60
excelente estabilidad	-61 a -80
máxima estabilidad para sólidos	-81 a -100
máxima estabilidad para emulsiones	-81 a -125

Schramm, 2005.

2.2 Nanotecnología en Alimentos

La nanotecnología tiene el gran potencial de generar nuevos productos y procesos en el campo de los alimentos con numerosos beneficios, por ejemplo, el aseguramiento de la calidad y seguridad alimentaria, análisis de la composición, detección y neutralización de microorganismos y contaminantes abióticos, detección de factores anti nutricionales y alérgenos y el control de procesos; en el Cuadro 2.2 se muestra un resumen propuesto por Bouwmeester *et al.* (2009) acerca de los usos de la nanotecnología en alimentos.

Mediante la adición de nanopartículas pueden desarrollarse nuevos envases y recubrimientos comestibles con mejores propiedades mecánicas y de barrera a los gases, también es posible incluir nanosensores para alertar a los consumidores cuando la vida útil de un producto ha terminado. La nanotecnología puede también emplearse en alimentos funcionales con sistemas de liberación en sitios de acción específicos para mejorar la salud humana (Chi-Fai *et al.*, 2007; Siegrist *et al.*, 2008).

Cuadro2.2. Resumen de las aplicaciones de la nanotecnología en la cadena de producción de alimentos.)

Etapa en la cadena	Aplicación	Nanotecnología	Función	Contacto NP/ consumidor
Producción agrícola	Nanosensores	<i>Nanospray</i> en productos alimenticios Dispositivos	Detecta y colorea microorganismos Detecta contaminantes, micotoxinas y microorganismos	+ --
	Pesticidas	Nanoemulsiones, encapsulados Liberación de activos. nanoencapsulados	Aumento en la eficacia y solubilidad en agua Activa la liberación local de las sustancias	++ ++
	Purificación de agua y limpieza de lodos	Filtros con nanoporos Nanopartículas	Remoción de patógenos y contaminantes. Remoción, catálisis u oxidación de contaminantes	- -/+
Producción y procesamiento de alimentos	Producción de alimentos	Dispositivos de nanocerámicos	Gran área superficial reactiva	-/+
	Refrigeradores, contenedores para almacenamiento, equipo de preparación de alimentos	Incorporación de nanopartículas (plata y óxido de zinc)	Recubrimientos antibacteriales	-/+
Conservación	Productos alimenticios	<i>Sprays</i> de plata nanométrica	Detección de deterioro del alimento	-/+
	Materiales de envase	Incorporación de sensores, acción antibacterial Incorporación de NP	Monitoreo de las condiciones de almacenamiento Aumento de las propiedades de barrera y resistencia de los materiales	++ -/+
Alimentos funcionales	Suplementos/ aditivos	Incorporación de NP activas	Eliminación del oxígeno, prevención del crecimiento de patógenos	-/+
		NP de metales coloidales Sistemas de liberación	Mayor captación del metal deseado Protección liberación del contenido sólo en ciertos puntos a ciertas condiciones	++ ++
		Nutrientes agrupados en formas nanométrica	Mayor absorción de los nutrientes	++

“-”, no hay contacto de la nanotecnología con el alimento; “-/+”, contacto con el alimento durante la producción pero no hay exposición directa de nanopartículas al consumidor; “+/++”, nanopartículas directamente agregadas en productos para el consumidor.

Bouwmeester *et al.*, 2009

Algunas aplicaciones en el desarrollo de recubrimientos empleando nanotecnología para la conservación de frutas y vegetales frescos incluyen nanopartículas de plata para incrementar la vida útil de zanahorias y ensaladas de frutas, aprovechando el potencial de las partículas metálicas para inhibir el crecimiento microbiano (Costa *et al.*, 2011; Costa *et al.*, 2012). En este trabajo se revisaran algunos aspectos para el desarrollo de recubrimientos comestibles empleando activos antioxidantes y ceras para el desarrollo de sistemas coloidales que tienen potencialidades para ser aplicados en la conservación de frutos en diversas presentaciones.

2.3. Recubrimientos comestibles

Un recubrimiento comestible se define como una capa delgada de material comestible formado directamente sobre un alimento, éstos son aplicados en forma de líquido sobre el alimento por inmersión, aspersion o goteo (Olivas y Barbosa-Canovas, 2005).

En general las películas o recubrimientos comestibles tienen la capacidad de actuar como barrera a la migración de humedad, O₂, CO₂, aromas, sabores, y lípidos; pueden también, mejorar la integridad estructural de productos frágiles o las propiedades de manejo mecánico del alimento, es por ello que pueden servir como envase, sí dichas propiedades son adecuadas y las condiciones de sanidad prevalecen durante su almacenamiento, transportación y comercialización. Además ayudan a mantener la calidad de los alimentos después de que el envase es abierto, pues estas sirven para estabilizar los gradientes de actividad de agua, protegiéndolo contra la pérdida o ganancia de humedad y pérdida de aromas, además de que hacen posible la incorporación de agentes antimicrobianos, saborizantes, antioxidantes y pigmentos (Park, 1999; McHugh *et al.*, 2000).

Desde hace muchos años se ha trabajado en mejorar los recubrimientos desarrollados a base de ceras, ya que si estas no se emplean adecuadamente impiden la respiración del fruto provocando daños fisiológicos, las ceras más empleadas han sido la de candeuba, canelilla, cera de abeja, etc. (Bosquéz-Molina *et al.*, 2003).

Los recubrimientos comestibles pueden influir en la calidad de las frutas recubiertas de diferentes maneras, como en la transferencia de humedad entre la fruta y el medio ambiente, la liberación controlada de agentes químicos como antimicrobianos, saborizantes y antioxidantes, la reducción del oxígeno interno con una disminución en el metabolismo de la fruta. Por lo tanto, algunos de los efectos que se pueden observar en los frutos recubiertos son: reducción en la velocidad de respiración, disminución de la pérdida de peso, retraso del oscurecimiento enzimático y aumento de la vida útil (Rojas-Graü *et al.*, 2009; Pavlath y Orts, 2009).

La aplicación de recubrimientos comestibles en la superficie de las frutas imparte una apariencia brillante y mejor color, reduce las pérdidas de peso, extiende la vida de anaquel y previene el ataque microbiano, lo cual es muy importante en frutas perecederas. Los recubrimientos comestibles crean una atmósfera modificada alrededor de las frutas ya que funcionan como una barrera semipermeable al vapor de agua y otros gases, y sus usos ofrecen una atractiva alternativa en empaques debido a sus características amigables con el ambiente (Debeaufort *et al.*, 1998; Perez-Gago *et al.*, 2006).

La funcionalidad de los recubrimientos comestibles se puede mejorar mediante la incorporación de nanopartículas (agentes antimicrobianos, aditivos, antioxidantes e ingredientes funcionales), los cuales pueden tener una mejor distribución en la superficie del producto y lograr interactuar con la membrana celular del fruto o impedir el desarrollo de microorganismos (Costa *et al.*, 2012).

2.4 Características fisicoquímicas de los frutos

La calidad es un atributo no definido y puede considerarse como el conjunto de propiedades o características peculiares de cada producto hortofrutícola, en esta se consideran propiedades sensoriales que incluyen apariencia, textura, sabor, aroma y nutricionales (Artés *et al.*, 2002).

El estado de madurez en el momento de la cosecha determina la calidad final del producto. Cuando los frutos son recolectados inmaduros, presentan

características indeseables identificables como el aumento en la susceptibilidad a desordenes fisiológicos. Por otro lado, cuando son cosechados muy maduros, entran rápidamente en la senescencia. No existe un patrón y un consenso del estado de maduración ideal para la cosecha de guayabas (Barret *et al.*, 2005). Estas normalmente son recolectadas cuando la pulpa esta firme y la coloración de la cáscara comienzan a cambiar de verde-oscuro a verde-claro (Azzolini *et al.*, 2004).

En el Cuadro 2.3 se muestran los resultados encontrados por Soares et al (2007) en cuanto a color, pH, acidez titulable, sólidos solubles totales, azúcares y vitamina C en frutos de guayaba blanca a diferentes estados de maduración, siendo importante resaltar el comportamiento del ángulo Hue que disminuye conforme transcurre la maduración, lo cual indica el paso del color verde claro al color amarillo. El valor de pH aumenta durante la maduración de un 4.07 a 4.54 disminuyendo así el sabor ácido y disminuyendo el contenido de acidez; mientras que, los sólidos solubles totales, la sacarosa y la glucosa tienden a aumentar durante la maduración.

Cuadro 2.3. Composición fisicoquímica de guayaba a diferentes estados de madurez.

Parámetros	Estados de maduración		
	inmaduro	intermedio	maduro
Color			
<i>L</i>	53.83	64.05	71.87
<i>a</i>	-9.78	-2.99	4.23
<i>b</i>	22.25	28.9	32.83
<i>C</i>	24.3	29.05	33.1
<i>h</i> °	113.73	95.91	82.66
pH	4.07	4.48	4.54
Acidez titulable (% ac.citrico)	0.39	0.46	0.44
Sólidos Solubles Totales (SST)	7.4	8.6	8.4
Sacarosa (mg/100g)	10.57	11.43	11.37
Glucosa (mg/100g)	22.5	15.16	14.13
Fructosa (mg)100g)	21.46	17.96	18.39
Vitamina C (mg ac.ascorbico/100g)	76.8	145.35	168.36

Soares et al., 2007

La guayaba es un fruto sensible al daño por frío y a los cambios en las concentraciones de CO₂ y O₂ (Benito-Bautista y Mercado-Silva, 1997), razón por la que se han realizado diversos estudios para el almacenamiento en atmósferas modificadas y utilización de recubrimientos con base en carboximetilcelulosa, almidones, pectina, cera de candelilla, candeuba, sacarosa, glucosa, aceites vegetales, goma de mezquite (Khuyen *et al.*, 2008; Tomás *et al.*, Espinoza-Zamora *et al.*, 2010).

2.5. Frutos frescos cortados

El hecho de que los productos frescos cortados sean tan apreciados se debe a sus características primarias de frescura y conveniencia. Los productos frescos cortados deben de ser inocuos, sanos y preparados bajo Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) por lo que son necesarios procesos de desinfección y sanitización adecuados. Snyder (2003) definió los alimentos mínimamente procesados como “aquellos en donde los riesgos debidos a los procesos biológicos, químicos y físicos se encuentran en niveles tolerables”.

La Asociación Internacional de Productos Frescos Cortados (IFPA, por sus siglas en inglés) define a las frutas y vegetales frescos cortados inicialmente llamados mínimamente procesados o productos ligeramente procesados, como cualquier fruta fresca o vegetal que ha sido físicamente modificado de su forma original (por pelado, cortado, lavado, etc.), para obtener un producto 100 % comestible que es subsecuentemente envasado y almacenado a temperaturas de refrigeración (Rojas-Graü *et al.*, 2011; Olivas y Barbosa-Canovas, 2005).

Los productos frescos cortados incluyen ensaladas en bolsas, zanahorias *baby*, mezclas de vegetales y frutas frescas cortadas como manzana, piñas o melones (Balla y Farkas, 2006; Rojas-Graü *et al.*, 2011).

Debido al daño mecánico, las frutas y vegetales frescos cortados se deterioran mucho más rápidamente que los productos intactos lo cual conduce a cambios físicos y fisiológicos que afectan la calidad y reducen la vida útil. Los

síntomas de deterioro de productos frescos cortados incluyen cambios de textura, oscurecimiento enzimático y contaminación microbiológica (Rojas-Graü, *et al.*, 2006).

2.6. Cambios fisiológicos y bioquímicos en frutas frescas cortadas

La intensidad de la respuesta a la ruptura celular por el procesado mínimo depende de diferentes factores, entre los más importantes se encuentran la especie y variedad del fruto, temperatura de almacenamiento, composición de la atmósfera interna del empaque, la presión de vapor de agua o humedad relativa y la presencia de inhibidores de los cambios deteriorativos. Para conseguir productos frescos de calidad, las alteraciones fisiológicas debidas a las heridas en el tejido del fruto deben reducirse al mínimo (Gerdemann *et al.*, 2002).

2.6.1. Pérdida de agua

Uno de los factores importantes en la comercialización de frutas frescas cortadas es la pérdida de peso, que es influenciada por la modificación de la resistencia de la cutícula, ya que esta es eliminada o cortada durante las operaciones mínimas realizadas al fruto lo que elimina las barreras a la transpiración y con ello eleva el intercambio de vapor de agua con el entorno, además de que con la ruptura del tejido se incrementa la relación entre el área superficial y el volumen del producto (Toivonen y DeEll, 2002). El desarrollo de recubrimientos comestibles es una barrera que limita el intercambio gaseoso y con ello la pérdida de humedad del producto.

2.6.2. Cambios de textura.

Otro cambio muy evidente es la pérdida de firmeza debida principalmente a la acción de enzimas proteolíticas y pectinolíticas sobre los componentes de la pared celular. Durante las operaciones de procesado y, especialmente, tras el cortado, los tejidos vegetales tienen una pérdida de firmeza debido a la hidrólisis enzimática de las sustancias pécticas que forman parte de la pared celular. Enzimas como la pectino-metil-esterasa (PME) y poligalacturonasa (PG) juegan un papel importante en el ablandamiento de los tejidos. La PME produce la hidrólisis

de la pectina, formando metanol y ácido péctico, el cual puede ser despolimerizado por la PG, desestabilizando las estructuras celulares. No obstante, la actividad enzimática de los tejidos cortados puede depender del estado fisiológico del fruto entero (Robert *et al.*, 2003).

El daño mecánico del corte o pelado expone los tejidos y aumenta la permeabilización de las membranas y el intercambio celular de fluidos con la consecuente inundación de los espacios intercelulares. Induciendo una descompartmentalización de enzimas y sustratos, causando un aumento de la actividad enzimática y pérdida de fluidos cuya velocidad solo depende de la temperatura del sistema (Pérez-Cabrera, 2003).

2.6.3. Acumulación de metabolitos secundarios y cambio de color

La acumulación de fenoles es uno de los fenómenos más estudiados en respuesta al troceado de frutas y verduras. Las heridas en los tejidos tienen dos efectos sobre el metabolismo de los fenoles, el primero es la oxidación de los compuesto fenólicos endógenos como una consecuencia de la ruptura de la membrana celular lo que permite la mezcla de estos compuestos con sistemas enzimáticos oxidativos que están separados por membranas (Toivonen y DeEll, 2002), generando quinonas altamente inestables que posteriormente se polimerizan para formar melaninas, que se ha encontrado poseen propiedades antibacterianas y antifúngicas, para protección de los daños provocados por insectos y herbívoros (Vermerris y Nicholson, 2006). El segundo es la estimulación de células adyacentes por la lesión para producir más compuestos fenólicos en un esfuerzo para cicatrizar heridas (Mercado Silva y Aquino-Bolaños 2005). Es bien conocido que la fenilalanina amonialiasa (PAL) es la enzima clave de la ruta de los fenilpropanoides, catalizando el primer paso en la bisoíntesis de estos compuestos (González-Aguilar *et al.*, 2010).

Los compuestos fenólicos en fruta fresca cortada es importante debida a su contribución de propiedades antioxidantes y por su participación como sustrato en la actividad de las enzimas polifenoloxidasas (PFO), que provocan el

oscurecimiento de los frutos. El pelado y cortado provocan la descompartimentación de las enzimas por lo que esto favorece la interacción con los sustratos (Mercado-Silva y Aquino-Bolaños 2005 y Artés et al., 1998). La degradación de compuestos antioxidantes en fruta fresca cortada se puede ver favorecida durante el procesado debido a la exposición al oxígeno (O₂) y la luz.

El color es uno de los principales atributos que caracteriza la frescura de los vegetales. El oscurecimiento en la fruta fresca modifica sus características organolépticas reduciendo su calidad limitando su vida útil y comercialización.

Las heridas que se producen en las frutas y vegetales por efecto del manejo, cortado o rebanado producen cicatrices que provocan modificación en la actividad metabólica y actividad enzimática provocando un aumento en la producción de compuestos fenólicos y con ello sustrato disponible para las polifenoloxidasas, responsables del oscurecimiento en frutos. Se han realizado muchas investigaciones enfocadas al control del oscurecimiento enzimático, existiendo estudios sobre la actividad de la Fenil alanina amonio liasa (PAL), enzima limitante de los fenilpropanoides, ruta que se activa principalmente cuando hay heridas (Hiromi y Homma, 2001; Choi *et al.*, 2005). Sin embargo, otras enzimas como la peroxidasa también están involucradas en el oscurecimiento enzimático (Mercado-Silva y Aquino-Bolaños 2005).

El origen de los pigmentos cafés es complejo y no se entiende completamente, pero se sabe que involucra la oxidación de polifenoles por las enzimas peroxidasa (POD) y polifenol oxidasa (PFO). Los compuestos fenólicos de la fruta son oxidados hasta quinonas mediante reacciones catalizadas por las PFO. Durante el procesado mínimo de fruta se daña la integridad del tejido vegetal produciéndose un incremento en las actividades metabólicas y una ruptura de los compartimentos celulares dando lugar a que enzimas y sustratos entren en contacto reaccionando y formando compuestos activos. Estos últimos, a su vez experimentan procesos de polimerización que dan lugar a compuestos coloreados (melaninas), produciendo el oscurecimiento superficial del producto y disminuyendo así su calidad visual. El grado de oscurecimiento que sufren las

frutas depende de la temperatura, concentración y tipo de compuestos fenólicos presentes en los tejidos, actividad de la PFO, estado de madurez, presencia de oxígeno (O₂) y compartimentación de los enzimas y sustratos (Rojas-Graü, *et al.*, 2006; Oms-Oliu *et al.*, 2008).

En la Figura 2.4 se muestra un modelo general para explicar la actividad catecolasa y cresolasa de la PFO de muchas frutas y vegetales. Este modelo explica la existencia de tres formas enzimáticas (“*met*”, “*oxi*” y “*desoxi*”) y las particularidades de cada actividad de la enzima (Sellés-Marchat, 2007).

En el ciclo catecolasa, el *o*-difenoil reduce al Cu (II) de la forma *met* produciendo la forma *desoxi*Cu (I), en este paso están implicados dos electrones, además se forman una molécula *o*-benzoquinona y dos moléculas de agua. A continuación la forma *desoxi* reacciona con el oxígeno molecular generando la forma *oxi*. Cada uno de los átomos de Cu (II) de la forma *oxi* se une a un átomo de oxígeno de los grupos hidroxilo de otro *o*-difenoil dando lugar al complejo ternario Cu (II)-O₂-difenoil. En el último paso, el *o*-difenoil es oxidado a *o*-benzoquinona y la enzima es reducida a la forma *met*. Para completar el ciclo, otra molécula de *o*-difenoil se une a la forma *met* y se produce la oxidación del *o*-difenoil a *o*-quinona y la correspondiente reducción de la forma *met* a la forma *desoxi* (Ramírez *et al.*, 2003)

En el ciclo creseolasa (B) sólo participan las formas *desoxi* y *oxi*. En este ciclo la forma *oxi* reacciona con un sustrato monofenólico para formar un complejo ternario Cu (II)-O₂-monofenol que se reorganiza para dar lugar a un intermediario de reacción. Este intermediario de reacción es de naturaleza muy reactiva y conduce a la hidroxilación del sustrato formándose *o*-difenoil unido a la enzima. La salida del producto implica la transferencia de un electrón a cada Cu²⁺, pasando estos a Cu¹⁺ y formándose *o*-quinona, agua y la forma *desoxi* (Ramírez *et al.*, 2003; Sellés-Marchat, 2007).

La forma *met*, reducida a la forma *desoxi* por *o*-difenol también puede ser reducida a la forma *desoxi* por otro compuesto reductor (ácido ascórbico, hidroxilamina, ditionita) y por H₂O₂ en presencia de O₂ (Ramírez *et al.*, 2003).

El grado de oscurecimiento que muestran las frutas y vegetales frescos cortados puede depender de la concentración y tipos de compuestos fenólicos presentes en los frutos, así como del contenido de cobre en la enzima que contribuye a la actividad de la PFO, temperatura, estado de madurez, presencia de oxígeno, y compartimentación de las enzimas y sus sustratos (Rojas-Graü, *et al.*, 2006; Jiménez-Vieyra y Zambrano-Zaragoza, 2011).

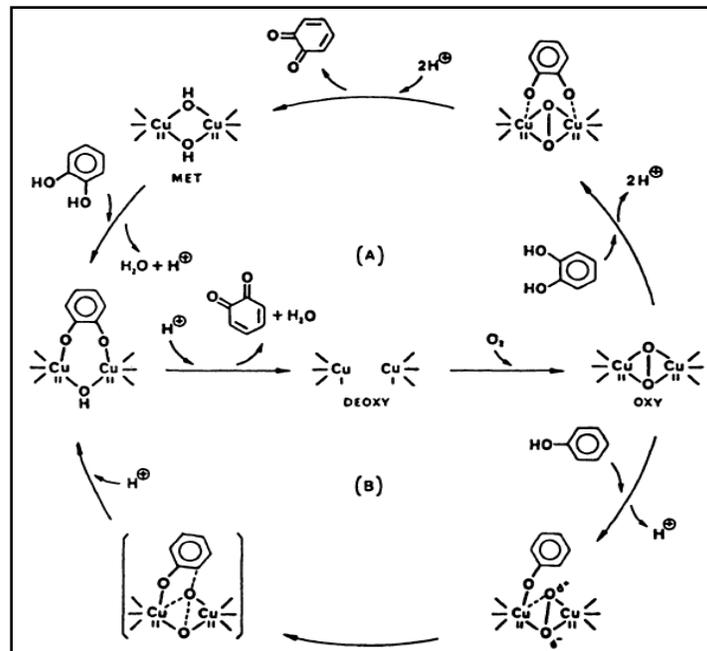


Figura 2.4. Cinética de oxidación de *o*-difenol (catecol [A]) y monofenoles (fenol [B]) por la polifenoloxidasasa.

Lee y Whitaker, 1995.

La velocidad de reacción del oscurecimiento puede ser diferente entre frutas y hortalizas. Esto puede ser explicado a la capacidad de respuesta al daño mecánico y a la cantidad de compuestos fenólicos en el momento del daño; las manzanas contienen una suficiente cantidad de polifenoles que causan un rápido oscurecimiento enzimático, mientras que la lechuga contiene una menor cantidad de esos compuestos; cuando la manzana es cortada, la sección cortada

generalmente se torna café en aproximadamente una hora, en tanto que la lechuga puede tomar días (Hiromi y Homma, 2001).

2.6.4. Actividad de la fenilalanin amonio-liasa

Una respuesta inicial a las heridas (y muchas otras tensiones bióticas y abióticas) es la síntesis de “*novo*” y el aumento de la actividad de la fenilalanin amonio-liasa (PAL), la primer enzima involucrada en la ruta de fenilpropanoides.

La Figura 2.5 muestra la biosíntesis de los fenilpropanoides; el sitio de control de la ruta parece ser la transformación de la L-fenilalanina a ácido trans-cinámico llevada cabo por PAL. Un aumento en la actividad de esta enzima lleva a formación de una amplia gama de compuestos fenólicos.

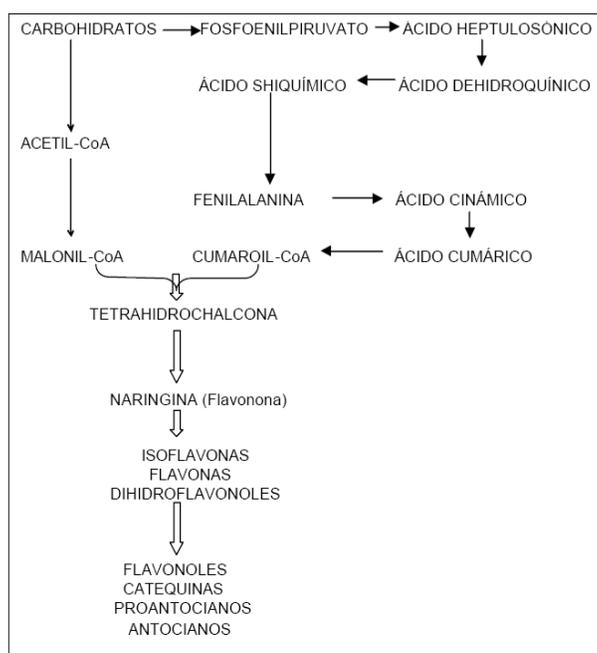


Figura 2.5. Biosíntesis de compuestos fenólicos

Pérez-Cabrera *et al.*, 2006

Los compuestos fenólicos solubles producidos por el aumento de la actividad de la PAL son retenidos en vacuolas y sólo participan en las reacciones de oscurecimiento cuando se alteran las membranas y se permite a los sustratos y a las enzimas mezclarse produciendo el oscurecimiento superficial (Choi *et al.*, 2005).

Las heridas y la exposición al etileno estimulan la ruta de fenilpropanoides generando nueva actividad enzimática, que conduce a una mayor producción de los principales compuestos fenólicos y la síntesis de nuevos componentes (Roura *et al.*, 2008). Así, las heridas generan altos niveles de la actividad de la PAL no sólo en las células cercanas a la herida, sino también en las células que se encuentran hasta 2.5 cm de distancia del sitio de la herida. Esto indica que la cicatrización en el tejido por la producción de PAL debido a las heridas, es transmitida del tejido herido al que no lo está. La actividad de la PAL no sólo es producida por lesiones y/o exposición al etileno, también por otras alteraciones como temperatura e infecciones de hongos.

De aquí que cuando los alimentos son sometidos a un proceso de cortado con un tratamiento como un recubrimiento, es necesario evaluar la actividad PAL puesto que con ello será posible predecir la evolución del oscurecimiento enzimático por la relación existente entre la acción de estas dos enzimas.

2.6.5. Riesgos y Regulación en Nanotecnología

Si bien la nanotecnología tiene amplias posibilidades de aplicación en el desarrollo de nuevos y mejores sistemas para diferentes sustancias de interés en alimentos (aditivos, conservadores, agentes modificadores de textura, saborizantes, colorantes y transportadores de nutraceuticos), es necesario considerar los riesgos que ésta implica para la salud, ya que durante el procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización el producto con nanopartículas pueden tenerse interacciones con otros componentes del alimento dando lugar a un riesgo toxicológico o bien al desarrollo de sustancias que una vez ingeridas provoquen en el consumidor efectos adversos, razón por la que es necesario considerar la evaluación de los riesgos reales atribuidos a los nanosistemas.

Actualmente, existen diversos organismos a nivel mundial que han iniciado la evaluación de riesgos y toxicología de productos obtenidos por nanotecnología. En Estados Unidos por ejemplo existe la dirección general de salud y protección al consumidor que evalúa los riesgos que pueden producir diversos aditivos.

(Bowmester & Marvian, 2010; Cushen *et al.*, 2012). Sin embargo, actualmente este organismo se ha dedicado a establecer una terminología clara sobre los nanosistemas. Con el rápido desarrollo de nuevos sistemas de talla submicrónica se requiere urgentemente la implementación de una metodología para la evaluación de riesgos reales, en particular para aquellos que son directamente utilizados en alimentos (Bowmeester y Marvin, 2010).

La evaluación del efecto toxicológico debe considerar las diferentes rutas por las que los nanomateriales pueden tener impacto, estas rutas pueden ser por contacto, por inhalación y por ingestión, siendo esta última la más importante para el consumo de los alimentos (Chen *et al.*, 2006b). En este sentido, es sabido que existen procesos en los que se incluyen etapas de nanoemulsificación, como sucede en la industria de helados y aderezos, donde en estas etapas se obtendrán como resultado formación de partículas de talla nanométrica lo que implica un riesgo que aún no ha sido evaluado debido a que las partículas lipídicas formadas pudiesen atravesar el tracto gastrointestinal y producir modificación de absorción o bien incrementar la respuesta alérgica (Chaydhry *et al.*, 2008; Chaudhy *et al.*, 2010; Kuzma y Priest, 2010). En relación a la ingestión, el principal riesgo que debe ser estimado es la interacción de los componentes nanométricos a nivel intestinal ya que estos pueden modificar la absorción de nutrientes o bien producir inflamación de la mucosa intestinal que representa un riesgo para la salud (Chaudhy *et al.*, 2010). Las nanopartículas pueden prolongar considerablemente el tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal incrementado la superficie disponible para que se lleven a cabo interacciones con la pared intestinal y provocando que puedan penetrar a través de los tejidos y capilares siendo esto benéfico ya que puede incrementarse la absorción y liberarse en diferentes partes del cuerpo. Sin embargo, es necesario evaluar los riesgos que esto pudiese implicar en las mucosas gastrointestinales y del tracto respiratorio (Nel *et al.*, 2006). Se han reportado estudios que evalúan el efecto del tamaño de partícula (50 a 3 μm) y la presencia en sangre de esferas de poliestireno, después de 10 días, encontrándose que cerca del 34 % de la sangre analizada presentó nanopartículas cuando estas se encontraban entre 50 y 100 nm, y no

detectándose cuando los diámetros eran superiores a los 300 nm (Chau *et al.*, 2007).

En el caso de los alimentos con nanoenvases se desconoce el riesgo que se tiene con el consumo de alimentos que transfieren nanopartículas desde los materiales de envase, considerando que el riesgo de toxicidad depende más bien del nanomaterial utilizado, de la velocidad de migración y el volumen de consumo de un alimento en particular. La migración de los componentes dependerá en gran medida del tipo de polímero utilizado, la viscosidad dinámica y la distribución de tallas de partícula, por lo que el riesgo se verá modificado por estas variables (Cushen *et al.*, 2012). Sin embargo, en el desarrollo de envases en los que se emplean principalmente plata, oro, titanio, dióxido, silicón, etc, se ha encontrado que partículas ultrafinas ($d < 100$ nm) han implicado serios problemas inflamatorios en las vías respiratorias (Brayner, 2008).

En general para el estudio de riesgos y toxicidad es necesario considerar las propiedades fisicoquímicas incluyendo, tamaño de partícula y su distribución, estado de aglomeración, forma, estructura cristalina, composición química, área superficial, superficie química, carga de superficie y porosidad. Además cada sustancia modificada a talla nanométrica presentará problemáticas totalmente distintas, ya que por ejemplo el selenio que es una sustancia toxica ve reducido su efecto cuando se disminuye su talla a nivel nanométrico (Zhang *et al.*, 2003; Oberdörster *et al.*, 2005).

Debido a que los riesgos y aspectos toxicológicos del empleo de nanopartículas no se encuentran claramente establecidos ha sido necesario llevar a cabo la evaluación del impacto en la seguridad pública, legislación, sociedad e industria de alimentos considerando la potencial toxicidad de los nanomateriales (Cushen *et al.*, 2012). Son muchos los grupos que han presentado iniciativas de regulación tanto en el sector gubernamental como en el industrial, así por ejemplo, la comisión del Codex Alimentarius participa en el desarrollo de una regulación internacional de alimentos incluyendo nanopartículas y otras tecnologías a nanoescala utilizados en agricultura, procesamiento y conservación

de alimentos, sin embargo hasta el momento no existe una regulación clara en este sentido (Chau *et al.*, 2007).

Para mejorar en los aspectos de regulación en nanotecnología la legislación se ha separado en dos vertientes una orientada a los atributos de la nanotecnología y otra más aplicada al uso de la nanotecnología en diversas áreas. La Legislación Europea en relación a los atributos de la nanotecnología Directiva 2001/95/EC incluye la seguridad del producto, buenas prácticas de manufactura, etiquetado y la evaluación de la potencialidad del mismo y en relación a los atributos del producto considera los aspectos químicos, estéticos y funcionales como aspectos de regulación (Cushen *et al.*, 2012).

La FDA actualmente no ha establecido una posición formal en cuanto a la regulación de la nanotecnología sino más bien, siendo un organismo que regula el uso de sustancias en medicina y alimentos, se ha enfocado más bien a los ingredientes específicos que constituyen un producto. La FDA participa en la Iniciativa nacional de nanotecnología (NNI por sus siglas en inglés) desde el 2000 y a partir de octubre de 2006 está considerando al momento la evaluación de los efectos adversos para la salud, sin que exista un avance al respecto en estos momentos (Bergeson, 2011).

III. JUSTIFICACIÓN

Las frutas y hortalizas en estado fresco presentan como problemática general una alta perecibilidad debido a su velocidad metabólica que se ve incrementada si estos productos son sometidos a procesos de corte como los utilizados en el procesado mínimo. Las técnicas convencionales de conservación a baja temperatura en conjunto con el uso de atmósferas modificadas (uso de películas plásticas y películas comestibles) o bien el uso de ceras superficiales han tenido una aplicación importante que podría ampliarse si se agregara nuevos conocimientos o herramientas que permitieran un control tecnológico de los procesos de deterioro.

Los sistemas funcionales empleados en la conservación deben integrarse homogéneamente a los alimentos con el fin de ejercer la acción de proteger, enriquecer, reconstituir, fortificar, potenciar y/o inhibir el crecimiento microbiano. De acuerdo con la revisión realizada es posible considerar que el desarrollo de sistemas submicrónicos con ingredientes de uso alimentario tienen amplias posibilidades tecnológicas, pudiendo ser utilizada en la protección y conservación de frutas frescas enteras o mínimamente procesadas. Los sistemas de talla nanométrica, deberán tener la posibilidad de permanecer activos el mayor tiempo posible y/o ser liberados de manera controlada o sostenida, con el fin de cumplir con la función de modificar la atmósfera interna de los productos, modificar la actividad enzimática relacionada con el índice de oscurecimiento, textura y síntesis de fenoles.

Por otro lado, después de diversas reuniones entre los grupos de investigación de ingeniería en alimentos y de nanotecnología farmacéutica de la FES-Cuautitlán, se coincidió en que las implicaciones de la nanotecnología en el área del procesamiento y conservación de alimentos, tendrían un importante impacto científico y la generación de una línea de investigación multidisciplinaria con los correspondientes beneficios técnico-científicos. Razón por la que se cree tener la certeza de que los sistemas propuestos en el presente proyecto son innovadores en el área de los alimentos.

IV. HIPÓTESIS

Actualmente la utilización de recubrimientos comestibles con base en lípidos y antioxidantes ha hecho posible mantener la calidad de fruto frescos enteros y cortados. Con base en la investigación, análisis y comprobación, el empleo de sistemas coloidales de talla submicrónica permitirá desarrollar recubrimientos homogéneos de fácil aplicación, con una mayor área superficial proporcionada por nanocápsulas y nanopartículas que contribuirán a incrementar los beneficios de los recubrimientos en la conservación y vida útil de los alimentos, y con ello aumentar las posibilidades de aplicación de la nanotecnología en áreas de conservación y procesamiento.

V. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

Desarrollar vectores nanométricos (nanocápsulas y nanopartículas lipídicas sólidas) con ingredientes de uso en alimentos que permitan su aplicación en sistemas barrera modificados y con ó sin aditivos que contribuyan a incrementar la vida útil de frutas frescas enteras y cortadas.

5.2. Objetivos Particulares

- I. Establecer la influencia de los componentes y las condiciones del proceso de emulsificación-difusión sobre el tamaño de partícula y la estabilidad de nanocápsulas y nanopartículas lipídicas sólidas para definir los parámetros críticos de la preparación de sistemas de talla submicrónica.
- II. Caracterizar los sistemas submicrónicos obtenidos, con el fin de optimizar la formulación y las condiciones de proceso para obtener productos estables y funcionales que cumplan con las especificaciones sanitarias y toxicológicas alimentarias.
- III. Evaluar la capacidad de los sistemas submicrónicos obtenidos para ser utilizados como modificadores de barrera, aditivos, protectores y/o acarreadores de sustancias funcionales en frutas frescas enteras y cortadas.
- IV. Determinar el efecto del uso de nanocápsulas cargadas de antioxidantes naturales en la actividad polifenoloxidasa fenil alanin-amonio liasa, índice de oscurecimiento, cambios de color, textura y composición química de manzana fresca cortada
- V. Aplicar nanopartículas lipídicas sólidas en guayaba variedad media china entera mediante el seguimiento de su velocidad de deterioro y cambios de madurez, asociándolos a la disminución de su vida útil.

VI. METODOLOGÍA

Esta investigación se realizó en diferentes instituciones que permitieron el uso de sus laboratorios con equipos necesarios para el desarrollo experimental de la tesis doctoral, estas se mencionan en orden de importancia:

- Programa de Posgrado del Centro de la Republica, Facultad de Química, de la Universidad Autónoma de Querétaro.
- Laboratorio de Posgrado en Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Edo. de México.
- Nave 2000 de Ingeniería en Alimentos, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Edo. de México.
- Laboratorio de Microscopía Electrónica, Universidad Nacional Autónoma de México, Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, Campus Juriquilla, Querétaro, Qro.

6.1. Desarrollo Experimental

Los procedimientos experimentales realizados se dividieron en dos etapas correspondientes a la aplicación de los sistemas coloidales en la superficie de frutos de la siguiente manera:

- I. Aplicación de nanocápsulas con dl- α -tocoferol como agente activo, para disminuir el índice de oscurecimiento en manzana de la variedad 'Red Delicious', tratando de explicar los mecanismos de acción involucrados en la acción de la polifenoloxidasas.
- II. Empleo de nanopartículas lipídicas sólidas como recubrimiento comestible en guayaba Media China, para incrementar su vida de anaquel evaluando sus cambios en los parámetros fisicoquímicos durante el almacenamiento refrigerado.

Con la Finalidad de mostrar el seguimiento de la investigación en la Figura 6.1 se muestra la secuencia metodológica realizada durante esta investigación.

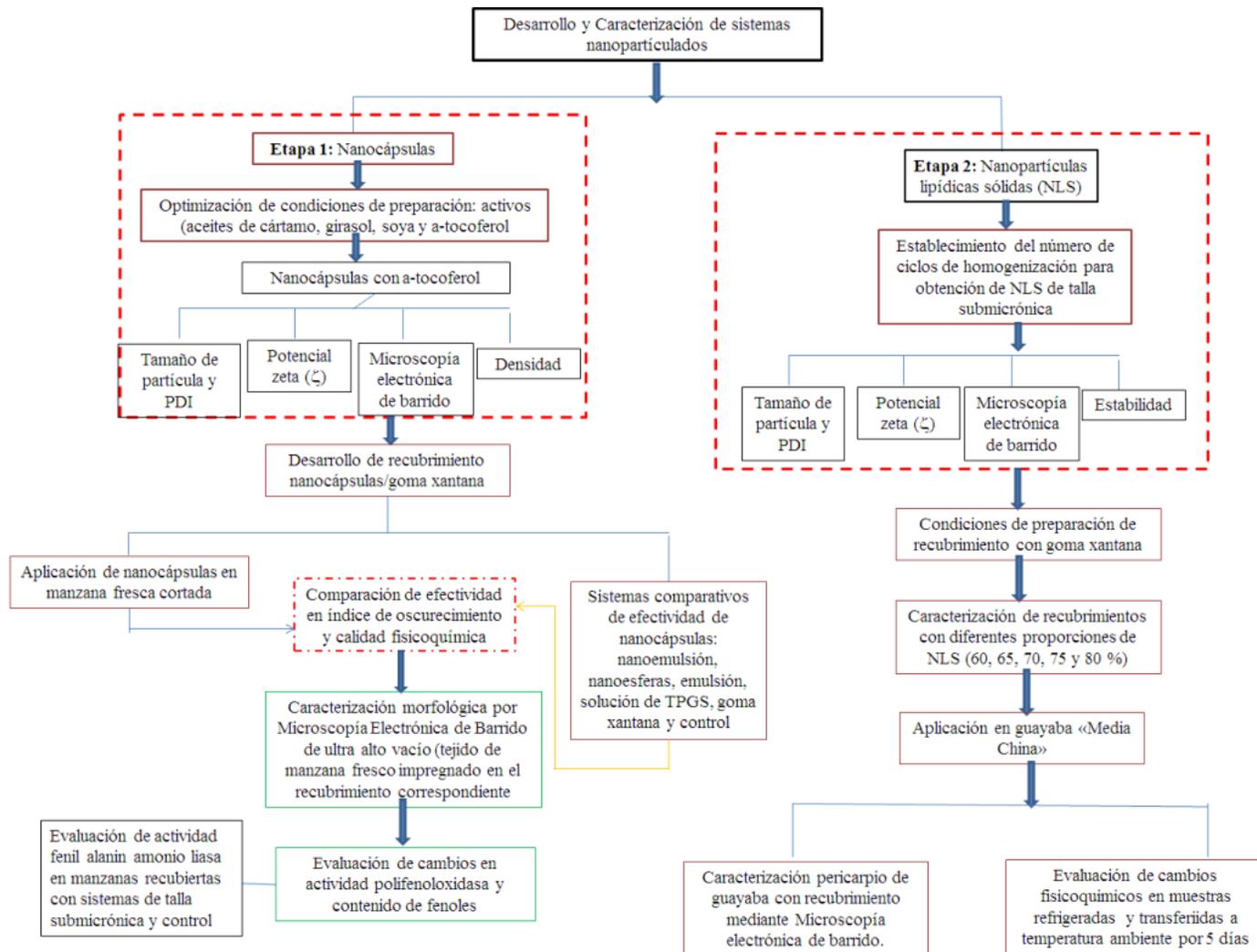


Figura 6.1 Desarrollo metodológico para la aplicación de sistemas nanoparticulados en frutas

Etapa 1 Aplicación de Nanocápsulas

6.1. Optimización para preparación de nanocápsulas

De acuerdo con la Figura 6.1, en esta primera etapa se realizó la optimización de las condiciones de preparación de nanocápsulas, siendo necesario realizar ensayos preliminares para seleccionar los factores y los niveles para llevar a cabo la optimización. En el Cuadro 6.1 se muestran los materiales probados (polímero de 100 a 400 mg), solubilidad de aceites en disolventes orgánicos (metil etil cetona y acetato de etilo), estabilizantes (2 al 15 %), para de aquí proponer el diseño experimental.

Cuadro 6.1. Materiales utilizados para la elaboración de nanocápsulas.

Polímero	Disolvente	Estabilizantes	Aceites
Poli- ϵ -caprolactona	Acetato de etilo	Alcohol polivinilico	Girasol
Poliláctico-co-glicólico	Metil etil cetona	Pluronic F-127 (polóxamero)	Soya Cártamo

6.1.1. Preparación de nanocápsulas

Las nanocápsulas cargadas con diferentes activos (según diseño experimental, cártamo, girasol, soya, α -tocoferol) fueron preparadas por el método de emulsificación-difusión (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1998a). La Figura 6.2 muestra las etapas generales para la preparación de nanocápsulas. Brevemente, cada uno de los disolventes se saturó por 1 minuto con agua destilada, con la finalidad de garantizar un equilibrio termodinámico de ambos líquidos (agua-disolvente orgánico). En la fase orgánica saturada con agua se solubilizó la poly- ϵ -caprolactona y 0.5 mL del activo (aceite de cártamo, girasol, soya y dl- α -tocoferol). En la fase acuosa saturada con disolvente se solubilizó el estabilizante (alcohol polivinilico o pluronic F-127). Una vez preparadas las fases orgánica y acuosa se procedió a preparar una emulsión aceite/agua: 20 mL de la solución orgánica se emulsificaron con 40 mL de la fase acuosa con un agitador mecánico de velocidad variable a 1900 rpm (Heidolph® Instruments, tipo R2R1, Schwabach, Alemania) y/o con dispersión de alta velocidad (Ultra-Turrax® T50, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania), para velocidades de entre 2000 a 6000 rpm que fueron controladas dependiendo del equipo empleado. El proceso de emulsificación se llevó a cabo

por 10 min, para posteriormente pasar a la etapa de difusión, adicionando 200 mL de agua que indujo la salida del disolvente a la fase continua de la emulsión, logrando con ello la formación de las nanocápsulas; después de esta etapa se eliminó el exceso de disolvente mediante evaporación a 30 °C y vacío de 70 mm de Hg.

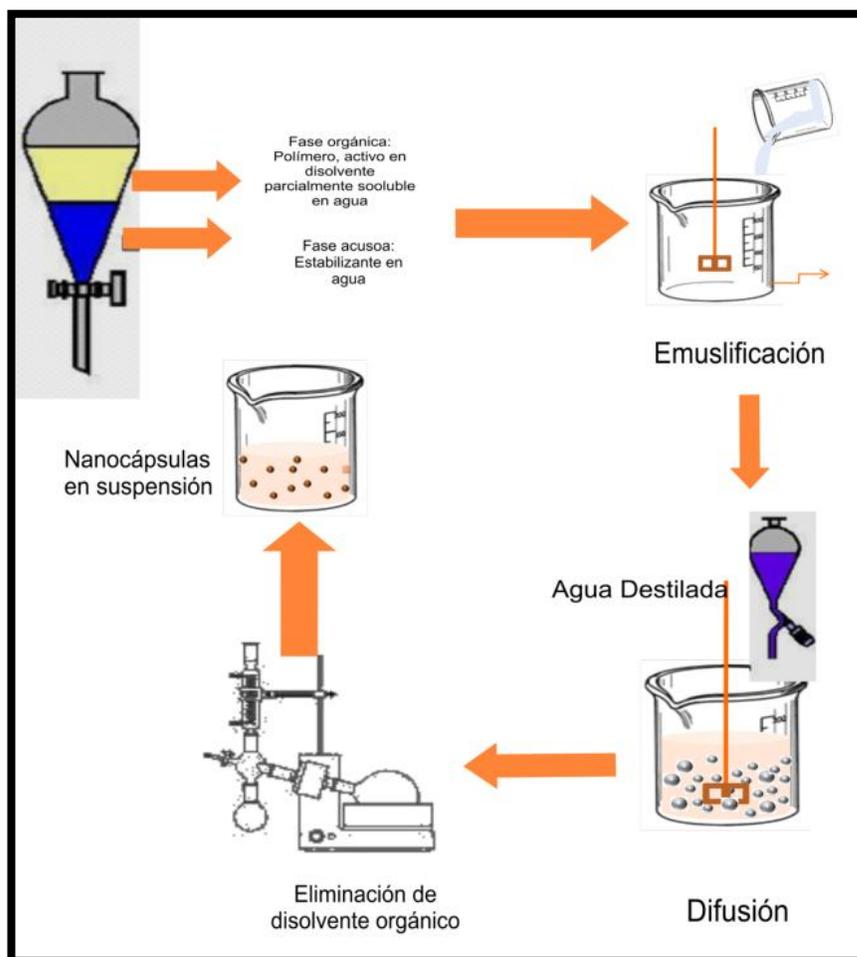


Figura 6.2. Procedimiento de preparación de nanopartículas por el método emulsificación-difusión

Quintanar-Guerrero *et al.* (1998a)

6.1.2. Diseño Experimental para nanocápsulas

Se evaluó el efecto de tres variables independientes X_1 (velocidad de cizalla), X_2 (contenido de alcohol polivinílico) y X_3 (contenido de poli- ϵ -caprolactona), sobre las variables de respuesta (Y_1 - Y_4), tamaño de partícula, PDI, (ζ) y densidad). Los efectos fueron evaluados empleando un diseño compuesto

central con el fin de estudiar los efectos principales y sus combinaciones en la preparación de nanocápsulas de aceite de cártamo (0.5 mL), para: determinar el efecto de los factores sobre las variables de respuesta; crear un modelo que correlacione las variables entre sí, determinando el efecto de los factores sobre las respuestas y optimizar el proceso en función a las variables de respuesta estudiadas y los valores deseables. En el cuadro 6.2, se muestran las variables independientes codificadas y sin codificar utilizadas en el diseño experimental. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado en forma aleatoria con la finalidad de disminuir la variabilidad de los resultados por efectos externos. Los puntos centrales se repitieron 6 veces con el fin de calcular la repetitividad del método (Montgomery, 2001; Myers y Montgomery, 2002).

Cuadro 6.2. Variables independientes sin codificar en el diseño compuesto central.

Variables codificadas	Variables sin codificar	Niveles				
		-1.633	-1	0	1	1.633
X ₁	Velocidad (rpm)	734	2000	4000	6000	7266
X ₂	% PVAL	0.917	2.5	5	7.5	9.08
X ₃	Poly-ε-caprolactona (mg)	36.7	100	200	300	363.3

6.1.3. Análisis Estadístico nanocápsulas

Se utilizó el análisis de regresión y de varianza (ANOVA), para estimar los coeficientes de regresión y evaluar la significancia estadística de los términos que se emplearon para establecer el modelo matemático que describe el comportamiento de los datos experimentales y la región óptima para las variables de respuesta.

El comportamiento de la superficie de respuesta se estableció en función a las variables de respuesta estudiadas (Y_i), empleando un modelo polinomial de segundo orden descrito por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 + \varepsilon_i \quad (6.1)$$

donde, Y_i representa la respuesta predicha, β₀ es la ordenada al origen, β₁, β₂ y β₃ son los coeficientes de regresión para los términos lineales, β₁₁, β₂₂ y

β_{33} son los coeficientes para los términos cuadráticos de la ecuación y β_{12} , β_{13} y β_{23} son los efectos de las interacciones, ϵ_i el término de error experimental con $N(0,0.5)$. Los efectos de los parámetros de la ecuación fueron evaluados con un nivel de significancia del 5 %. Se consideró una prueba de bondad de ajuste y estimación de los coeficientes de determinación (R^2) para obtener la adecuación del modelo tomando en cuenta que una R^2 de 0.80 es adecuada para un buen ajuste del modelo (Lee, *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009).

6.1.4. Optimización del modelo para nanocápsulas

La estimación de las condiciones óptimas para la preparación de nanocápsulas a partir del modelo estimado se llevó a cabo utilizando el software MINITAB 14 (Minitab Inc., PA, U.S.A.) con técnicas generales de deseabilidad, considerando como las respuestas más importantes el tamaño de partícula y PDI, seguida del (ζ) y por último la densidad de las nanocápsulas.

6.1.5. Comprobación de repetibilidad lote a lote

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de preparación de nanocápsulas y con el fin de corroborar la versatilidad del método se utilizaron como disolvente orgánico acetato de etilo como estabilizante pluronic F-127, los activos utilizados fueron dl- α -tocoferol y β -caroteno, los experimentos se realizaron por triplicado y se evaluaron las mismas variables de respuesta que para el diseño, llevando a cabo un ANOVA con un nivel de significancia de 0.05.

6.2 Caracterización de nanocápsulas

Entre los parámetros más importantes a considerar en la preparación de los sistemas coloidales se encuentran el tamaño de partícula, índice de polidispersión (PDI) y potencial zeta (ζ), a continuación se describe la metodología seguida en la realización de estas pruebas.

6.2.1. Mediciones de tamaño de partícula e índice de polidispersión (PDI)

La distribución del tamaño de partícula y del PDI de los sistemas coloidales fue determinada mediante la técnica de dispersión de luz láser con un

ángulo fijo de 90° usando un equipo Zetasizer[®] 4 (Malvern Ltd., Orsay, France). Con la finalidad de contar con el número de partículas necesarias por segundo para la medición, las dispersiones fueron diluidas con agua Mili-Q[®]. Todas las mediciones se realizaron por triplicado, obteniendo la distribución de tamaños de partícula con su correspondiente PDI.

6.2.2. Potencial Zeta (ζ)

El potencial Zeta ζ se determinó mediante electroforesis de partícula empleando un equipo Zetasizer 4 (Malvern, Francia). Para este fin se utilizaron soluciones diluidas de las dispersiones en agua Milli Q[®] midiendo el potencial Zeta ζ en relación a la movilidad electroforética, tomando como referencia soluciones de poliestireno ($\zeta = -55$ mV). El ζ es una medida del grado de repulsión entre las NC adyacentes, las partículas cargadas en forma similar en una dispersión provoca repulsión de las mismas, de tal manera que en una dispersión coloidal si el ζ es alto (positivo o negativo) entonces las nanopartículas formadas estarán electrostáticamente estabilizadas (Bala et al.,2005).

6.2.3. Densidad de los sistemas de talla submicrónica (ρ_{np})

La determinación de la densidad se llevó a cabo por gradiente diferencial de difusión utilizando sílica coloidal. Previo a la determinación, se eliminó el exceso de surfactante presente en los sistemas coloidales por ultracentrifugación a 30,000 rpm a 4 °C durante 50 min.

Se tomaron 100 μ L de centrifugado del sistema coloidal y fueron agregados a una solución de Percoll[™] al 45 % p/p en solución de NaCl 0.15 M. La dispersión así preparada fue centrifugada a 10,000 rpm/ 3 h a 25 °C comparando la densidad con gradientes de densidad preparados con marcadores de densidad específica (Figura 6.3) (Pharmacia LKB, Suecia), estos fueron utilizados como referencia, siendo sometidos al mismo tratamiento que las muestras. La altura de las bandas fue medida en función a la distancia desde la parte superior del menisco al centro de la banda utilizando un vernier (Tesu, Digit-Cal SM, Suiza). La densidad de las nanocápsulas fue determinada a partir de la interpolación de la

altura obtenida con la curva polinomial preparada con los marcadores de densidad, en función a la siguiente ecuación:

$$\hat{y} = 0.027x^4 - 0.25x^3 + 0.072x^2 - 0.54x + 1.028 \quad R^2 = 0.987 \quad (6.2)$$

donde x = la distancia del menisco al centro de la banda; y = densidad de nanopartículas.

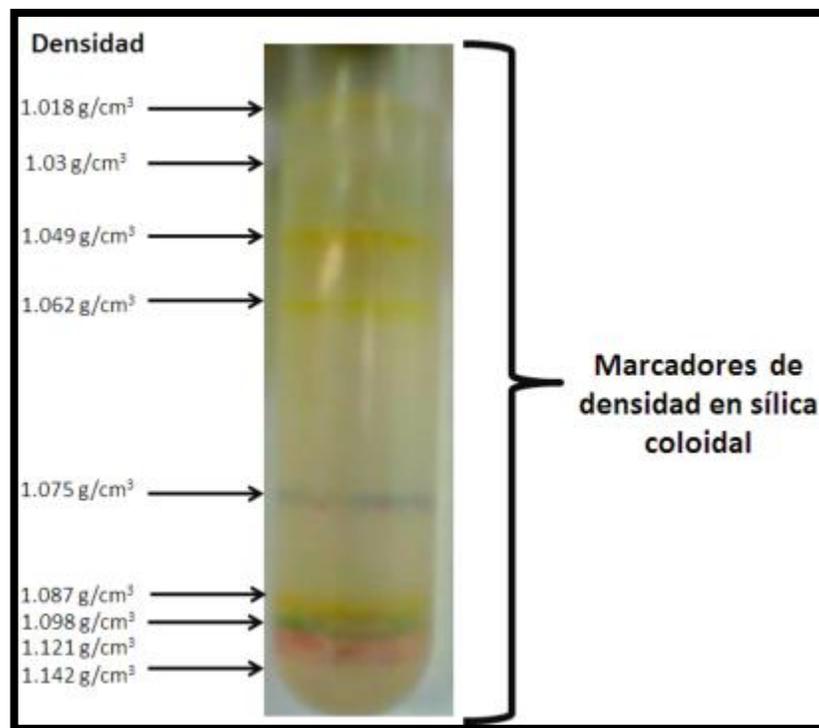


Figura 6.3 Marcadores de densidad utilizados en la determinación de densidad de sistemas coloidales.

6.2.4. Microscopía electrónica de barrido

Las muestras fueron concentradas por centrifugación con el fin de eliminar el exceso de estabilizante (alcohol polivinílico o pluronic F-127). El concentrado obtenido fue diluido en agua MilliQ[®], una gota de muestra fue extendida en la superficie de un cubreobjetos, una vez deshidratada se sometió a baño de oro (≈ 20 nm) con un equipo iónico (JEOL[®] JFC1100 Japón). Las muestras fueron observadas en su morfología con un microscopio electrónico de barrido a bajo vacío (JSM-6360, JEOL, Japón), con el propósito de evidenciar la

estructura capsular en nanocápsulas, la arquitectura y distribución de tamaños de partícula, así como la posible agregación del polímero.

6.3 Desarrollo de dispersiones coloidales (recubrimientos)

Una vez establecidas las condiciones de preparación de nanocápsulas, se procedió al desarrollo de recubrimientos utilizando goma xantana como polisacárido base, dispersión en la que se incorporaron los sistemas coloidales a comparar con la efectividad de la aplicación de nanocápsulas y que posteriormente fueron evaluados en la conservación de manzana fresca cortada. La cantidad de recubrimiento adicionado a las manzanas, se basó en ensayos de prueba y error a partir de las condiciones propuestas por Rojas-Graü *et al.*, (2007). En el Cuadro 6.3 se muestran los sistemas que fueron utilizados como recubrimientos.

Cuadro 6.3. Recubrimientos desarrollados para el tratamiento de manzana fresca cortada.

Tratamiento	Composición
Nanocápsulas	2 g/L de α -tocoferol, 200 mg poli- ϵ -caprolactona, 5 % alcohol polivinílico, 0.3 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol
Nanoesferas	Nanoesferas (sin α -tocoferol), goma xantana (0.3 %) propilenglicol (0.5 %)
Nanoemulsión	2 g/L de α -tocoferol, 42 g Span® 80, 8 g Tween, 0.3 % goma xantana y 0.5 % de propilenglicol
Emulsión	2 g/L de α -tocoferol, 42 g Span® 80, 8 g Tween, 0.3 % goma xantana y 0.5 % de propilenglicol
Solución TPGS	2 g/L de TPGS, 0.3 % goma xantana y 0.5 % propilenglicol
Goma xantana	0.3 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol

TPGS = propilenglicol succinato de α tocoferol

6.3.1 Preparación de nanocápsulas con dl- α -tocoferol

Las nanocápsulas con dl- α -tocoferol como activo fueron preparadas siguiendo la metodología propuesta en el punto 6.1.1., considerando las condiciones óptimas de preparación que incluyen 2 g/L de dl- α -tocoferol, 200 mg de poli- ϵ -caprolactona y 5 % de alcohol polivinílico, el proceso de emulsificación-

difusión se llevó a cabo utilizando un homogenizador rotor/stator Ultraturrax a 4,000 rpm. Una vez obtenidas las nanocápsulas, se incorporó la goma xantana y propilenglicol.

6.3.2. Preparación de nanoesferas

Las nanoesferas fueron preparadas de la manera descrita en el punto 6.3.1., sin agregar agente activo (dl- α -tocoferol). Al igual que en el punto anterior, una vez preparadas las nanoesferas se incorporaron el resto de los componentes del recubrimiento.

6.3.3. Preparación de la emulsión

La emulsión se preparó por el método de emulsificación convencional (Solans, 2005). La fase dispersa estuvo compuesta por 2 g de acetato de dl- α -tocoferol y 42 g de surfactante lipofílico (Span[®] 80, HLB=4.3). La fase continua se preparó con 600 mL de agua desionizada y 8 g de surfactante hidrofílico (Tween[®] 80, HLB=14.9). Una vez preparadas ambas fases, la fase oleosa se dispersó en la fase acuosa por medio de un agitador de velocidad variable (Heidolph[®] Instruments, tipo R2R1, Schwabach, Alemania) a 2000 rpm, formando así una emulsión aceite en agua. Una vez preparada la emulsión se incorporaron el resto de los componentes del recubrimiento.

6.3.4. Preparación de la nanoemulsión

La nanoemulsión fue preparada a partir de la emulsión formada de acuerdo con lo descrito en el punto 6.3.3. Para disminuir el tamaño de partícula se llevaron a cabo hasta 5 ciclos de dispersión a 10,000 rpm por 5 min empleando un dispersor rotor/estator de alta velocidad (Ultra-Turrax T50, Labotechnik Sataufen Alemania), los tiempos de reposo entre cada ciclo de dispersión fueron de 5 min, se midió el tamaño de partícula en cada ciclo para llegar a talla nanométrica con el menor índice de polidispersión. Una vez preparada la nanoemulsión se incorporaron el resto de los ingredientes a la formulación del recubrimiento.

6.3.5 Preparación de la solución de α -tocoferol

Para evaluar el efecto de la solubilidad del antioxidante en un medio acuoso y su relación con el índice de oscurecimiento en manzana, se preparó una solución disolviendo 2 g/L de TPGS utilizando un agitador de propela (Heidolph® Instruments, tipo R2R1, Schwabach, Alemania) a 500 rpm para incorporar la goma xantana y propilenglicol.

6.4. Estabilidad de los sistemas coloidales

Con la finalidad de evaluar la estabilidad de las nanocápsulas, nanoesferas, emulsión y nanoemulsión, se determinó la variabilidad en el tamaño de partícula, PDI y ζ durante 8 semanas de almacenamiento a 25 °C, siguiendo la metodología propuesta para la caracterización de los sistemas en el punto 6.2.1 y 6.2.2. Un incremento en el PDI por encima de 0.3 y cambios en el ζ con valores tendientes a cero, fueron considerados como agregación e inestabilidad del sistema.

6.5. Aplicación de recubrimientos en manzana fresca cortada

6.5.1. Material Biológico

Las manzanas 'Red Delicious' fueron obtenidas en un centro de distribución de frutas (Cuautitlán Izcalli, Estado de México). Se seleccionaron utilizando pruebas subjetivas de acuerdo a su color y tamaño uniformes, un contenido de sólidos solubles expresado en °Brix de 11 a 14, y una resistencia a la penetración de 7 N aproximadamente. Las manzanas así seleccionadas, fueron almacenadas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ y 90-95% de H.R previo a su utilización por no más de 3 días en cada periodo experimental.

6.5.2. Tratamiento de manzanas frescas cortadas

En la Figura 6.4 se muestra el diagrama de bloques del proceso seguido para la preparación de las manzanas; estas fueron cortadas con un cortador comercial, obteniéndose ocho gajos. Con la finalidad de determinar si hubo diferencia entre tratamientos con dl- α -tocoferol en función a la talla de partícula y

al empleo del antioxidante, se consideraron durante la experimentación los siguientes tratamientos: nanoemulsión, nanocápsulas, nanoesferas, emulsión, solución de TPGS, goma xantana y control, considerando la formulación de los recubrimientos correspondientes de acuerdo con lo descrito en el punto 6.3.

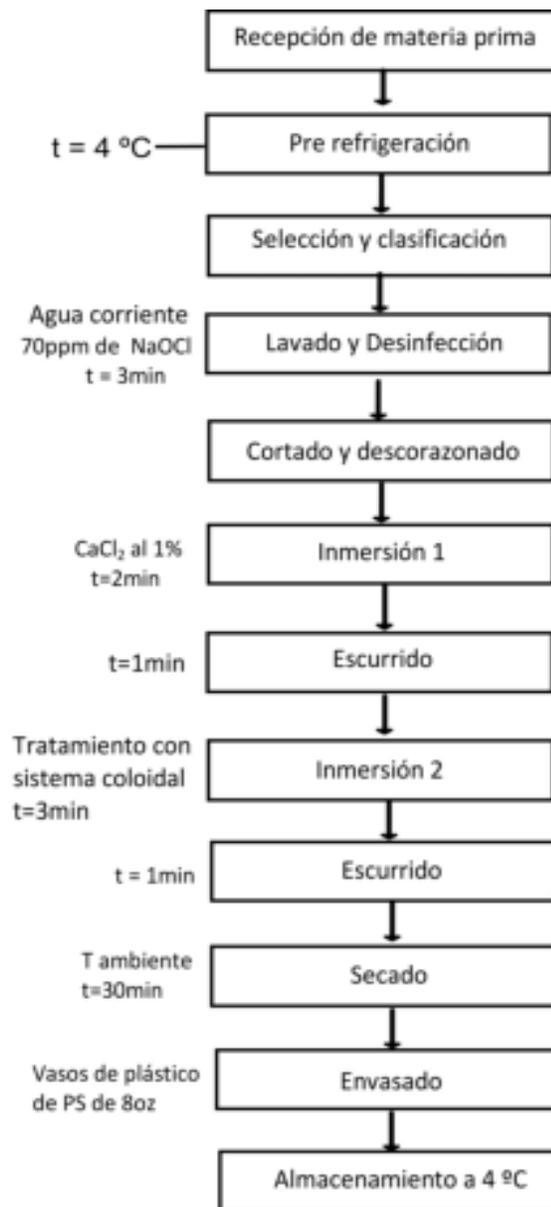


Figura 6.4. Diagrama de Bloques para los tratamientos a las manzanas frescas cortadas.

6.6. Caracterización morfológica de los recubrimientos en manzana

La caracterización morfológica de la superficie de manzanas recubiertas con las diferentes dispersiones se llevó realizando un corte longitudinal de tejido, para inmediatamente después sumergirla en el sistema correspondiente, colocando la muestra en el porta muestras y, aplicándoles un baño de oro (~20nm) utilizando un evaporador catódico *Sputter Coater JFC-1100* (Jeol, Tokyo Japan), las manzanas así preparadas se observaron en un microscopio electrónico de barrido de bajo vacío LV-SEM JSM 5600 con resolución de 5nm y 20 kV y de 12-20 Pa de presión en la cámara el voltaje, obteniéndose así las micrografías correspondientes a cada tratamiento.

6.7. Cambios físicos y químicos en manzana

Los cambios asociados al recubrimiento aplicado y al tiempo de almacenamiento fueron evaluados determinando los cambios físicos, químicos y enzimáticos en el producto almacenado en refrigeración durante 18 días. La metodología seguida para realizar las determinaciones se describirá brevemente a continuación.

6.7.1. Pérdida líquido drenado

Uno de los parámetros importantes cuando se aplican recubrimientos en frutos frescos cortados, es evaluar si el recubrimiento no provocó pérdidas de peso por drenado en el interior del envase.

Esta pérdida se determinó como el % de pérdida de peso respecto al peso inicial de manzanas frescas cortadas, para ello se pesó la manzana sin envase durante el periodo de almacenamiento utilizando para ello una balanza digital (Ohaus Voyager modelo VP613C, USA). La siguiente ecuación describe la manera en que fue realizado el cálculo.

$$\% \text{ pérdida.de.peso} = \frac{\text{peso.manzana.inicial} - \text{peso.manzna.final}}{\text{peso.manzana.inicial}} * 100 \quad (6.3)$$

6.7.2. Color

La medición de los cambios de color se realizó utilizando un colorímetro Minolta CR-300 (Konica Minolta, consola DP-301, Japón). Este fue calibrado empleando un plato blanco ($Y = 94.3$; $x = 0.3142$; $y = 0.3211$) con iluminante C a 2° del observador. Se tomaron 3 gajos de manzana, realizando dos mediciones por muestra y registrando los parámetros L^* , a^* y b^* los que fueron empleados para calcular los diferentes parámetros y que se describen a continuación (Oivas y Barbosa-Canovas, 2005)

Índice de oscurecimiento

$$IO = \frac{100(X * 0.31)}{0.172} \quad (6.4)$$

$$X = \frac{a + 1.75L}{5.645L + a - 3.012b}$$

Ángulo HUE

$$HUE = \arctan \frac{b}{a} \quad (6.5)$$

6.7.3. Textura

Se determinó utilizando un equipo universal (Instron Modelo 4411, USA) equipado con celda de carga de 5 kN y software IX de Instron. En la evaluación de la firmeza se empleó punzón de 6 mm de diámetro, el ensayo se llevó a cabo a una velocidad de 150 mm/s, midiendo la fuerza necesaria para penetrar 5 mm del producto. Para esta evaluación los gajos de manzana fueron cortados en la parte central para formar un cubo de 1 x 1 x 1 cm, evaluando con el punzón el área expuesta al recubrimiento. Los ensayos se realizaron por quintuplicado, obteniéndose la fuerza máxima (N) y módulo de compresión (MPa) (Varela *et al.*, 2007)

6.7.4. pH

Previó a la determinación se extrajo el jugo de 80 g de manzana utilizando un extractor de jugos eléctrico. El pH, se determinó en el jugo de acuerdo con el método AOAC 32.010 (AOAC, 2002), utilizando un potenciómetro (Philips Harris modelo E3039018G/K, Shenstone England) con electrodo (modelo P43-120).

6.7.5. Sólidos Solubles Totales (SST)

La determinación de los SST se llevó a cabo empleando un refractómetro de mesa ABBE (Spectronic Instruments, USA), siguiendo la metodología del AOAC 22.04 (AOAC, 2002).

6.7.6. Acidez

Las determinaciones se realizaron de acuerdo a la técnica del AOAC 22.058 (2002). Este se basa en la neutralización de los iones H⁺ con solución valorada de hidróxido de sodio 0.1 N en presencia de una solución indicadora (e. g. fenolftaleína). La determinación de la acidez se expresó en función al contenido de ácido málico de acuerdo con la siguiente relación.

$$\%Acidez = \frac{100NV_1}{V_0} * F \quad (6.6)$$

Dónde: N = normalidad de la solución de NaOH, V₁ = volumen de NaOH utilizado, V₀ = Volumen de jugo y F = meq del ácido orgánico

6.8. Cambios enzimáticos y contenido de fenoles

Los cambios en índice de oscurecimiento son un reflejo de la actividad enzimática que se ha llevado a cabo en los frutos frescos cortados, razón por la que un buen parámetro para evaluar la efectividad de los recubrimientos empleados en este estudio es determinar la magnitud de los cambios relacionados con la síntesis y consumo de fenoles.

6.8.1. Determinación de la actividad polifenoloxidasas (PFO)

La extracción de la enzima PFO se realizó siguiendo la metodología propuesta por Murata *et al.* (1992) con algunas modificaciones. 30 g de superficie

recubierta fueron molidos en una licuadora con cantidad suficiente (20 mL) de buffer fosfato de sodio frío 0.2 M pH 7.0 conteniendo 1% (v/v) de Triton[®] X-100 durante 30 segundos. El homogeneizado fue filtrado con la finalidad de eliminar las partículas sólidas y centrifugado a 10,000 rpm por 35 minutos. El sobrenadante consistió del extracto enzimático utilizado para la determinación de la actividad polifenoloxidasas.

La actividad PFO fue determinada de acuerdo al método propuesto por Zhou et al. (1993), para la determinación se preparó una mezcla de 0.2 mL de extracto enzimático y 2.8 mL de catecol (0.050 M en buffer de citrato a pH de 6.5), determinando los cambios en absorbancia (a 420 nm) durante 15 minutos en relación a un blanco que no contenía. Definiendo una unidad de actividad de PFO como el cambio de 0.001 Abs/min.

6.8.2. Medición de fenoles totales

La determinación de fenoles totales se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton et al. (1999). A 30 µL de jugo de manzana extraído de la superficie recubierta se les adicionó 2.4 mL de agua destilada y 150 µL de reactivo comercial Folin-Ciocalteu, después de 30 segundos y antes de 8 minutos se adicionó a la mezcla 450 µL de una solución saturada de carbonato de sodio (200 g L⁻¹), se dejó reposar durante una hora a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 760 nm (UV-Vis Cintra 10e, GBC Scientific Equipment Ltd. *Dandenong Victoria, Australia*). Para obtener la relación de la absorbancia con la concentración, se construyó una curva patrón con concentraciones de 0 a 700 mg de ácido gálico, midiendo la absorbancia y obteniendo la siguiente relación.

$$\hat{y} = 0.00017x \quad R^2 = 0.99 \quad (6.7)$$

Donde x representa la concentración de ácido gálico, y la absorbancia medida. Los resultados fueron expresados como miligramos equivalentes de ácido gálico (mgEAG) por gramo.

6.8.3. Determinación de la actividad Fenil-alanina-amonioliasa

Para la evaluación de la actividad de la enzima fenilalanin amonio-liasa (PAL), se adaptó el método propuesto por Ke y Saltveit (1986); 4 g de tejido fueron homogenizados con 0.4 g de polivinilpirrolidona insoluble. 16 mL de buffer de boratos (50 mM pH 8.5) y 14 μ L de 2-mercaptoetanol. Después de filtrar y centrifugar la muestra a 10,000 rpm por 40 min a 4 °C, se determinó la actividad PAL en el sobrenadante a 40 °C usando 300 μ L de L-fenilalanina como sustrato, midiendo la absorbancia a 290 nm en un espectrofotómetro (Beckman Coluter®, Inc.).

La absorbancia obtenida en la muestra, se correlacionó con la curva patrón de ácido trans cinámico (0 a 2.5 μ molar), donde se obtuvo la siguiente ecuación de regresión.

$$\hat{y} = 0.0037x \quad R^2 = 0.99 \quad (6.8)$$

Dónde: x representa la concentración de ácido trans cinámico, y la absorbancia obtenida, expresándose la actividad PAL como la cantidad de PAL producida por 1 μ mol de ácido cinámico en una hora por gramo de muestra.

6.9. Tratamiento estadístico para comparación de recubrimientos

Los resultados obtenidos se analizarán mediante un ANOVA ($\alpha = 0.05$) de dos vías con la finalidad de establecer el efecto del recubrimiento y del tiempo de almacenamiento sobre los cambios en las variables estudiadas, realizando las comparaciones de mediante pruebas de Tuke ($\alpha = 0.05$). Los datos fueron tratados utilizando el software estadístico MINITAB 14.

Etapa 2. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) en Guayaba

De acuerdo con el seguimiento metodológico propuesto en la Figura 6.1 y con la finalidad de probar si los sistemas de talla submicrónica serían útiles para la conservación de fruta entera, se desarrollaron formulaciones a base de NLS obtenidas por el método homogenización rotor/estator. Estos recubrimientos fueron probados sobre la superficie de guayaba de la variedad Media China. A

continuación se mencionará la metodología seguida para la realización de estas pruebas.

6.10. Preparación de NLS

Las NLS fueron elaboradas de acuerdo al método homogenización en caliente (Schwartz *et al.*, 1992) con un homogenizador tipo rotor-estator (Ultraturrax®; IKA, Alemania). La cera de Candeuba (10 % p/v) fue fundida a una temperatura de 90 °C (Multiceras®). Esta fase oleosa se adicionó a una solución de Pluronic F-127 (5 % p/v) a 90 °C. Se realizaron tres ciclos de dispersión en el Ultraturax a 10,000 rpm durante 5 min, con 5 min de reposo entre cada ciclo, durante todo el proceso se mantuvo una temperatura de 90 °C.

6.10.1. Caracterización de Nanopartículas lipídicas sólidas (NLS)

La caracterización de las NLS, se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta para la caracterización de nanocápsulas en los puntos 6.2.1. y 6.2.2.

6.10.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB) para NLS y guayaba

Con la finalidad de realizar el análisis morfológico de las NLS se diluyeron 0.5 mL de concentrado de NLS libre de estabilizante en 9 mL de agua Mili Q® para aplicarla en un cubreobjetos, una vez seca la muestra, se recubrió con una película fina de oro (≈ 20 nm) con un equipo iónico (JEOL® JFC1100 Japón). La superficie se evalúa con un Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL® JMS-25SII Japón) a 12.5 kV.

Para llevar a cabo el análisis microscópico sobre las guayabas con y sin recubrimiento, fue necesario llevar a cabo la deshidratación de las mismas, sumergiendo un pequeño corte de las guayabas en etanol absoluto durante 48 h y eliminado el exceso de alcohol para posteriormente secar las muestras a temperatura ambiente y recubrirlas con una película fina de oro (≈ 20 nm) con un equipo iónico (JEOL® JFC1100 Japón). Evaluando la superficie de las guayabas por Microscopio Electrónico de Barrido (JEOL® JMS-25SII Japón) a 12.5 kV.

6.10.3. Estabilidad de las NLS

La estabilidad física de las NLS durante 8 semanas de almacenamiento se determinó siguiendo la metodología descrita en el punto 6.4. El principal propósito fue de evaluar la integridad de las NLS y distribución de tamaños de partícula en las NLS (agregación).

6.11 Desarrollo de recubrimientos de NLS

Los recubrimientos con base en goma xantana fueron aplicados sobre la superficie de guayabas a temperaturas de 10 y 20 °C. Las concentraciones de goma xantana ensayadas fueron a 0.3, 0.4 y 0.5 %; se utilizó una solución al 0.5 % de azul No. 1 con el fin de cuantificar la cantidad y uniformidad del recubrimiento aplicado. Previo a la aplicación del recubrimiento las guayabas se midieron en su diámetro axial y radial para obtener la superficie del fruto, fueron sumergidas en la dispersión durante 2 minutos y secadas a 25 °C durante 2 h.

Una vez recubierta la fruta (con la dispersión colorida) se procedió a evaluar la cantidad de película adherida, sumergiendo la guayaba recubierta en 100 mL de agua, solubilizando así la goma xantana con el colorante y determinado por espectrofotometría (UV/Vis, Cary ® UV 500, Varian, Australia) a 630 nm la absorbancia del recubrimiento desprendido y solubilizado. Se contruyó una curva patrón de colorante utilizando concentraciones de 0 a 30 mg/mL de colorante obteniéndose la siguiente ecuación:

$$\hat{y} = 0.078x \quad R^2 = 0.99 \quad (6.9)$$

Donde: x es la concentración del colorante y la absorbancia de la muestra con azul No.1. Los resultados fueron expresados en función a los mg de colorante/cm² de fruta que representan la cantidad de recubrimiento adherido.

6.11.1. Evaluación del efecto de la concentración de NLS

Después de realizar el análisis estadístico para comparar la cantidad de recubrimiento adherido respecto a la temperatura, concentración de goma xantana y plastificante se seleccionó la concentración de goma xantana a utilizar como

soporte para las NLS. Con éstas se formularon los recubrimientos con NLS, la incorporación de la goma xantana al 0.3 % se llevó a cabo utilizando un homogenizador Ultraturrax®, IKA a 10,000 rpm durante 3 min.

Con la finalidad de establecer el efecto de la concentración de NLS en la conservación de guayaba, La suspensión inicial que contenía 10 % de cera de candeuba en forma de NLS, se diluyó a concentraciones de 60, 65, 70, 75 y 80 %, utilizando en todos los casos una concentración constante de goma xantana de 0.4 % y de propilenglicol de 0.5 %.

6.12. Aplicación de recubrimientos con NLS en guayaba

6.12.1. Material Biológico

El producto se obtuvo de la central de abastos de Tultitlán, Estado de México a partir de un lote de 120 kg de guayaba Media china, proveniente de Calvillo, Aguascalientes. Las guayabas fueron seleccionadas con base a su estado de madurez (70 % verde, 30 % amarillo). Se consideró además la similitud de forma, tamaño (45 a 55 cm de diámetro), ausencia de lesiones externas, daños mecánicos, enfermedades, etc. (Mercado-Silva *et al.*, 1998). Para la experimentación se formaron 6 lotes con 48 guayabas cada uno.

6.12.2. Aplicación del Recubrimiento con NLS

Una vez que se seleccionó la guayaba y previo a la aplicación del recubrimiento, se procedió a desinfectarlas por inmersión durante 15 minutos en solución de hipoclorito de sodio a 75 ppm. Posteriormente, se secaron cuidadosamente con toallas absorbentes, para después recubrirlas con las diferentes proporciones de NLS (0, 60, 65, 70, 75 y 80 %), utilizando, goma xantana como polisacárido de soporte. La aplicación del recubrimiento se llevó a cabo por inmersión durante 1 minuto, secado posterior a temperatura ambiente y almacenamiento refrigerado (10 ± 2 °C) durante 31 días.

En la Figura 6.5 se muestra el diagrama de bloques correspondiente a la aplicación de los recubrimientos con NLS. Los lotes se conformaron con la idea de llevar a cabo un muestreo cada 3 días, considerando además un lote control al

que se les evaluó paralelamente la pérdida de peso y color, para efectuarle las pruebas destructivas al final del almacenamiento. A continuación se describen las pruebas fisicoquímicas realizadas a los frutos durante su almacenamiento refrigerado.

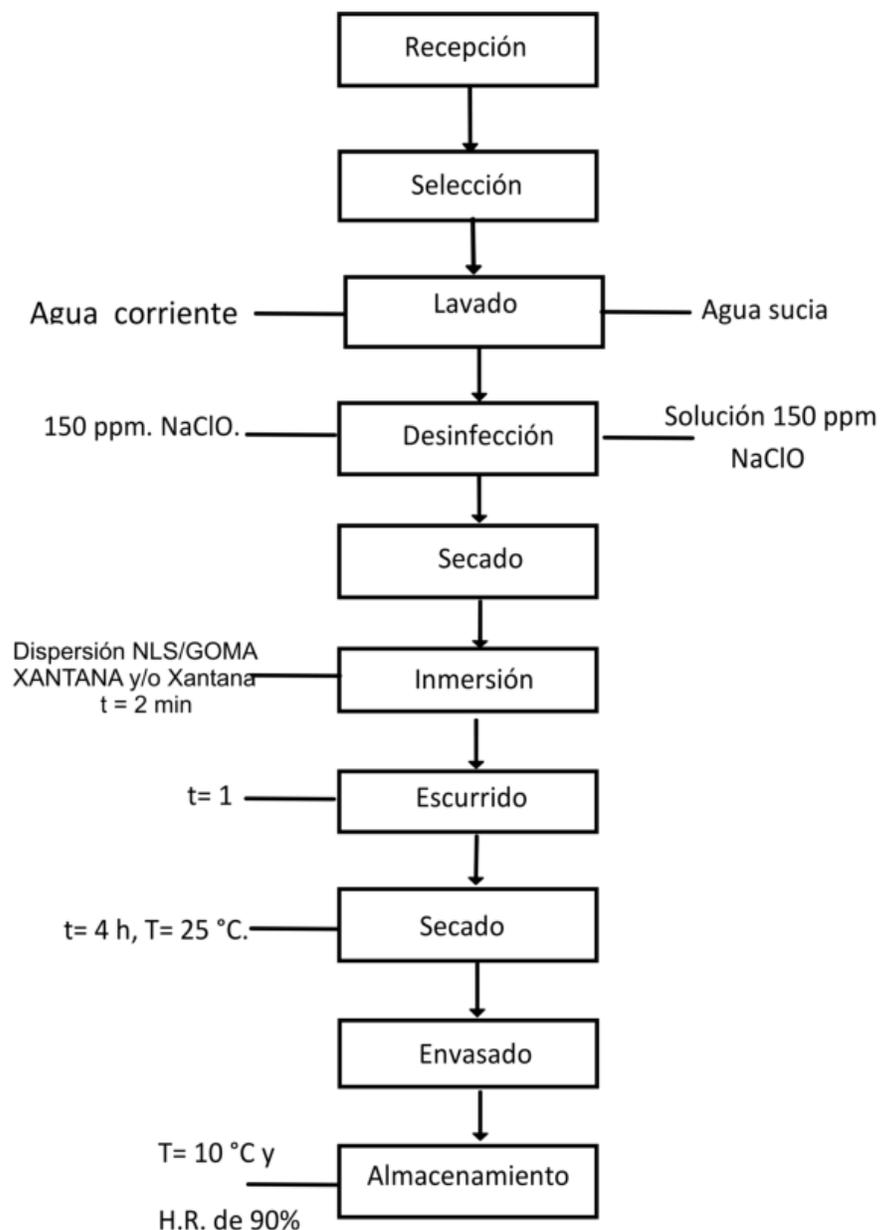


Figura 6.5 Procedimiento utilizado para los estudios de recubrimientos de guayaba.

6.13. Cambios fisicoquímicos en guayaba con NLS

6.13.1. Pérdida de peso

Un parámetro importante a considerar durante el almacenamiento refrigerado de frutas, es la pérdida de peso. Esta se determinó obteniendo la diferencia de peso del producto al inicio del almacenamiento con respecto al tiempo (cada tercer día), utilizando para ello una balanza digital (Ohaus Voyager modelo VP613C, USA). La siguiente ecuación describe la manera en que fue realizado el cálculo.

$$\% \text{ pérdida.de.peso} = \frac{\text{peso.de.la.muestra} - \text{peso.final}}{\text{peso.de.la.muestra}} * 100 \quad (6.10)$$

6.13.2. Cambios químicos

Para evaluar los cambios fisicoquímicos en guayaba por efecto del recubrimiento con NLS se siguió la metodología propuesta en los puntos 6.7.5 y 6.7.6 de este capítulo.

6.13.3. Cambios de color

Los cambios de color asociados a la maduración y a los efectos fisiológicos sobre la guayaba fueron medidos en el pericarpio empleando un colorímetro (MINOLTA con sensor CR-300, Japón), determinándose los cambios en L^* , a^* y b^* . Donde “a” va de negativo (verde) a positivo (rojo), y “b” en ordenadas van desde azul al amarillo y el parámetro “L” representa la luminosidad desde la reflexión nula ($L=0$) a reflexión difusa perfecta ($L=100$). El instrumento fue estandarizado por medio de una baldosa blanca de cerámica. Las medidas de color fueron realizadas en la piel en dos lados opuestos de la zona ecuatorial del fruto, con tres replicas por tratamiento.

Los valores L, a y b se utilizaron para calcular el tono (ángulo de Hue) a partir de la ecuación:

$$h^\circ = \arctan(a/b) \quad (6.7)$$

Donde 0 = rojo-púrpura, 90 = amarillo, 180 = azulado-verde y 270 = azul (McGuire, 1997).

6.13.4. Cambios de Firmeza

Los cambios en textura están asociados a la madurez de los frutos. En este estudio se determinaron los cambios en firmeza de las guayabas recubiertas utilizando un Equipo Universal (INSTRON modelo 4411, USA) con celda de carga de 5kN. La determinación se llevó a cabo utilizando una placa de compresión de 10 cm². La evaluación se realizó a una velocidad de cruceta de 150 mm/min y un 20 % de compresión. Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado y se reportó la fuerza máxima necesaria para llevar a cabo la compresión al 20 % del pericarpio del fruto.

6.14. Análisis estadístico para recubrimientos en guayaba

Los resultados obtenidos de la experimentación fueron analizados utilizando ANOVA de una o dos vías según fuese el caso, considerando un nivel de significancia de 0.5 %.

VII RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1. Resultados Nanocápsulas

7.1. Preparación y optimización de nanocápsulas

La determinación de condiciones de proceso y/o preparación aplicando diseños compuestos centrales ha sido utilizada ampliamente para evaluar múltiples parámetros sobre diversas variables de respuesta en muchas investigaciones y aplicaciones industriales del área de alimentos (Bas y Boyaci, 2007; Mirhossein *et al.*, 2008; Ahn, *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2008).

La Figura 7.1 representa los datos correspondientes a los gradientes de densidad obtenidos en función al contenido de poli- ϵ -caprolactona utilizado, comparado con nanoemulsión y nanoesferas. Se observa en la Figura 7.1 que las nanocápsulas tienen una densidad intermedia entre la nanoemulsión y nanoesferas, con lo que se corrobora que existe una asociación entre el polímero y el aceite formando una sola entidad, además que en cada lote únicamente se obtuvo un solo anillo, lo que indica que por el método de emulsificación-difusión es posible obtener exclusivamente nanocápsulas en la relación polímero/aceite utilizadas puesto que de acuerdo con Quitanar-Guerrero *et al.* (1998) y Abdelwahed *et al.* (2006), la presencia de una sola banda de densidad es indicativa de productividad de nanocápsulas efectiva.

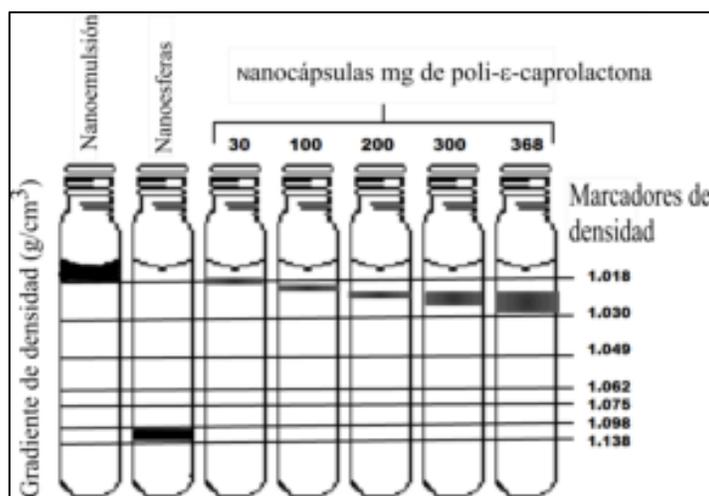


Figura 7.1 Comparación de densidad para nanoemulsión, nanoesferas y nanocápsulas (con diferentes concentraciones de poli- ϵ -caprolactona).

El Cuadro 7.1 resume las propiedades de las nanocápsulas formadas. La deposición de polímero sobre las nanogotas de aceite es acorde con el mecanismo de formación explicado por el método de emulsificación difusión (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1997a). En aplicaciones para alimentos las nanocápsulas presentan ventajas comparadas con otros sistemas nanoparticulados puesto que tienen un centro oleoso que puede tener múltiples funciones (Lertsutthiwong *et al.*, 2008).

Cuadro 7.1. Resultados respecto a la media de las nanocápsulas preparadas por lote experimental.

Lote No.	Velocidad de corte (rpm)	PVAL (%)	PCL (mg)	Tp (nm)	PDI	ζ (mV)	Densidad (g/cm ³)
2	636	5.0	200	1641±346	0.66±0.14	-14.92±0.83	1.021±0.0011
1	2000	2.5	100	655±288	0.46±0.04	-15.52±1.07	1.019±0.0010
9	2000	2.5	300	853±212	0.48±0.05	-19.6±0.25	1.024±0.0001
12	2000	7.5	100	1248±215	0.35±0.19	-17.92±1.07	1.020±0.0002
6	2000	7.5	300	1091±48	0.31±0.08	-18.39±0.20	1.023±0.0003
15	4000	0.8	200	473±18	0.16±0.02	-15.5±1.11	1.021±0.0010
17	4000	5.0	31	223±31	0.04±0.01	-18.51±1.23	1.018±0.0001
14	4000	5.0	200	259±21	0.04±0.02	-20.44±1.06	1.020±0.0005
18	4000	5.0	368	475±153	0.14±0.07	-20.06±2.87	1.024±0.0003
16	4000	9.2	200	782±110	0.05±0.02	-19.35±1.69	1.021±0.0001
10	6000	2.5	100	220±60.1	0.03±0.02	-13.3±1.22	1.019±0.0015
3	6000	2.5	300	219±10.7	0.13±0.02	-11.74±2.72	1.023±0.0008
7	6000	7.5	100	256±130	0.09±0.07	-13.80±2.55	1.020±0.0059
4	6000	7.5	300	136±3.7	0.12±0.04	-11.83±2.39	1.023±0.0035
8	7364	5.0	200	255±122	0.08±0.02	-5.61±1.52	1.021±0.0054

PVAL = alcohol polivinílico

PCL = poli-ε-caprolactona

Tp = tamaño de particular

PDI = índice de polidispersión

ζ = potencial zeta

7.1.1. Ajuste del modelo

El Cuadro 7.2 presenta el análisis de coeficientes del modelo cuadrático, los coeficientes de regresión y los p-valores indicativos del nivel de significancia de los factores. El análisis del modelo y la prueba de bondad de ajuste fueron utilizados para la selección del modelo adecuado (Lee Ye *et al.*, 2000; Namal-Senanayake y Shahidi, 2002; Chen, *et al.*, 2008).

Los resultados experimentales fueron modelados para un sistema lineal o cuadrático por el método de mínimos cuadrados, una vez que las funciones fueron obtenidas estas fueron probadas para la adecuación del modelo y pruebas de bondad de ajuste utilizando un análisis de varianza (ANOVA). El ANOVA del Cuadro 7.2 mostró que el modelo polinomial cuadrático representa adecuadamente el comportamiento experimental de los datos con coeficientes de regresión (R^2) de 0.95 para el tamaño de partícula, 0.90 para PDI, 0.88 para ζ y 0.87 para densidad. De acuerdo con Mune *et al.*, 2008, los modelos cuadráticos tienen buen ajuste y describen adecuadamente el comportamiento de los datos cuando los valores teóricos obtenidos son similares a los experimentales indicando un buen arreglo cuando $p \leq 0.05$ y $R^2 \geq 0.85$.

Cuadro 7.2. ANOVA y coeficientes de regresión sobre las variables de respuesta respecto a los factores estudiados.

Termino	Tamaño de partícula (nm)		PDI		ζ (mV)		Densidad (g/cm ³)	
	Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value	Coef	p-value
β_0	1467.04 ^a	0.000	1.33 ^a	0.015	3.67 ^a	0.000	1.019 ^a	< 0.001
β_1	-0.52 ^a	0.000	-3.98E ^{-4a}	0.000	-0.007 ^a	0.000	-6.34E ^{-7ns}	0.177
β_2	-8.18 ^a	0.000	-0.086 ^a	0.002	-2.78 ^a	0.001	-3.87E ^{-4ns}	0.070
β_3	1.24 ^{ns}	0.239	-0.001 ^{ns}	0.056	-0.036 ^{ns}	0.789	9.53E ^{-6a}	0.000
β_{11}	5.67E ^{-5a}	0.000	3.18E ^{-8a}	0.000	9.39E ^{-7a}	0.000	7.51E ^{-11a}	0.003
β_{22}	18.15 ^a	0.000	5.44 E ^{-3a}	0.001	0.18 ^a	0.000	6.14E ^{-5a}	0.000
β_{33}	1.49E ^{-3n.s}	0.469	2.87E ^{-6a}	0.004	5.71 ^a	0.025	3.94E ^{-8a}	0.000
β_{12}	-0.021 ^a	0.000	8.39E ^{-6a}	0.002	1.00E ^{-4ns}	0.057	2.19E ^{-8ns}	0.404
β_{13}	-1.017 ^{n.s}	0.463	1.01E ^{-7ns}	0.121	3.09E ^{-6ns}	0.068	-7.22E ^{-10ns}	0.272
β_{23}	-0.23 ^a	0.036	-6.91E ^{-5ns}	0.186	4.43E ^{-4ns}	0.739	-1.20E ^{-6a}	0.025
R^2	0.914	0.000	0.907	0.000	0.876		0.865	
R^2 -adj	0.898		0.890		0.854		0.840	

β_0 = Coeficiente de regresión β_i =Coeficiente lineal, β_{ii} = Coeficientes cuadráticos y β_{ij} = coeficientes de interacciones.

^a término significativo ($p < 0.05$)

^{n.s} término no significativo ($p > 0.05$)

7.1.2. Tamaño de Partícula

El tamaño de partícula es explicado por los términos del modelo mostrados en la Cuadro 7.2, los p-valores pequeños indican un efecto significativo de los efectos sobre las variables de respuesta. Las variables que tienen más influencia sobre el tamaño de partícula de nanocápsulas fueron los términos lineales de la velocidad de agitación y la concentración de alcohol polivinílico,

seguido por el término lineal para la concentración de poli- ϵ -caprolactona ($p < 0.05$). Los términos cuadráticos de la velocidad de corte y concentración de alcohol polivinílico también tienen un efecto significativo sobre el tamaño de partícula de nanocápsulas ($p < 0.05$) y la interacción que tiene un efecto mayor es la dada por la velocidad y concentración de alcohol polivinílico, en este sentido Flourey et al., 2000 y Yuan *et al.*, 2008, establecieron que la turbulencia formada por efecto de la velocidad de corte en emulsiones de nanoemulsiones tiene un efecto significativo sobre la reducción del tamaño de partícula. El efecto del alcohol polivinílico y velocidad de corte fue evaluada en la formación de nanopartículas por el método de emulsificación-difusión estableciéndose que el tamaño de partícula disminuye considerablemente entre 0.5 y 5 % de estabilizante, observándose pocos cambios por abajo del 5 % (Quintanar-Guerrero *et al.*, 1996). El tamaño de partícula más deseable obtenido en función de deseabilidad en Minitab[®] 14 fue de 300 nm para este caso y las condiciones establecidas fueron de 4000 rpm para la agitación, 5 % (p/p) de alcohol polivinílico y 292 mg de poli- ϵ -caprolactona.

En las Figura 7.2 (a-c) se muestran los efectos de las variables independientes sobre las dependientes mostrando los gráficos de superficie para el modelo polinomial cuadrático, en este se consideró uno de los factores a valor constante en el punto central.

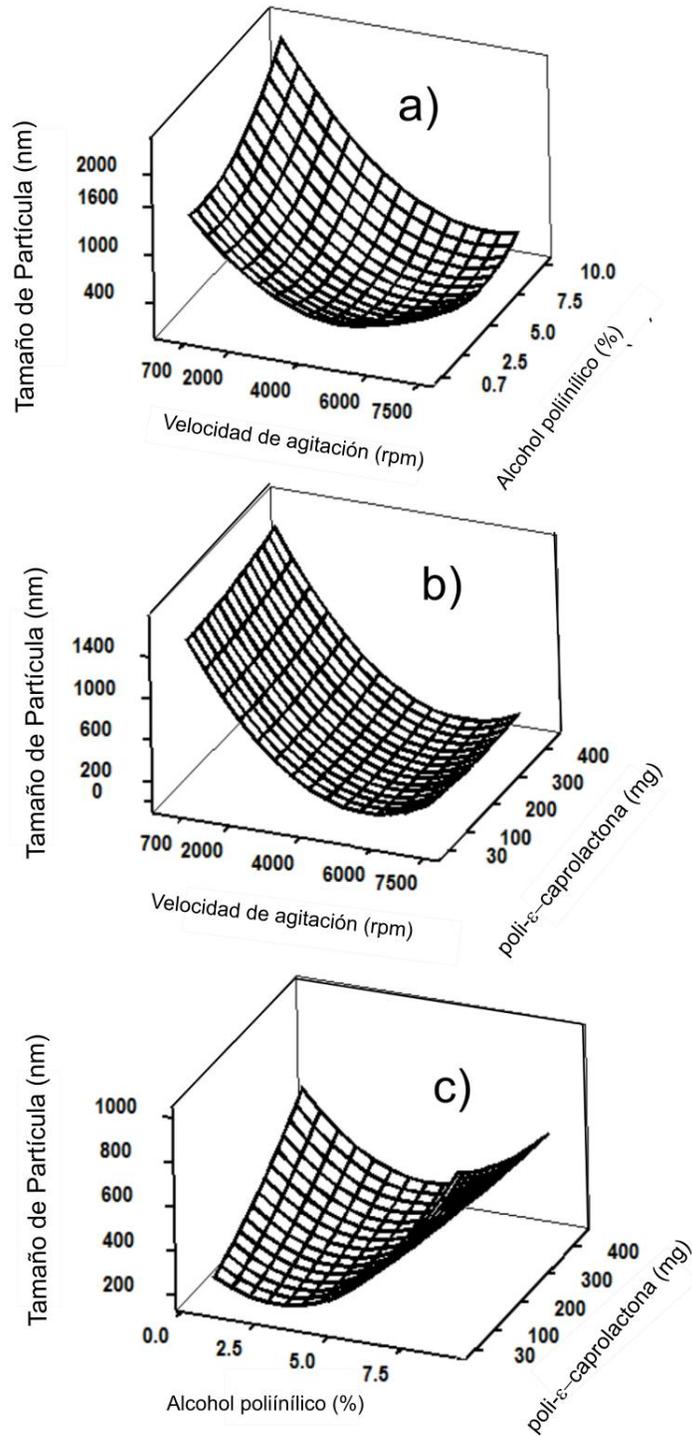


Figura 7.2. Superficie de Respuesta para el tamaño de partícula de nanocápsulas en función de: a) velocidad de agitación vs alcohol polivinílico a una concentración de 200 mg de poli-ε-caprolactona, b) velocidad de agitación vs poli-ε-caprolactona (mg) a 5 % de alcohol polivinílico y c) alcohol polivinílico vs poli-ε-caprolactona a 4000 rpm

La Figura 7.2(a) se muestra también que el tamaño de partícula se incrementa con la disminución de la velocidad de agitación y un incremento en la concentración de alcohol polivinílico por arriba de 5 % (p/p) con un máximo de 1880 nm a 700 rpm y 9 % de alcohol polivinílico respectivamente, además la superficie presenta una curvatura significativa alrededor del punto central con un mínimo en el tamaño de partícula de 130-350 nm. Se ha reportado que el incremento en la concentración de alcohol polivinílico incrementa el tamaño partícula de nanocápsulas, cuando la concentración de alcohol polivinílico es superior a 5 % (p/v), este fenómeno es explicado debido al incremento de la viscosidad del sistema (Moinard-Chécot *et al.*, 2008; Abdelwahed *et al.*, 2006). Por otro lado la Figura 7.2(b) muestra la curvatura debido a la velocidad de agitación, la cual es independiente de la concentración de poli-ε-caprolactona con un ligero efecto cuando se incrementa la concentración del polímero. Un comportamiento similar es mostrado con respecto a la concentración de alcohol polivinílico y poli-ε-caprolactosa (Fig 7.2(c)) no mostrándose un efecto de los términos cuadráticos y variables independientes mostrándose un mínimo alrededor de los puntos centrales. La ecuación de segundo orden obtenido en función a los términos significativos en la ecuación son los siguientes:

$$\widehat{T_p} = 1467 - 0.52X_1 - 8.18X_2 + 5.67 \cdot 10^{-05}X_1^2 + 18.15X_2^2 - 0.021X_{12} + \varepsilon_i \quad (7.1)$$

7.1.3. Índice de polidispersión (PDI)

Las Figuras 7.3 (a-c) presentan la superficie de respuesta del efecto de las variables independientes sobre el PDI. Las Figuras 7.3 (a-c) muestran la superficie de respuesta de las variables independientes sobre el PDI. La Figura 7.3(a) muestra la variación del PDI por efecto de la velocidad de agitación y la concentración de alcohol polivinílico dejando constante la poli-ε-caprolactona (200 mg), en esta se observa que el PDI se incrementa conforme aumenta la velocidad de agitación a partir de los 4750 rpm con un ligero efecto de la concentración de estabilizante.

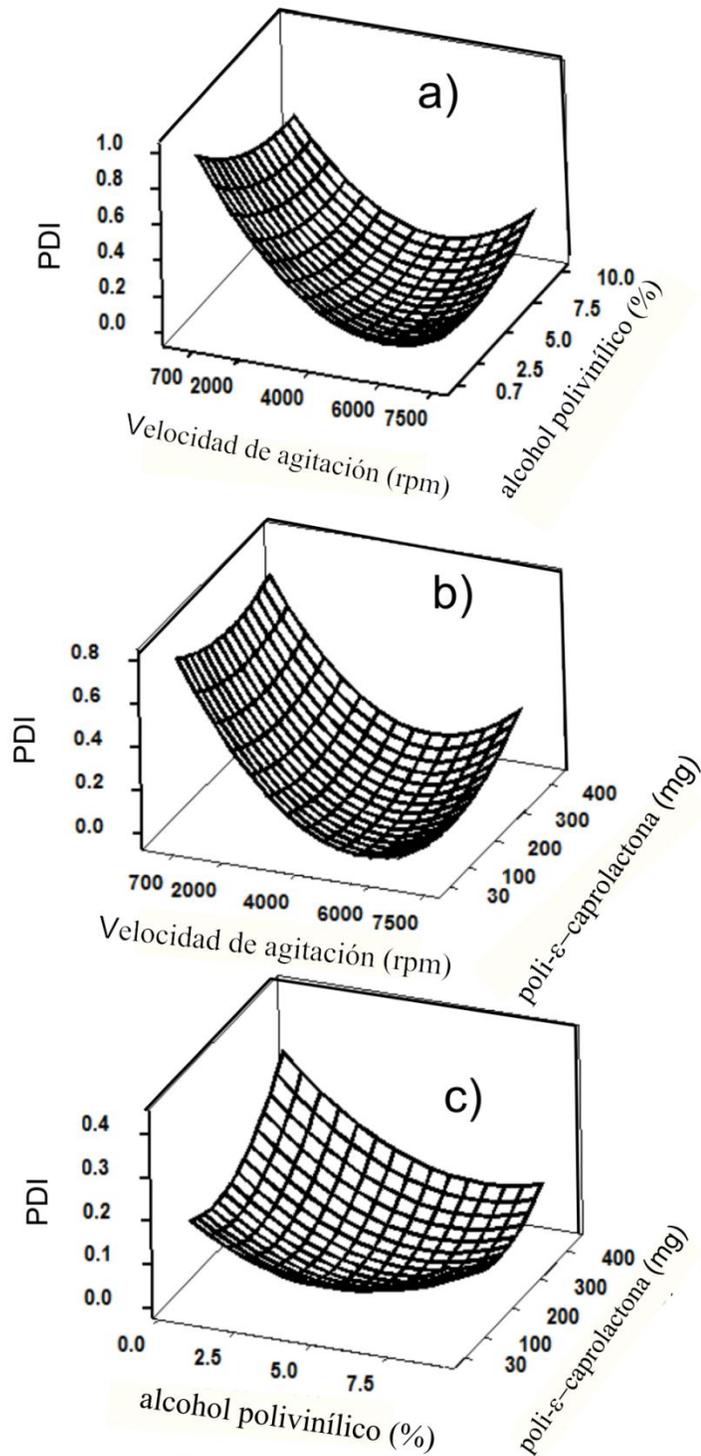


Figura 7.3. Superficie de Respuesta PDI de nanocápsulas en función de: a) velocidad de agitación vs alcohol polivinílico a una concentración de 200 mg de poli-ε-caprolactona, b) velocidad de agitación vs poli-ε-caprolactona (mg) a 5 % de alcohol polivinílico y c) alcohol polivinílico vs poli-ε-caprolactona a 4000 rpm.

En la Figura 7.3 (b) se observa que el PDI es mínimo cuando la velocidad de agitación se incrementa hasta la concentración de aproximadamente 210 mg de poli-ε-caprolactona. Un valor mínimo en el PDI es indicativo de que el tamaño de partícula es más uniforme en el punto central con respecto de la velocidad de agitación. El efecto de la variabilidad de las concentraciones de alcohol polivinílico y poli-ε-caprolactona son mostrados en la Fig 7.3(c), mostrando una disminución del PDI en los puntos centrales, con una mejor distribución de tamaños al ser más estrecha, atribuido en parte al tipo de aceite y al control de las condiciones de preparación, pudiéndose establecer que valores de entre 0.06 y 0.25 son excelentes cuando el criterio de optimización es minimizar la respuesta (Bala *et al.*, 2005; Zigoneanu 2008; Mirhossein *et al.*, 2008). La ecuación de segundo orden para el PDI (Y_2) en función a los términos significativos es la siguiente:

$$\widehat{PDI} = 1.33 - 3.98^{-04}X_1 - 0.09X_2 + 3.01^{-08}X_1^2 + 5.44^{-03}X_2^2 + 2.87^{-06}X_3^2 + 8.39^{-06}X_{12} + \varepsilon_i \quad (7.2)$$

7.1.4. Potencial zeta (ζ)

Las Figuras 7.4 (a-c) muestran la superficie de respuesta de las variables independientes estudiadas. La Figura 7.4(a) muestra que el ζ de -21.70 se obtiene cuando la velocidad es de aproximadamente 4000 rpm y se mantiene a una concentración de 5 % para PVAL. De acuerdo con lo mostrado en el Cuadro 7.1 en este trabajo los factores que tuvieron un mayor efecto sobre el ζ fueron los términos lineal de la velocidad de corte y la concentración de estabilizante ($p \leq 0.0001$), el efecto de la concentración de alcohol polivinílico se explica por la modificación de la carga que a su vez es ayudado por la energía utilizada para provocar la reducción del tamaño de partícula. Todos los términos cuadráticos tienen un efecto significativo positivo, sin embargo solo la velocidad de corte con respecto al alcohol polivinílico y la poli-ε-caprolactona vs alcohol polivinílico tienen un efecto significativo sobre el ζ .

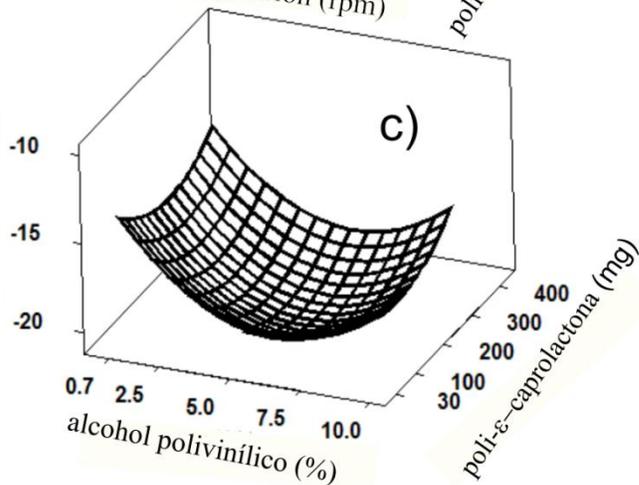
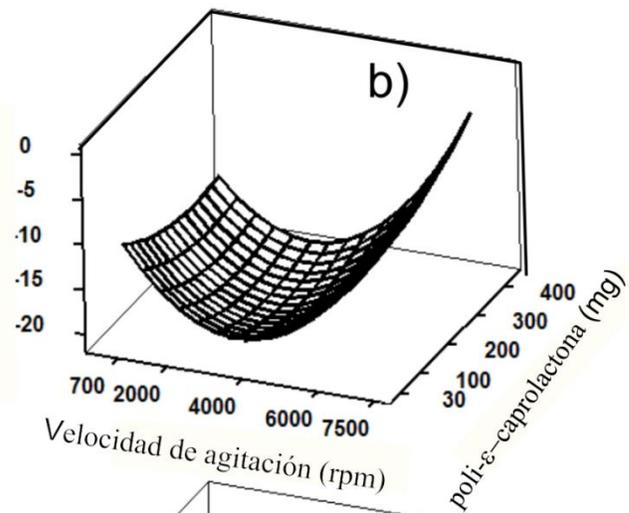
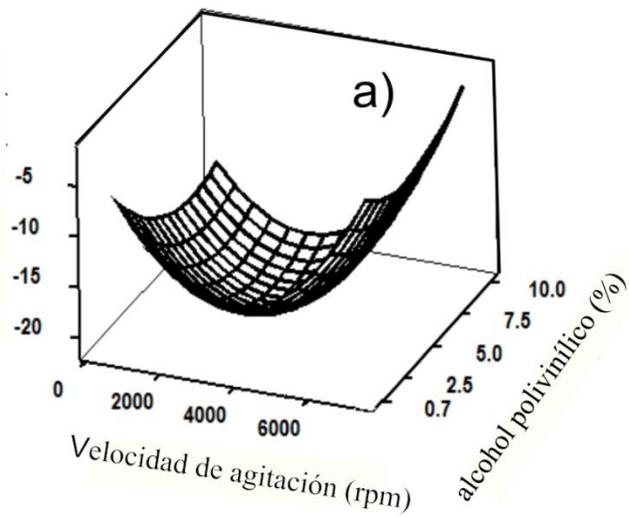


Figura 7.4. Superficie de Respuesta PDI de nanocápsulas en función de: a) velocidad de agitación vs alcohol polivinílico a una concentración de 200 mg de poli- ϵ -caprolactona, b) velocidad de agitación vs poli- ϵ -caprolactona (mg) a 5 % de alcohol polivinílico y c) alcohol polivinílico vas poli- ϵ -caprolactona a 4000 rpm.

El valor óptimo para el ζ ($Y_3 = -20.85$) se obtienen para una velocidad de agitación de 4000 rpm, 5 % de PVAL y 211 mg de PCL, que fueron obtenidos en función a la superficie de respuesta por prueba de deseabilidad (0.582). La ecuación de segundo orden (4) para el ζ en función a los términos significativos se muestra a continuación:

$$\hat{\zeta} = 3.67 - 7.55^{-03}X_1 - 2.78X_2 - 9.39^{-07}X_1^2 + 0.18X_2^2 + 5.70^{-05}X_3^2 + \varepsilon_i \quad (7.3)$$

7.1.5. Densidad (ρ_{nc})

En la densidad tanto la velocidad de corte como la concentración de alcohol polivinílico no tuvieron un efecto significativo de acuerdo con el Cuadro 7.2. La concentración de poli- ϵ -caprolactona fue altamente significativa (< 0.0001) mostrándose además efectos positivos de los factores involucrados en la densidad, además de la concentración de poli- ϵ -caprolactona, la velocidad de agitación tuvo un efecto significativo ($p = 0.002$), esto debido probablemente a que esta variable contribuye al proceso de difusión provocando con ello la formación de la nanocápsula envuelta en poli- ϵ -caprolactona. Los efectos cuadráticos no tuvieron efecto significativo sobre la densidad ($p > 0.05$) (Cuadro 7.2), las interacciones entre la velocidad y la concentración de alcohol polivinílico tuvieron un efecto significativo sobre la densidad. En función a los términos significativos el factor primario que determina el valor de densidad es la concentración de alcohol polivinílico. La optimización de la densidad por deseabilidad considerado el promedio es mejor ($Y_4=1.022$ g/cm³) y se puede predecir a 4000 rpm, 5 % de alcohol polivinílico y 185 mg de poli- ϵ -caprolactona. La ecuación (5) corresponde a los coeficientes significativos para la densidad.

$$\rho_{nc} = 1.019 + 9.53^{-06}X_3 + 7.51^{-11}X_1^2 + 6.13^{-05}X_2^2 - 3.94^{-08}X_3^2 + \varepsilon_i \quad (7.4)$$

7.1.6. Establecimiento de condiciones de preparación de nanocápsulas

Para establecer las condiciones de preparación más deseables se siguió un procedimiento numérico con la finalidad de predecir en función a los modelos cuadráticos obtenidos y mejor respuesta esperada, las condiciones predichas de preparación, se considero para ello un valor de deseabilidad ($D = 0.90$), tomando

en cuenta que en el proceso de preparación debe de: minimizarse el tamaño de partícula y PDI, maximizandr el valor absoluto del potencial zeta y considerar un valor medio de la densidad. La optimización dió como resultado las condiciones de preparación de nanocápsulas por el método de emulsificación-difusión y que fueron: 3977 rpm, 5.1 % de alcohol polivinílico y 256 mg de poli- ϵ -caprolactona. Obteniéndose a estas condiciones, valores predichos para las respuestas: tamaño de partícula 250 nm, PDI de 0.043, ζ de -20.02mV y densidad de 1.021 g/cm³.

7.1.7. Morfología de Nanocápsulas

La presencia de entidades vesiculares y por ende evidencia de formación de nanocápsulas fue observada en micrografías y los efectos de las variables también pudieron ser caracterizadas.

La Figura 7.5 muestra las micrografías correspondientes a la formación de nanocápsulas de acuerdo con las condiciones óptimas que correspondieron a los puntos centrales del diseño experimental. Las micrografías son la mejor evidencia visual de que se obtuvieron entidades capsulares, que además se correlacionaron con el tamaño de partícula y densidad de las nanocápsulas preparadas en condiciones deseables de preparación que llevaran a obtener la menor talla de partíula posible por el método de emulsificación-difusión.

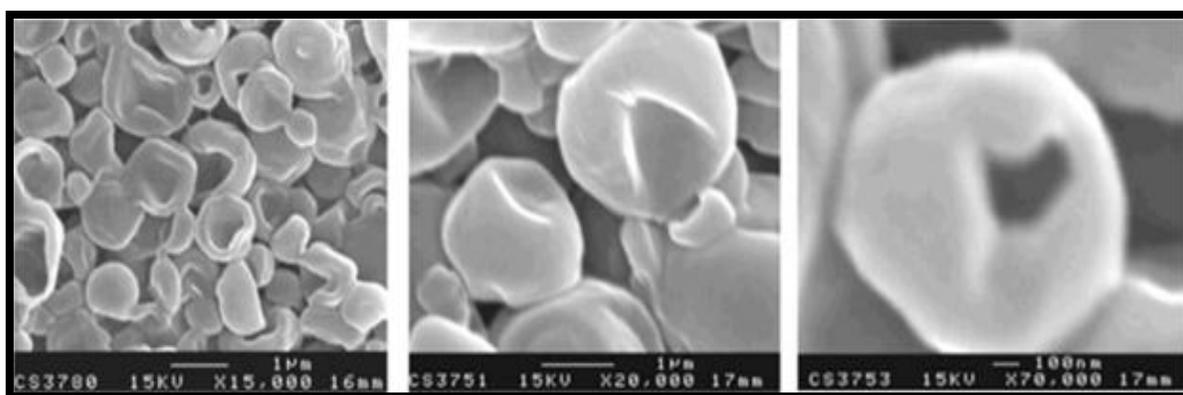


Figura 7.5 Micrografías de nanocápsulas a condiciones de preparación óptimas.

7.1.8. Verificación del modelo y versatilidad del método

Una vez establecida la repetibilidad de las condiciones se llevó a cabo la verificación de la versatilidad del método utilizando los disolventes orgánicos acetato de etilo y metil etil cetona; como estabilizantes alcohol polivinílico y pluronic-127 aceite de girasol, soya, β -caroteno y dl- α -tocoferol a una concentración de 0.5mL.

El cuadro 7.3 muestra que cuando se utiliza acetato de etilo como disolvente orgánico, no hay diferencia estadísticamente significativa sobre el tamaño de partículas, PDI y ζ en relación a los resultados predichos en el modelo de superficie de respuesta ($p > 0.05$). Además se demostró que cuando se emplea pluronic-127 como estabilizante hay un incremento en la estabilidad de las dispersiones mostrada por el aumento en el valor absoluto de ζ , mostrando tamaños de partícula menores (≈ 220 nm). Cuando se emplea metil etil cetona como disolvente las nanocápsulas formadas tuvieron tamaños de partícula menores (69 nm con pluronic-127) y un ζ de -10mV, indicativo de inestabilidad del sistema, correlacionada con la menor densidad de las nanocápsulas. Los resultados obtenidos indican que los valores experimentales corresponden con las condiciones deseables de preparación de nanocápsulas dando como resultado valores de tamaño de partícula de 298 nm, PDI de 0.047, ζ de 19.85 mV y 1.01 g/cm³ para densidad.

El Cuadro 7.3 muestra también que los resultados obtenidos son válidos no sólo para aceites comestibles, sino también para otros ingredientes como el β -caroteno y dl- α -tocoferol. Además se estableció que el método es robusto y puede ser utilizado para otras condiciones de operación. En el caso de los activos utilizados se encontró diferencia estadísticamente significativa en la estabilidad ($p \leq 0.05$) con respecto a los valores predicho. Las nanocápsulas de dl- α -tocoferol tuvieron un tamaño de partícula promedio de 248 nm y ζ de -32.1 mV, mientras que las de β -caroteno de 287 nm y ζ de -17.8 indicativos de una mayor estabilidad del sistema.

Cuadro 7.3 Caracterización de nanocápsulas formadas con otros materiales y empleados en la validación del método de emulsificación-difusión.

Aceite	Estabilizante (5 % w/v)	Disolvente	Densidad (g/cm ³)	Tp (nm)	PDI	ζ (mV)
Girasol	PVAL	AE	1.019±0.001	332±23	0.08±0.01	-15.5±0.45 ^a
Girasol	Pluronic-127	AE	1.021±0.001	228±6	0.10±0.01	-27.5±1.11
Soya	PVAL	AE	1.019±0.001	355±27	0.09±0.03 ^a	-27.0±0.75
Soya	Pluronic-127	AE	1.019±0.001	223±9	0.10±0.01 ^a	-31.4±1.07 ^a
Girasol	PVAL	MEC	1.017±0.001	190±3 ^a	0.03±0.20	-9.10±0.38 ^a
Girasol	Pluronic-127	MEC	1.017±0.001	69±6 ^a	0.07±0.01	-11.0±0.52 ^a
Soya	PVAL	MEC	1.017±0.001	203±9 ^a	0.08±0.01	-9.42±0.50 ^a
Soya	Pluronic-127	MEC	1.016±0.001	83±10 ^a	0.15±0.02 ^a	-11.5±0.40 ^a
DL-α-tocoferol	Pluronic-127	AE	1.022±0.004	248±7	0.15±0.03	-38.1 ± 1.71
β-carotenol	Pluronic-127	AE	1.019±0.001	287±13	0.076±0.02	-27.8±1.20

^a diferencia significativa (p > 0.05).

PVAL = alcohol polivinílico

AE = acetato de etilo

MEC = metil etil cetona

Tp = tamaño de partícula

PDI = índice de polidispersión

ζ = Potencial zeta

7.2. Sistemas con α-tocoferol

7.2.1. Nanocápsulas

Las nanocápsulas fueron preparadas empleando 2 g/L de dl-α-tocoferol y 200 mg de poli-ε-caprolactona de acuerdo con las condiciones más deseables obtenidas del modelo compuesto central analizado, el disolvente utilizado para preparar la fase orgánica fue acetato de etilo.

La Figura 7.6 muestra la distribución de tamaños de partícula de las nanocápsulas formadas. El tamaño de partícula en promedio fue de 283 nm, con un mínimo de 122 nm y máximo de 531 nm, lo que a su vez se ve reflejado en la amplitud de la curva mostrada e indicativo de las variaciones en el PDI que fue de 0.150.

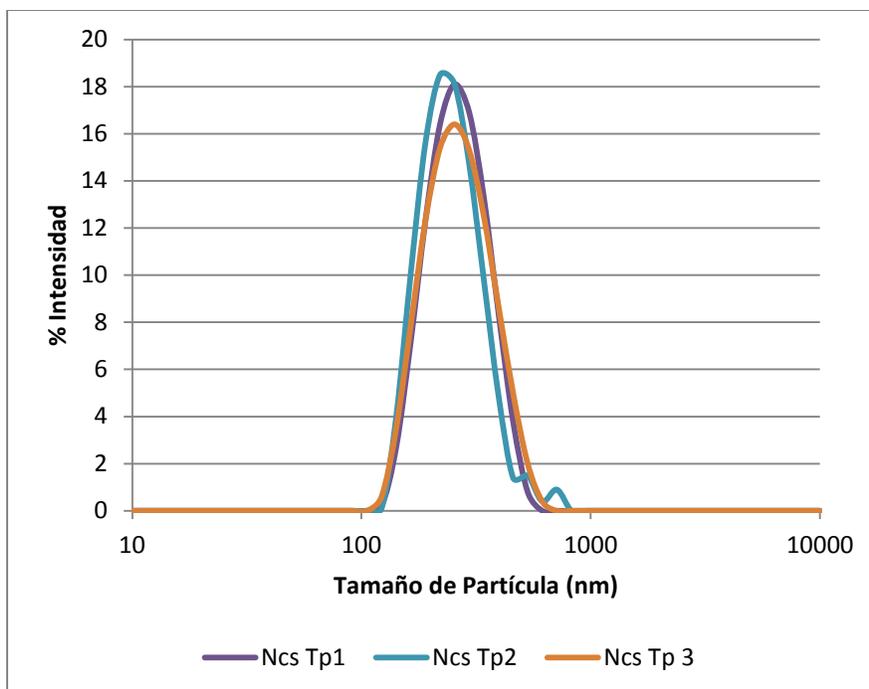


Figura 7.6 Distribución de tamaño de partícula nanocápsulas preparadas a 4000 rpm, 5 % pluronic F-127 (5 %) y 186 mg de poli- ϵ -caprolactona.

Una vez verificada la talla submicrónica y el PDI de la suspensión, se procedió a desarrollar el recubrimiento en el que se pudieran mezclar las nanocápsulas de dl- α tocoferol con un sistema acuoso formador de película. Se encontró que empleando goma xantana al 0.3 % se obtiene un sistema estable con ζ de (-)60.5 mV que forma un recubrimiento, que aparentemente tiene un distribución uniforme en el fruto.

7.2.2. Nanoemulsión

Para la preparación de esta dispersión se encontró que el número de ciclos de homogenización es un factor determinante para pasar de tallas micro- a nanométricas (Figura 7.7). La idea de preparar este sistema es determinar si el tener un sistema recubierto (nanocápsulas) y uno libre (nanoemulsión) representa alguna conveniencia sobre la efectividad del antioxidante (dl- α -tocoferol) para disminuir el índice de oscurecimiento en manzana o bien si la talla submicrónica es el factor determinante en el recubrimiento.

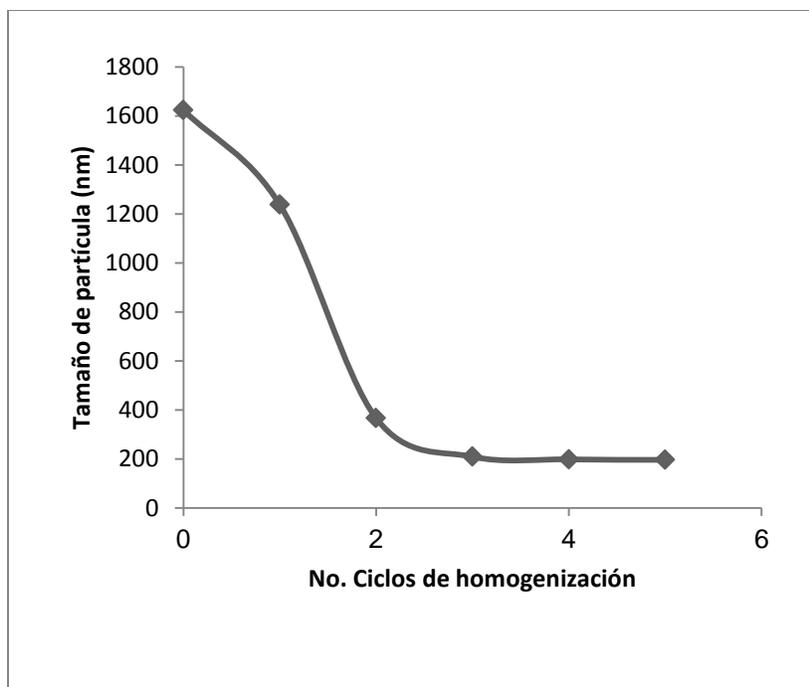


Figura 7.7 Tamaño de partícula de nanoemulsiones en función a los ciclos de homogenización.

Los resultados de tamaño de partícula en función al número de ciclos mostró que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes ciclos (comparación de medias de los tratamientos, Tukey, $\alpha = 0.05$), las mayores diferencias fueron encontradas en los tres primeros ciclos (transición micro-nano) a partir de este ciclo el tamaño de partícula permaneció prácticamente sin variación. El tamaño de partícula promedio después del proceso fue de aproximadamente 200 nm. Flourey *et al.* (2000) y Yuan *et al.* (2008) reportaron que existe una reducción en el tamaño de partícula por efecto de la velocidad de agitación y la turbulencia generada en emulsiones y nanoemulsiones con ciclos de homogenización semejantes a los mostrados en este trabajo. Tan y Nakajima (2005) llevaron a cabo la preparación de nanodispersiones por el método de emulsificación- evaporación realizando tres ciclos de homogenización, logrando disminuir el tamaño de partícula a valores entre 40 a 250 nm, estos datos coinciden con los alcanzados en este estudio. Para garantizar una talla submicrónica y una distribución homogénea del tamaño de partícula, la nanoemulsión se preparó con 5 ciclos de dispersión.

En la Figura 7.8 se observa la distribución de tamaños de partícula con respecto al porcentaje en volumen para las tres dispersiones preparadas, emulsión, nanoemulsión y nanocápsulas.

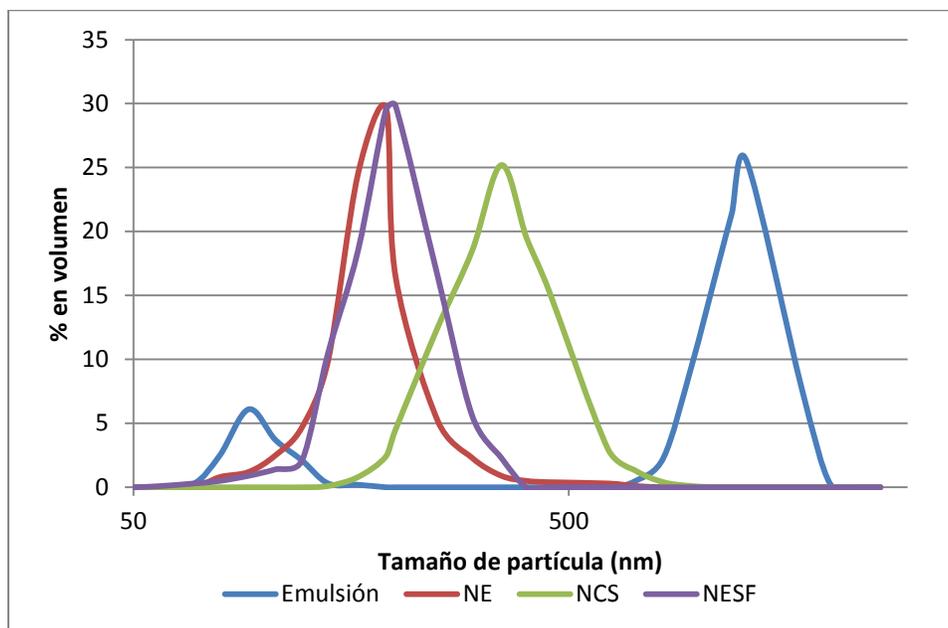


Figura 7.8 Distribución de tamaño de partícula para la emulsión (E), nanoemulsión (NE), nanocápsulas (NCS) y nanoesferas (NESF).

La emulsión tuvo un tamaño de partícula promedio de 1620 nm y PDI de 0.197, con un comportamiento bimodal, representado por partículas de menor tamaño (98 nm en promedio) lo que puede ser importante en la agregación de partículas durante el almacenamiento. Los sistemas de talla submicrónica (nanoemulsión, nanocápsulas y nanoesferas) tuvieron un comportamiento monomodal con tamaños de partícula promedio de 194, 266 y 155 nm y PDI de 0.223, 0.134 y 0.066, respectivamente. Relkin *et al.*, (2008) reportaron comportamientos monomodales para nanoemulsiones de α -tocoferol preparadas por el método de homogenización en caliente con tamaños de partícula menores a 200 nm. Yuan *et al.*, (2008) obtuvieron comportamientos monomodales en la preparación de nanoemulsiones de β -caroteno por procesos de homogenización, mientras que Yin *et al.*, (2009) mostraron comportamientos bimodales por el método de desplazamiento de disolvente. Aparentemente, la distribución del tamaño de partícula de las dispersiones depende en gran medida del proceso

utilizado, de la asociación biopolímero-activo y del tipo y concentración del surfactante utilizado (Bilbao-Sáinz *et al.* 2010).

7.2.3. Estabilidad de las dispersiones sin goma

Previo a la adición de goma xantana como ingrediente formador de recubrimiento con permeabilidad selectiva, se llevó a cabo la evaluación de la estabilidad de las dispersiones durante almacenamiento considerando como parámetros de estabilidad el tamaño de partícula, PDI y ζ . Al momento de la preparación, los sistemas evaluados tuvieron un tamaño de partícula de: 258 nm (nanocápsulas), 298 nm (nanoesferas), 198 nm (nanoemulsión) y 1618 nm (emulsión) y con densidad de 1.019 g/cm³ para las nanocápsulas, 1.034 g/cm³ para nanoesferas y \leq 1.018 g/cm³ para emulsión y nanoemulsión.

La Figura 7.9 muestra el comportamiento de los sistemas coloidales estudiados durante almacenamiento, se observa que los sistemas de talla submicrónica permanecieron sin importantes cambios de talla de partícula e PDI durante las 8 semanas de almacenamiento. En contraste, la emulsión tuvo un aumento significativo en el PDI, lo que podría sugerir fenómenos de agregación de partículas (e. g.coalescencia, floculación, etc.) lo que modificó la distribución de las mismas.

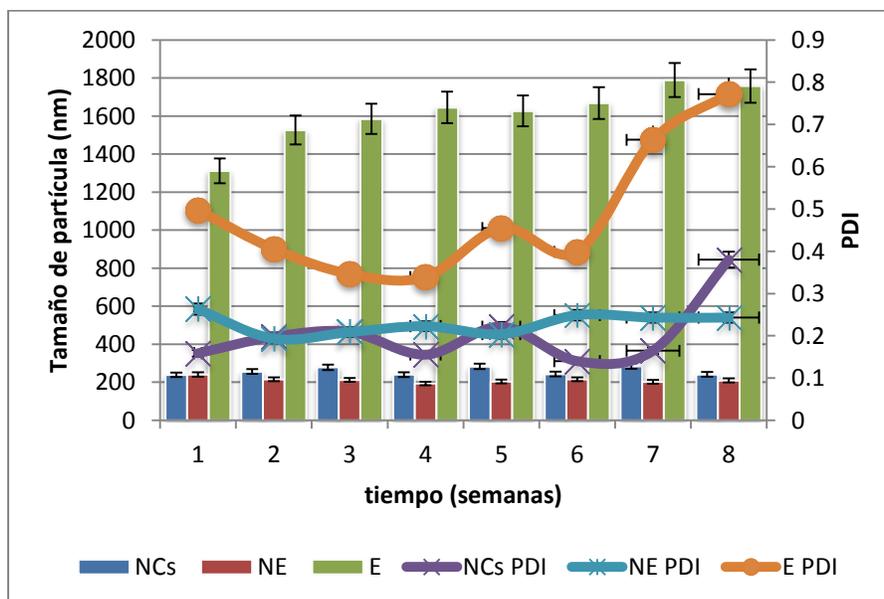


Figura 7.9 Cambios de tamaño de partícula e Índice de polidispersión de los sistemas: nanocápsulas (NCs), nanoemulsión (NE), emulsión (E).

En la Figura 7.10 se muestran los cambios del ζ de las dispersiones durante 8 semanas. En general, el ζ promedio para las nanocápsulas y nanoesferas fue de -43 y 45 mV, no mostrando variaciones significativas con respecto al tiempo de almacenamiento ($p=0.446$). Siendo además importante resaltar que estos presentan una buena estabilidad (considerada a ζ de entre -41-50 mV) (Schramm, 2005). Además en el gráfico es importante resaltar que las NCS permanecieron sin variación durante las 3 primeras semanas de almacenamiento, disminuyendo su ζ ligeramente después de este periodo, indicativo de que no existen aglomerados y es estable al almacenamiento. La nanoemulsión obtenida mostró diferencia estadísticamente significativa respecto a los otros dos sistemas de talla submicrónica en cuanto al valor de ζ con un valor promedio de $\zeta = -54.32$ y ($p=0.126$), estabilizándose transcurridas 3 semanas de almacenamiento. La emulsión mostró los menores valores de ζ , indicativos de una muy buena estabilidad del sistema, las principales diferencias se ubicaron en la primera y última semana de almacenamiento. Bala *et al.*, (2005) han establecido que el ζ es una medida del grado de repulsión entre partículas similarmente cargadas en una dispersión, de tal forma que un valor absoluto alto representa un sistema electrocinéticamente estabilizado. Mirhosseini *et al.*, (2008) mencionan que potenciales con valores absolutos menores de 25 mV son indicativos de probable agregación de las dispersiones. Por otro lado, Tewa-Tagne *et al.*, (2007) mencionaron que cuando se utiliza poli- ϵ -caprolactona como polímero encapsulante se esperan valores negativos para el ζ , debido a la carga del grupo terminal del polímero.

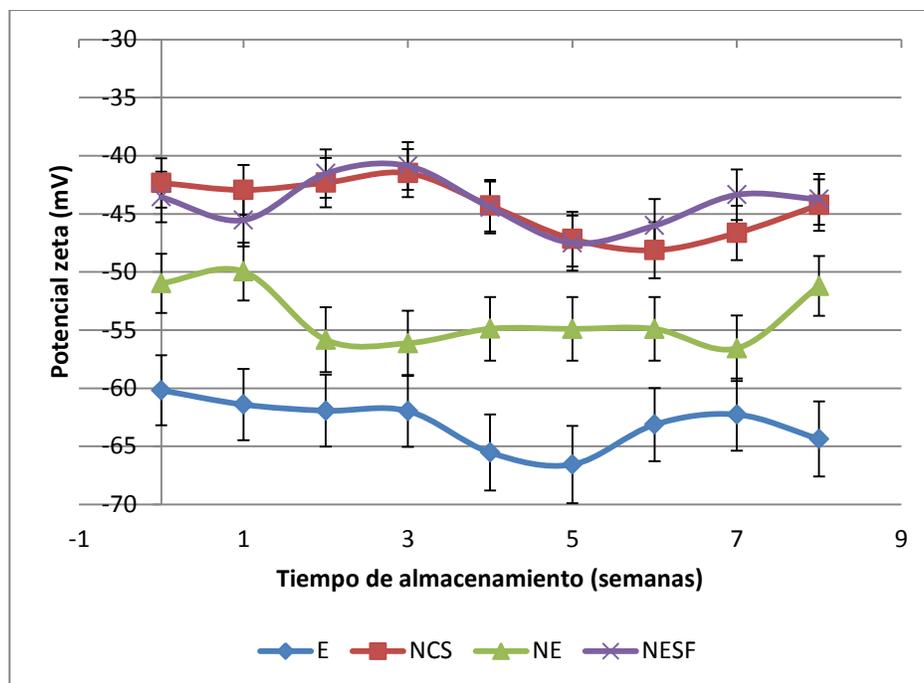


Figura 7.10 Variación en el ζ , durante el almacenamiento

7.2.4. Estabilidad de las dispersiones con goma xantana

El comportamiento de las suspensiones en las que se emplea goma xantana como polisacárido auxiliar en la modificación de permeabilidades formación de película en conjunto con los sistemas desarrollados y que fueron empleados como sistemas finales para formar los recubrimientos es mostrado en la Figura 7.11. Se distinguen variaciones mínimas en el tamaño de partícula para la nanoemulsión/goma xantana, y nanocápsulas/goma xantana durante las 8 semanas en que se llevó a cabo el monitoreo. La emulsión/goma xantana tuvo fluctuaciones durante el periodo de almacenamiento con intervalos de confianza de $0.34 < 0.47 > 0.57$.

En la misma Figura 7.11 se observa el comportamiento del PDI respecto al tiempo de almacenamiento, no habiéndose encontrado diferencia estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) para nanocápsulas con intervalos de confianza de: $0.22 < 0.25 > 0.27$. La nanoemulsión presentó el mismo comportamiento al tiempo cero que la emulsión con un PDI que disminuyó en la primera semana, estabilizándose y permaneciendo sin variaciones significativas el

resto del tiempo de almacenamiento con intervalos de confianza de $0.26 < 0.28 > 0.31$.

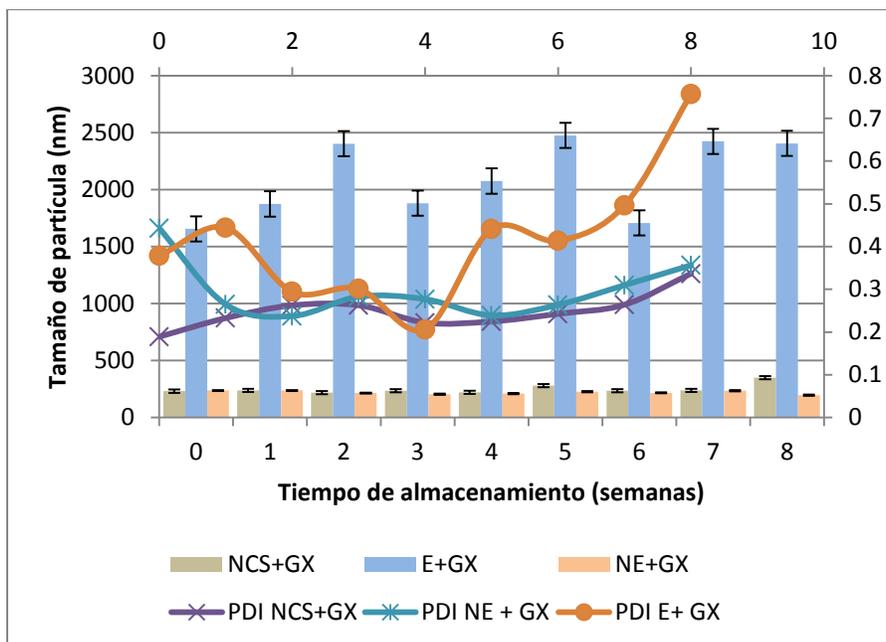


Figura 7.11. Fluctuación de tamaño de partícula por efecto de la incorporación de goma xantana a los sistemas: nanocápsulas/goma xantana (NCS + GX), emulsión/goma xantana (E + GX), nanoemulsión/goma xantana (NE + GX).

La Figura 7.12 muestra las variaciones en el ζ de los sistemas estudiados con un contenido de goma xantana al 0.3 %. Es posible observar que tanto la emulsión como la nanoemulsión no se ven afectadas por la incorporación de goma xantana; sin embargo, las nanocápsulas disminuyen su ζ en un 18.3 % después de 3 semanas tendiendo a estabilizarse a su condición inicial después de transcurridas 4 semanas, esto muy probablemente es debido a las interacciones de la poli- ϵ -caprolactona con los grupos funcionales de la goma considerando que esta se comporta como un surfactante aniónico. A pesar de este cambio, las nanocápsulas fueron estables durante el tiempo de almacenamiento debido a que los valores de potencial zeta siempre estuvieron por arriba del umbral de agregación.

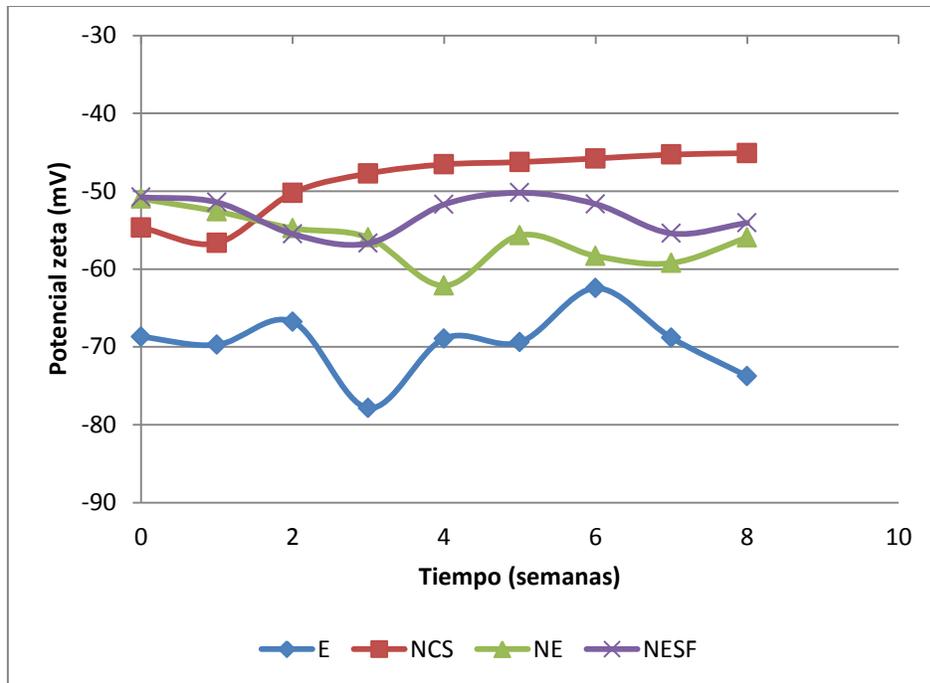


Figura 7.12 Variación en el potencial zeta en muestras con 0.3 % de goma xantana

7.2.5. Morfología de las dispersiones

Un aspecto importante a evidenciar es la arquitectura de los sistemas desarrollados, en particular la presencia de la membrana envolvente de las nanocápsulas. En la Figura 7.13 se muestra la morfología que presentaron los diferentes sistemas estudiados, así como una tendencia del tamaño de partícula de los mismos.

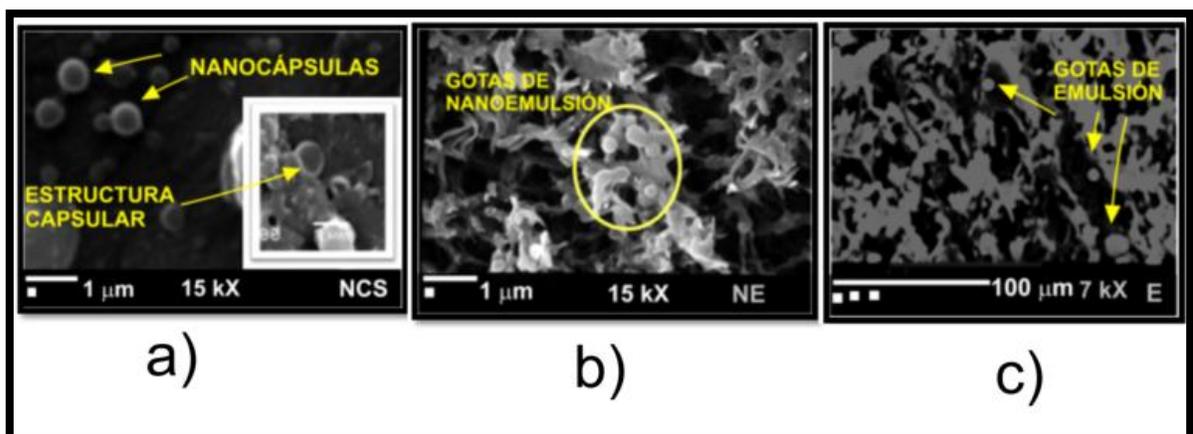


Figura 7.13. Morfología de los sistemas desarrollados (a) NCS = nanocápsulas, (b) NE = nanoemulsión y (c) E = emulsión.

En la Figura 7.13(a) se presenta la estructura de las nanocápsulas, confirmandose que son de talla submicrónica. Las figuras 7.13 (b-c) muestran la morfología de la nanoemulsión y emulsión, se distinguen los glóbulos de talla nanométrica y micrométrica respectivamente (1-5 μm) formados por el dl- α -tocoferol. El recuadro de la Fig 7.13(a) confirma la arquitectura de las nanocápsulas constituida por un centro oleoso (dl- α -tocoferol) submicrónico envuelto por la membrana del polímero (poli- ϵ -caprolactona).

7.3. Evaluación del efecto de recubrimientos en manzana fresca cortada

Una vez desarrollados y evaluados los recubrimientos a utilizar para evaluar la efectividad en la inhibición del oscurecimiento enzimático y demás parámetros fisicoquímicos, se procedió a realizar una evaluación visual del aspecto de la manzana fresca cortada previo al almacenamiento y después de este, por lo que a continuación se presentaran los cambios en calidad visual, para posteriormente correlacionarlos con los cambios fisicoquímicos, índice de oscurecimiento y cambios enzimáticos.

7.3.1 Calidad visual de manzana tratada con diferentes recubrimientos con dl- α -tocoferol

La Figura 7.14 muestra el aspecto externo que presentaron las rebanadas de manzanas después de ser sometidas a los diferentes tratamientos con sistemas de talla submicrónica.



Figura 7.14. Aspecto visual de las muestras de manzana tratada con sistemas submicrónicos.

Los sistemas donde se aplicaron recubrimientos de talla submicrónica mostraron una apariencia más clara del tejido con respecto a la manzana sin tratamiento, esto se atribuyó al cambio en la dispersión de luz por efecto del tamaño de partícula de estos recubrimientos, lo que imparte al producto una mayor luminosidad inicial y por ende una apariencia menos oscura aunque también puede deberse a un probable control de los mecanismos de oscurecimiento.

La Figura 7.15 muestra el aspecto visual para las muestras al inicio del almacenamiento y posterior a la aplicación del recubrimiento, en la parte central se muestra la apariencia visual del control. En estas imágenes es posible resaltar la diferencias que presentaron los sistemas de talla submicrónica, donde se aprecia un aspecto más claro y luminoso, respecto al control, emulsión, solución de TPGS y goma xantana.

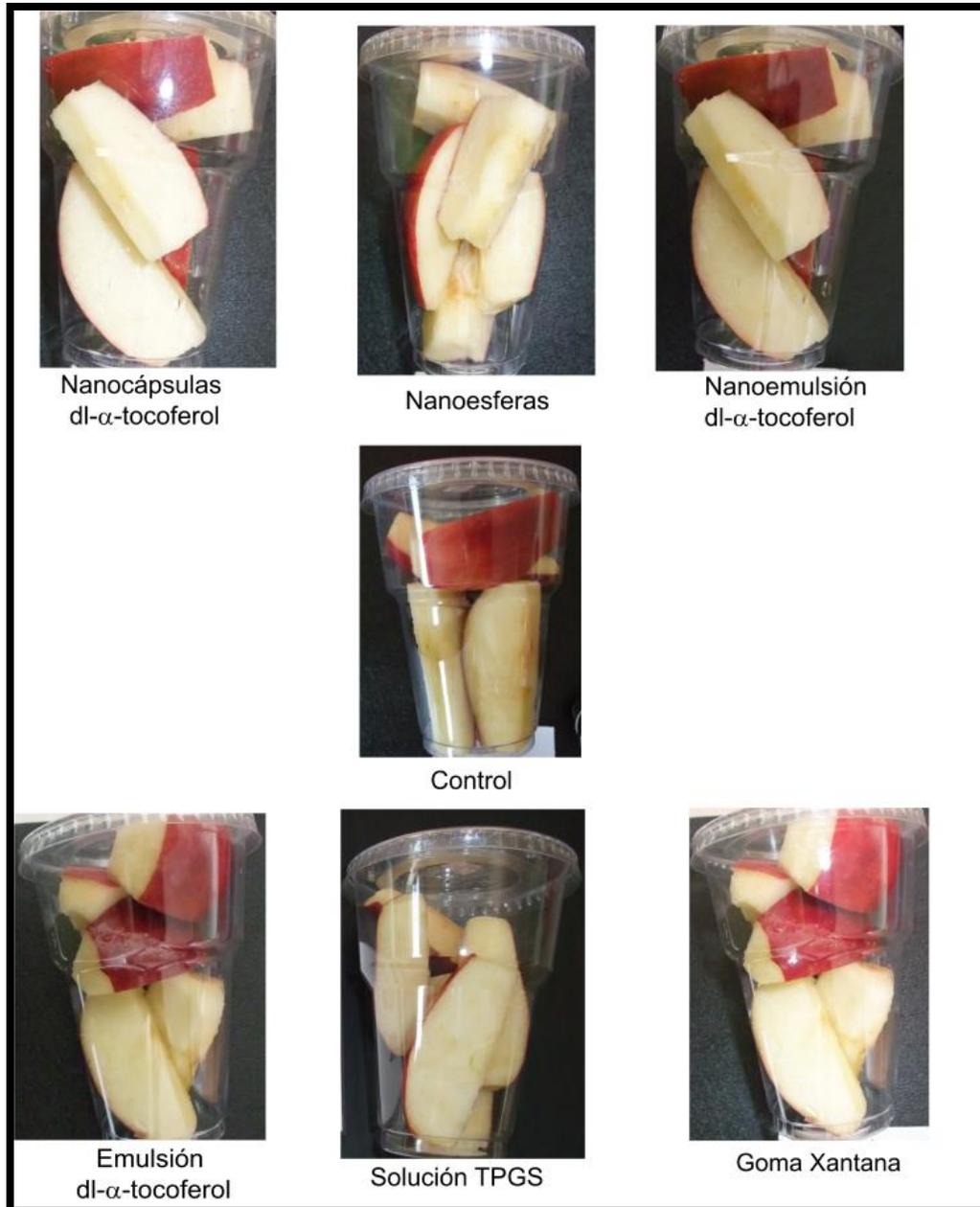


Figura 7.15 Aspecto visual de las muestras de manzana antes del almacenamiento.

En las Figuras 7.16 y 7.17 se muestran la evolución de cambios en el aspecto visual que mostraron las manzanas durante el almacenamiento refrigerado. En la Figura 7.16 se observan las manzanas tratadas con solución TPGS, goma xantana y emulsión con dl- α -tocoferol contrastadas con el comportamiento de las manzanas control, siendo estas las que visualmente presentaron el mayor oscurecimiento, resaltando además que el recubrimiento contribuyó a mantener la apariencia visual del fruto hasta los 6 días de

almacenamiento, transcurrido este tiempo las muestras tendieron a oscurecerse paulatinamente. En el caso de la goma xantana el aspecto visual presentado al final del almacenamiento corresponde a una manzana que en apariencia muestra menor oscurecimiento, sin embargo también presentó deshidratación superficial lo que provocó que la intensidad de color disminuyera.



Figura 7.16. Cambios en aspecto visual en manzana fresca cortada control respecto a recubrimientos con emulsión, solución y goma xantana

La Figura 7.17, muestra los cambios asociados al oscurecimiento para las manzanas recubiertas con sistemas de talla submicrónica comparados con el control, observándose que tuvieron una mejor funcionalidad en el mantenimiento del aspecto visual de las manzanas hasta los 18 días de almacenamiento.

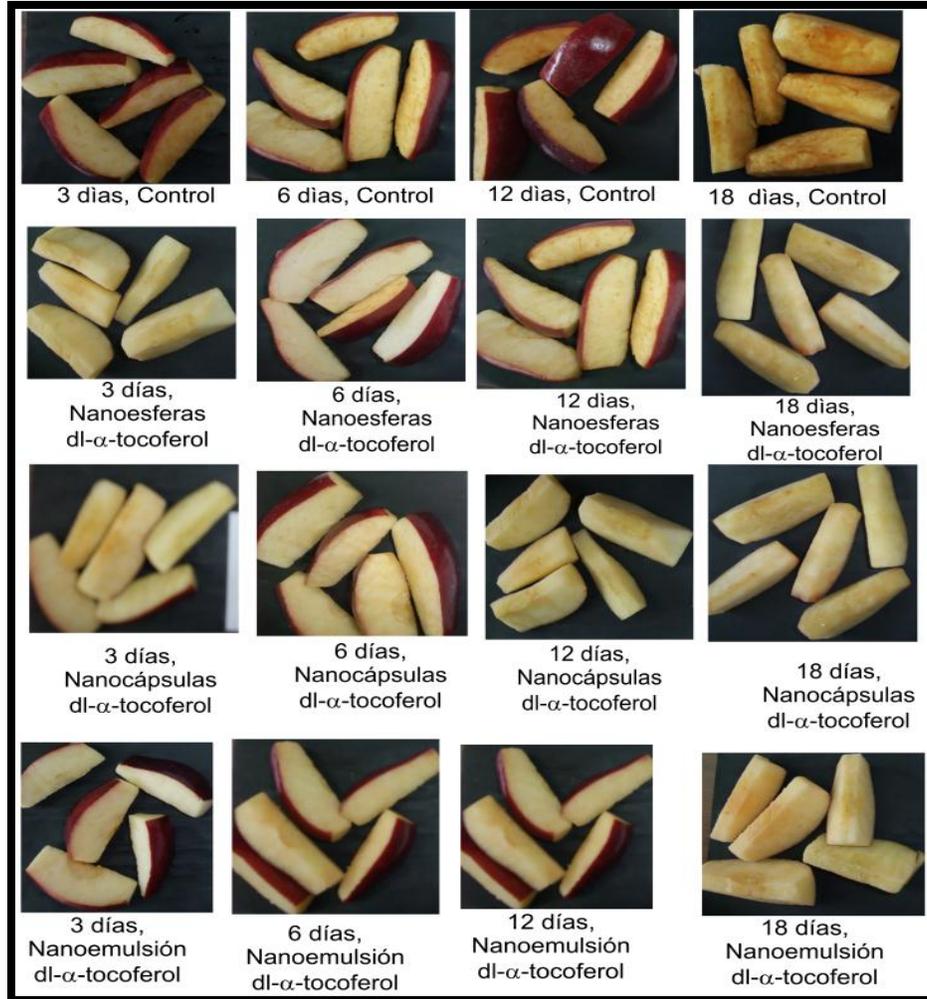


Figura 7.17. Cambios en aspecto visual en manzana fresca cortada para recubrimientos de talla submicrónica respecto al control.

7.3.2 Cambios de color

7.3.2.1 Luminosidad (L^*)

La Figura 7.18 muestra los cambios en L^* , asociados a las modificaciones superficiales del tejido por acción de las enzimas polifenoloxidasas y relacionados con la barrera que crean los diferentes sistemas de recubrimiento en la superficie del producto.

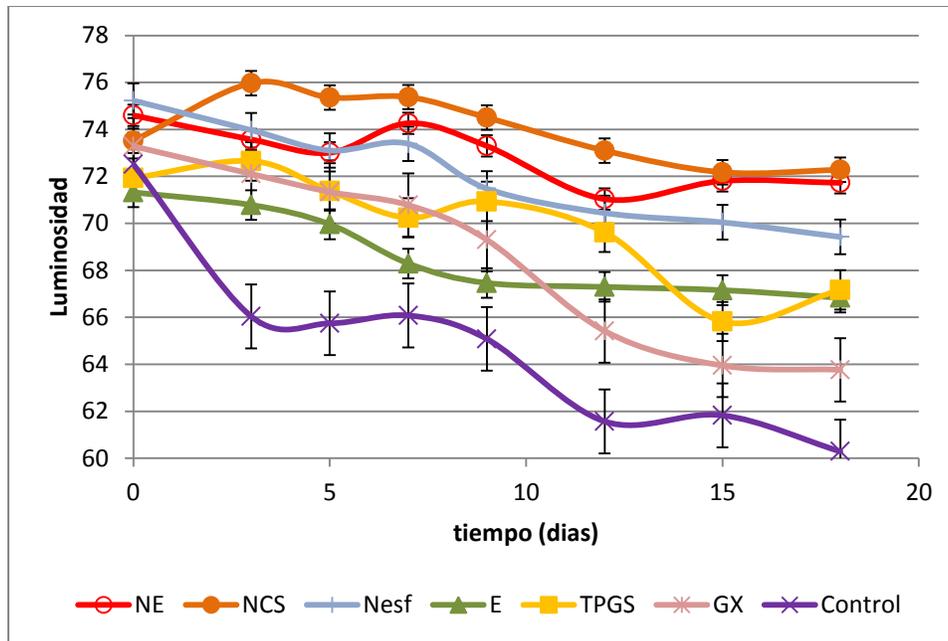


Figura 7.17 Cambios en Luminosidad en manzana almacenada a 4 °C para los diferentes recubrimientos. NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.

Los datos iniciales corresponden a las manzanas después de inmersión y secado en el sistema correspondiente (≈ 40 min). En la Figura 7.18 es posible hacer énfasis sobre el comportamiento de las manzanas control en cuanto a la pérdida de luminosidad la que claramente disminuye drásticamente antes de los 3 días de almacenamiento, con lo que se hace evidente la importancia de realizar los tratamientos para el producto inmediatamente después del corte. La manzana control no presentó variaciones en la luminosidad después de los 3 días y hasta los 9 días de almacenamiento, después de transcurrido este tiempo mostró nuevamente una pérdida de luminosidad asociada posiblemente a las pérdidas por deshidratación superficial del producto en un proceso natural de cicatrización del tejido. Respecto a las muestras recubiertas con goma xantana, se resalta que de las recubiertas fueron las que disminuyeron más su luminosidad a una velocidad de 0.66 día^{-1} ($R^2 = 0.94$), seguidas por las tratadas con emulsión/goma xantana que cambiaron de 72 a 67 a una velocidad de 0.34 día^{-1} ($R^2 = 0.89$). Se observa claramente que la utilización de dispersiones submicrónicas contribuyen a modificar la percepción de la superficie, ya que desde el inicio del tratamiento

presentaron un ligero aumento en la luminosidad, lo que puede ser atribuido a la modificación en la absorción de luz en la superficie del producto, no existiendo diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) entre las nanocápsulas (L^* de 76 a 71 a velocidad de 0.29 día^{-1} , $R^2 = 0.87$) y la nanoemulsión (L^* de 75 a 70 a una velocidad de 0.28 día^{-1} , $R^2 = 0.91$). Con respecto a los cambios en L^* diversos autores (Olivas et al., 2007; Rojas-Graü et al., 2006) han mencionado que la disminución de la luminosidad corresponde al desarrollo de reacciones de oscurecimiento enzimático o bien por el incremento en la concentración de pigmentos. Se ha evaluado que la eficiencia de los recubrimientos depende de su capacidad de funcionar como barrera al oxígeno y por ende limitar la acción enzimática (Mchugh y Sensi, 2000; Conforti y Totty, 2007; Rojas-Graü et al. 2008). Además, Soliva-Fortuny et al. (2001) encontraron que para la manzana Golden Delicious la L^* decae drásticamente desde el primer día de almacenamiento en atmósferas modificadas. Lee et al. (2003) reportaron valores de L^* de 79 para manzanas Fuji que al ser tratadas con carragenina y ácido ascórbico disminuyen su L^* a 73 durante 360 h el almacenamiento.

7.3.2.2 Cambios en a^*

Otro factor importante en el desarrollo de oscurecimiento en manzana es el cambio en a^* (-60) verde a (+60) rojo, ya que un incremento de este valor representa una modificación en el oscurecimiento (Rojas-Graü et al., 2006). En la Figura 7.19 se muestran las variaciones por los recubrimientos.

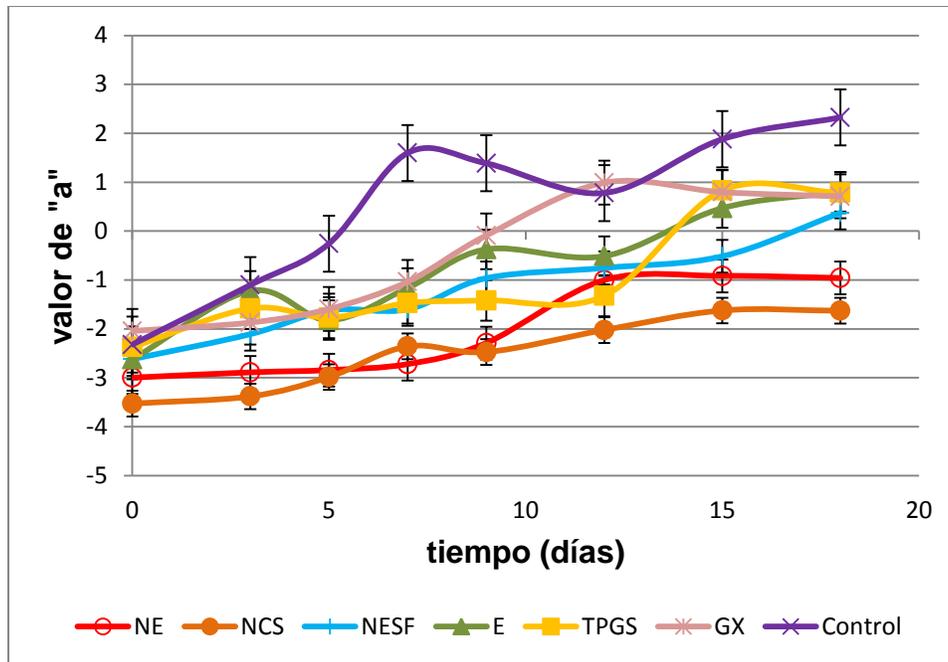


Figura 7.19. Cambios en “a*” durante almacenamiento a 4 °C por efecto de los diferentes recubrimientos. NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.

En la Figura 7.19, se resalta que al igual que para luminosidad, la muestras control mostraron un marcado cambio en los valores de a^* durante los primeros 7 días de almacenamiento, lo que implica que es aquí donde la manzana control presenta el mayor daño, y que además es durante las primeras horas después del cortado que se presentan los cambios irreversibles asociados al oscurecimiento, el cambio para las manzanas control fue de -2.7 a 2.9 en las primeras 24 h. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre las manzanas con goma xantana (-2.32 a -0.37), emulsión (-2.77 a 0.14) y solución de TPGS (-2.8 a -0.09) hasta los 9 días de almacenamiento; después de este tiempo la goma xantana tuvo una mayor velocidad (0.19 días^{-1}) de cambio en los valores de a^* . De acuerdo con Lee *et al.* (2003), un incremento en los valores de L^* aunado al aumento en a^* es una medida directa del desarrollo de oscurecimiento en frutas frescas cortadas, tal y como sucede en los datos experimentales analizados en este punto, en los que el cambio en goma xantana, emulsión y TPGS demuestran valores de a^* promedio de -2,7 a 0.09. En relación al comportamiento de las nanocápsulas y nanoemulsión, la presencia de estos

sistemas submicrónicos modifica la percepción del color en la superficie con la menor velocidad de cambio (de -2.9 a -1.69), contribuyendo a disminuir los cambios asociados al oscurecimiento y aparentemente limitando la acción enzimática por disminución de la disponibilidad de oxígeno.

7.3.2.3 Cambios en Índice de oscurecimiento

En la Figura 7.20 se muestran los cambios en el índice de oscurecimiento por efecto de los diferentes tratamientos utilizados en este trabajo.

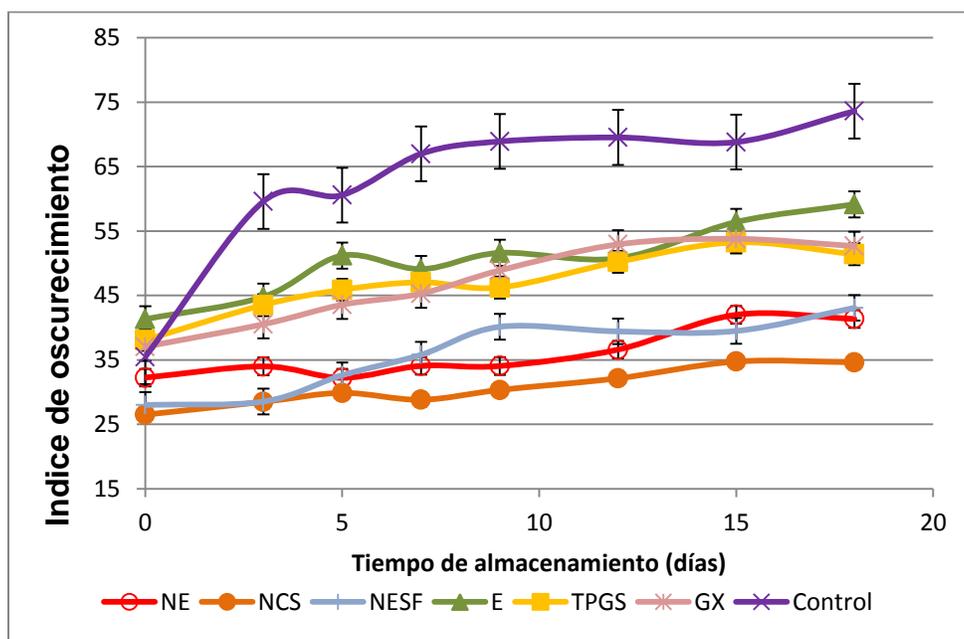


Figura 7.19. Cambios en índice de oscurecimiento en manzana a 4°C para los diferentes recubrimientos. NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.

Con la finalidad de resaltar el efecto de los distintos recubrimientos empleados, en la Figura 7.20 se muestra la evolución del oscurecimiento en la superficie del tejido de manzana control, observándose que a las 72 h se había desarrollado prácticamente todo el oscurecimiento que desarrollarían estas muestras durante el periodo de almacenamiento.

Las manzanas control mostraron un alto índice de oscurecimiento, siendo perceptible en las primeras 24 horas con un índice de oscurecimiento de 42,

umentando a razón de 14 % hasta el quinto día y no mostrando diferencia estadísticamente significativa a partir de ese momento.

El mayor índice de oscurecimiento fue para la emulsión con un intervalo de confianza de entre $27 < 29 > 30$. No se encontró diferencia significativa entre las muestras tratadas con solución TPGS y goma xantana con valores de entre $22 < 24 > 28$. En ambos casos se tiene un comportamiento ascendente con velocidades de 1.19 días^{-1} ($R^2 = 0.95$) para goma xantana y de 0.90 días^{-1} ($R^2 = 0.92$) para solución TPGS. Las dispersiones submicrónicas (nanoemulsión, nooesferas y nanocápsulas) fueron los sistemas que tuvieron mayor efectividad para retardar el desarrollo de oscurecimiento. Las velocidades de cambio del índice de oscurecimiento fueron de 0.80 días^{-1} ($R^2 = 0.88$) en nanoesferas, de 0.52 día^{-1} ($R^2 = 0.84$) para nanoemulsión, el recubrimiento con nanocápsulas fue el sistema más efectivo, con la menor velocidad de cambio de 0.49 días^{-1} ($R^2 = 0.92$) y valor promedio de índice de oscurecimiento de 11 (Figura 7.20). En el caso de la nanoemulsión el efecto es claramente atribuible a la talla de partícula puesto que la emulsión con similar contenido presenta un rápido oscurecimiento 0.87 días^{-1} ($R^2 = 0.88$). Aparentemente, la actividad del dl- α -tocoferol como nutraceutico-antioxidante y modificador de las propiedades de barrera se ve favorecida por el área de contacto con el fruto (Mei y Zhao, 2003).

Es posible, entonces establecer que el desarrollo del oscurecimiento fue claramente disminuido aplicando nanocápsulas y nanoemulsión ($p < 0.05$), teniendo un importante efecto sobre la inhibición del oscurecimiento. La presencia del dl- α -tocoferol como activo en estos sistemas juega un rol determinante en el efecto antioxidante. Lo que es posible contrastar con el comportamiento del recubrimiento con nanoesferas, ya que a pesar de que este disminuye el índice de oscurecimiento su efecto no es comparable en magnitud a los que contienen dl- α -tocoferol. Aunque la presencia de CaCl_2 , como agente anti-oscuramiento (García y Barret, 2002) puede contribuir a los resultados obtenidos, los efectos son claramente atribuidos a la habilidad del recubrimiento para funcionar como barrera al oxígeno; el dl- α -tocoferol contribuye a la modificación de las propiedades de

transporte limitando la acción de la enzima (Park y Zhao, 2005). En cuanto a los agentes anti-oscorecimiento, Son *et al.* (2001), evaluaron la efectividad de diferentes agentes tales como: ácidos carboxílicos, ácido ascórbico, miel de abeja, ácido oxálico, 4-resorcisol entre otros, determinando que los cambios de color son una función del índice de oscorecimiento siendo el más efectivo el ácido oxálico. La efectividad del ácido ascórbico es temporal porque una vez oxidado pierde su actividad. De manera general, los resultados reportados por estos autores son significativamente menores a los obtenidos en este estudio para los sistemas nanoparticulados. Perez-Gago *et al.* (2006), llevaron a cabo un estudio para evaluar la efectividad de recubrimientos a base de cera de abeja y proteína de suero de leche con agentes anti-oscorecimiento (ácido ascórbico y cisteína), concluyen que la utilización de estos recubrimientos disminuye el oscorecimiento de manzana Golden Delicious en índices de oscorecimiento entre 25 y 35 durante 350 h de almacenamiento. En el estudio realizado en este trabajo, aparentemente el utilizar nanocápsulas, como sistema reservorio, mejora en gran medida la conservación de manzana Red Delicious ya que el índice de oscorecimiento inicial es aproximadamente de 8, atribuido a la dispersión de luz dada por las nanocápsulas, teniendo el producto un color menos oscuro, reflejado a su vez en los valores de L^* que tienen un cambio de apenas dos unidades durante el periodo de almacenamiento (Figura.7.18). Estos resultados dan apoyo a las características visuales observadas en la sección anterior y muestran un uso potencial de estos componentes.

7.3.3. Caracterización fisicoquímica después de la inmersión

En el Cuadro 7.4 se presentan los resultados obtenidos con la finalidad de contar con un parámetro de referencia, que asocie el cambio superficial de la manzana con la aplicación del recubrimiento. Los cambios se monitorearon en propiedades fisicoquímicas inmediatamente después de la inmersión. Se observa que en la emulsión y nanoemulsión hubo una ligera disminución en la concentración de SST, de acuerdo a la dispersión de datos parece que no hay diferencias estadísticas además de que el análisis es inmediatamente después del realizar el tratamiento. No se esperaría que hubiera un cambio tan inmediato

asociado con la disolución de azúcares durante la inmersión, además de una menor resistencia a la punción (firmeza) en las muestras tratadas con solución de TPGS, sin embargo en el resto de los componentes analizados no se encontró diferencia estadísticamente significativa en el comportamiento. Resultados similares han sido reportados en manzanas frescas cortadas conservadas con diferentes antioxidantes o utilizando diferentes tratamientos (Soliva-Fortuny *et al.*, 2005; Rojas-Graü *et al.*, 2006).

Cuadro 7.4. Caracterización inicial de manzana después de aplicación de los recubrimientos.

Tratamiento	Sólidos solubles (%)	Acidez	pH	Firmeza (N)
NE	12.8 ± 0.3	0.21 ± 0.02	3.4 ± 0.01	6.2 ± 0.6
NCS	13.6 ± 0.2	0.27 ± 0.01	3.6 ± 0.05	6.7 ± 0.2
NESF	13.4 ± 0.3	0.23 ± 0.03	3.5 ± 0.07	6.9 ± 0.5
E	13.5 ± 0.3	0.21 ± 0.01	3.6 ± 0.06	6.1 ± 0.3
TPGS	12.4 ± 0.4	0.24 ± 0.02	3.7 ± 0.02	5.7 ± 0.2
GX	13.6 ± 0.2	0.21 ± 0.01	3.8 ± 0.06	6.2 ± 0.3
Control	13.4 ± 0.3	0.23 ± 0.07	3.9 ± 0.06	6.2 ± 0.3

NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF= nanoesferas, E= emulsión, TPGS = dl- α -tocoferol Propilenglicol succinato, GX = goma xantana.

7.3.3. Cambios en la ultraestructura de rebanadas de manzana tratadas con los recubrimientos de talla submicrónica.

La Figura 7.21 es una micrografía representativa de manzana fresca cortada, sin ningún tratamiento y previo al almacenamiento refrigerado. Se observa el tejido típico con sus diferentes componentes. Estas micrografías fueron utilizadas como referencias para comparar los efectos en las manzanas tratadas con los recubrimientos.

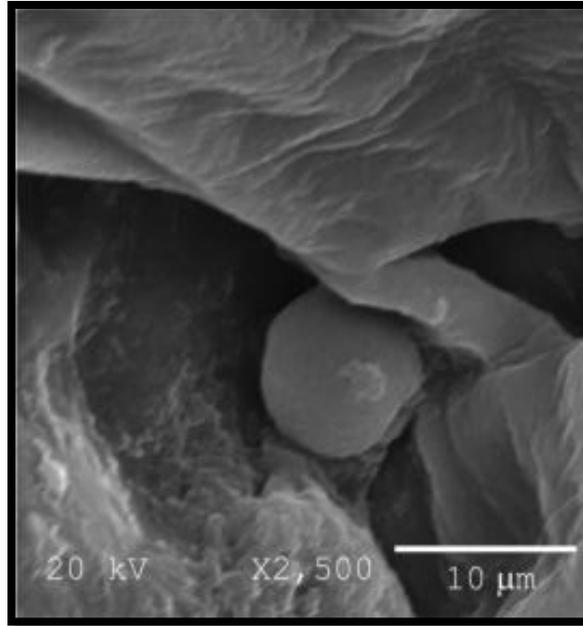


Figura 7.21 Superficie de un corte de la manzana Red Delicious, sin tratamiento

La Figura 7.22 muestra las micrografías del tejido de manzana tratado con los diferentes recubrimientos, estas imágenes fueron tomadas a diferentes aumentos para evidenciar los distintos componentes del tejido y distinguir la localización de los componentes de los recubrimientos.

La Figura 7.22(a) pone en evidencia la presencia en la superficie del tejido de la goma xantana, considerando que los agregados en forma de agujas son característicos de este tipo de sistemas (Veiga-Santos *et al.*, 2005), además es posible confirmar que el recubrimiento forma una película homogénea sobre la superficie del tejido. En la Figura 7.22 (b) se muestra la manzana recubierta con el recubrimiento a base de nanocápsulas/goma xantana en donde se evidencia la formación de agregados de la dispersión y gotas producto de la transpiración del fruto (Soliva-Fortuny *et al.*, 2003). Estos agregados permiten suponer que las nanocápsulas tienden a aglomerarse después de su aplicación y secado posiblemente por su naturaleza hidrofóbica que contrasta con la naturaleza del fruto. Es importante destacar que esta aglomeración no implica que el sistema haya perdido sus características, en particular sus propiedades superficiales y de sistema reservorio. Adicionalmente, se observa un recubrimiento continuo con las nanocápsulas embebidas dentro de la matriz de la goma xantana y distribuidas en

toda la superficie del fruto. Esta disposición del recubrimiento sobre el fruto puede tener efecto sobre la modificación de las propiedades de permeabilidad a los gases y capacidad antioxidante, como se verá adelante.

En la Figura 7.22(c) se muestra el recubrimiento con nanoesferas, el comportamiento es muy similar al observado para las nanocápsulas, una distribución homogénea sobre la superficie del fruto con agregados puntuales y continuos. Es esperado que la distribución del sistema y su presencia en la superficie del recubrimiento puedan tener un efecto protector debido a la interacción con la superficie y modificación del intercambio gaseoso del fruto.

La Figura 7.22(d) corresponde a la micrografía con la nanoemulsión, se distinguen pequeñas gotas aparentemente correspondientes a los nanoglóbulos del dl- α -tocoferol. Igual que en los anteriores recubrimientos se observa homogeneidad del recubrimiento en la superficie. Se pronostica un menor efecto protector de este sistema considerando la inmediata disposición del material y su pronta oxidación al ser un sistema no recubierto. Finalmente las Figuras 7.22(e) y (f) muestran las micrografías para la solución de TPGS y la emulsión de dl- α -tocoferol, en la primera no se evidencian continuas y homogéneas estructuras en la superficie, lo que hace suponer una mayor infiltración del sistema hacia los poros del fruto. La emulsión no muestra los glóbulos correspondientes a su talla de partícula, lo que puede sugerir coalescencia del sistema posterior a su aplicación. Estas evidencias se utilizarán para analizar el comportamiento del fruto recubierto.

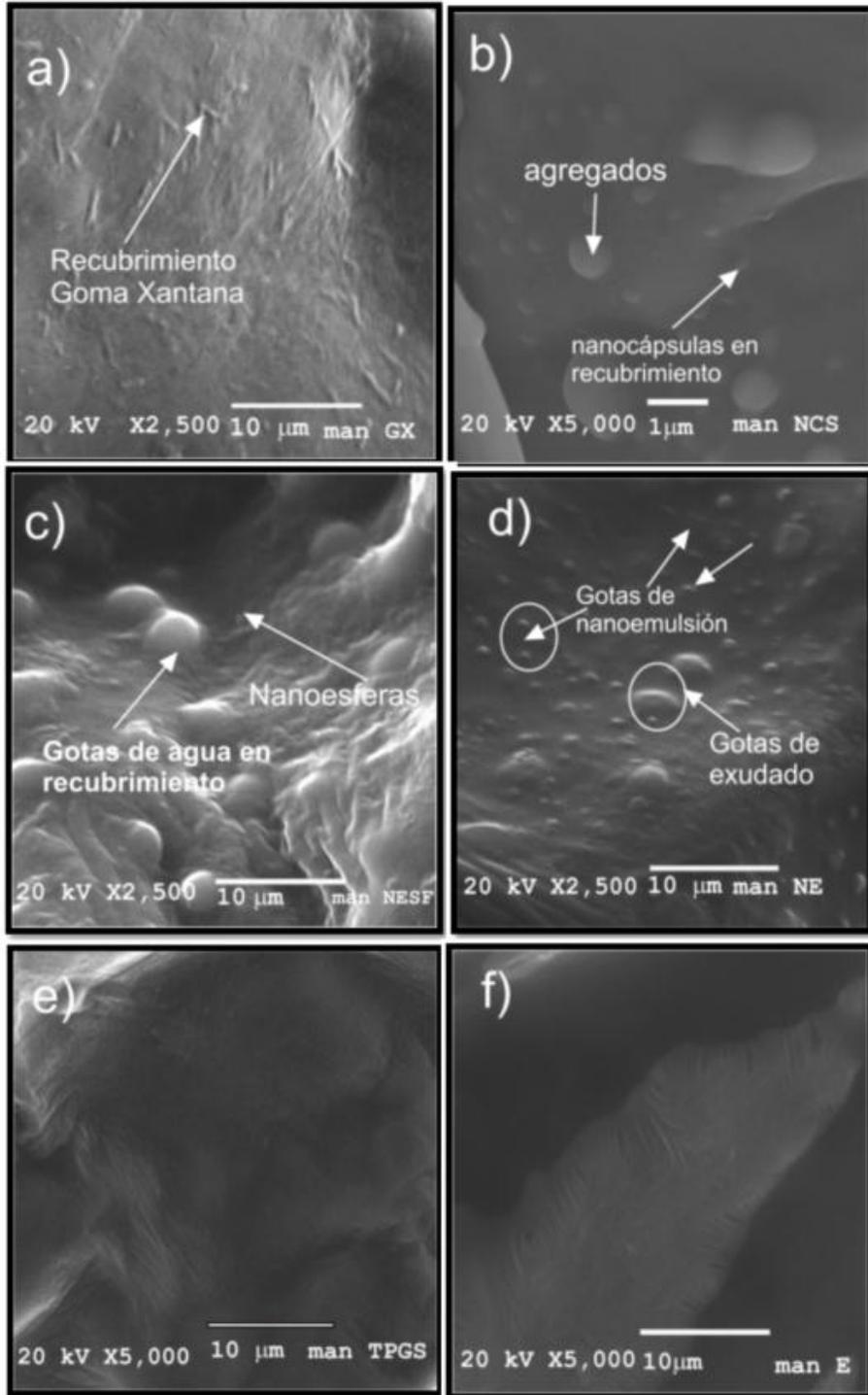


Figura 7.22 Micrografías del tejido de manzana tratado con los diferentes recubrimientos: a) GX = goma xantana, b) NCS = nanocápsulas, c) NESF = nanoesferas, d) NE = nanoemulsión, e) TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, f) E = emulsión.

7.3.4. Cambios fisicoquímicos durante el almacenamiento refrigerado

7.3.4.1. Pérdida de líquido drenado

La Figura 7.23 resume los datos de pérdida de líquido drenado, expresados como el % de pérdida respecto al peso inicial en las rebanadas de manzana durante el periodo de almacenamiento. Aunque existen diferencias, las pérdidas durante el periodo fueron en todos los casos menores al 1 % debido básicamente a que el líquido drenado al interior del envase fue mínimo para todos los tratamientos analizados.

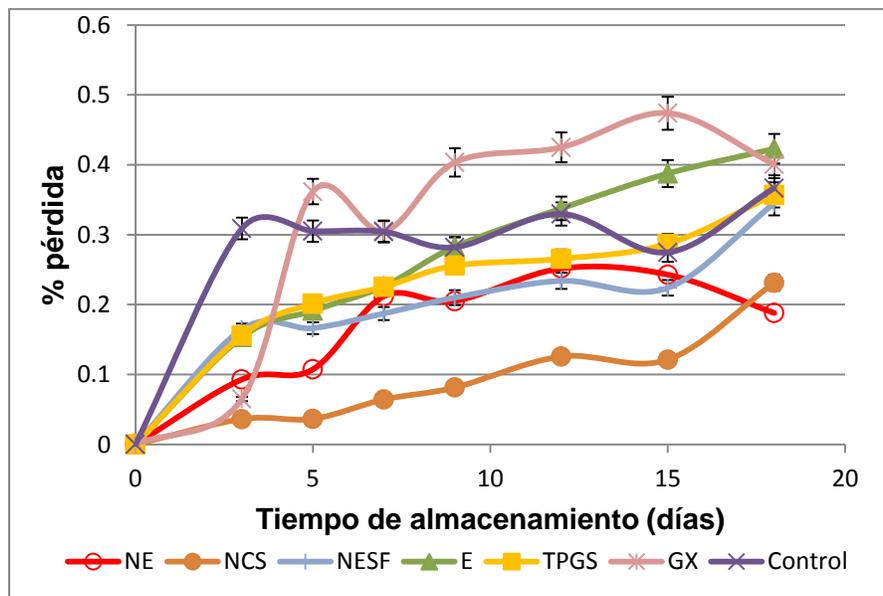


Figura 7.23. Pérdida de peso por líquido drenado para los diferentes recubrimientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, E = emulsión, GX = goma xantana.

La Figura 7.23 muestra que los mayores cambios fueron para las manzanas recubiertas con goma xantana con una pérdida de 0.45 % al final del periodo de almacenamiento, teniendo esta mínimas variaciones a partir del día 10 de almacenamiento, debido principalmente a la absorción de la goma xantana en el tejido lo que en apariencia mostró una ligera deshidratación superficial (Figura 7.17). La menor cantidad de líquido drenado correspondió a las muestras recubiertas con nanocápsulas/goma xantana siendo en promedio de 0.2 %. Respecto a este comportamiento, Ball (1999) y Olivas *et al.*, (2007) reportaron que la pérdida de peso de frutos recubiertos está fuertemente relacionada a la

composición del recubrimiento, viéndose en la mayoría de los casos, limitada por la adición de lípidos. La propiedad hidrofóbica de este componente en el recubrimiento evita la salida del vapor de agua y por tanto un mejor control de la pérdida de peso. Los mismos autores concluyen que el uso único de hidrocoloides no garantiza la formación de una buena barrera para la humedad en alimentos con alta actividad acuosa, debido a su alta higroscopicidad; que permitirían la posterior evaporación de las moléculas de agua desde la superficie del hidrocoloide. Es posible que la pérdida de peso mostrada por las muestras recubiertas con goma xantana pueda atribuirse a este fenómeno.

7.3.3.2. Sólidos solubles Totales (SST)

En la Figura 7.24 se observa la evolución en el contenido de sólidos solubles, las curvas muestran diferentes tendencias dependiendo del tratamiento utilizado.

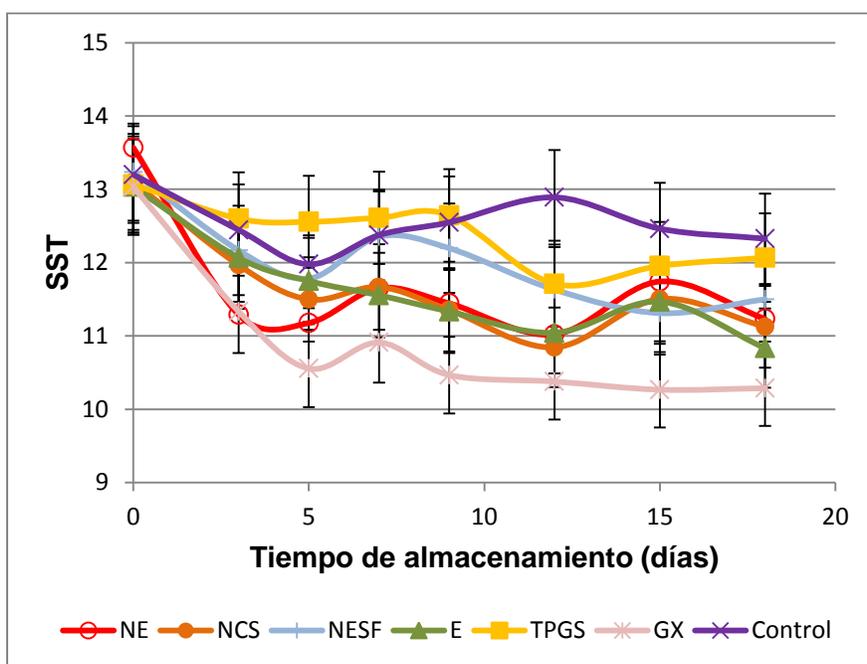


Figura 7.24 Cambio en sólidos solubles durante el almacenamiento refrigerado (4°C) de manzana con diferentes tratamientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.

Las muestras control tuvieron una disminución del contenido de SST de 13.8 a 12.0, representando un cambio del 13 % respecto a la condición inicial. No

existió diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) en el comportamiento de los SST en la emulsión y solución de TPGS los que mostraron una disminución del 8.9 y 8 % respectivamente. Las manzanas con goma xantana, nanoemulsión nanocápsulas mantuvieron una concentración de SST por encima del 11 % no mostrando diferencia estadísticamente significativa, además es importante resaltar que en estas muestras y a partir del quinto día de almacenamiento la concentración de SST permaneció sin cambio aparente. Las variaciones en SST en algunas ocasiones están en función de la composición del recubrimiento dependiendo de éste la interacción del producto con el ambiente. Además Li y Yu (2001) y Olivas *et al.*, (2007) no reportaron variaciones importantes en el contenido de SST por efecto del tipo de recubrimiento aplicado a diferentes frutos con recubrimientos de quitosán y alginato.

7.3.3.3. Acidez titulable

La Figura 7.25 muestra los cambios en acidez, factor de gran importancia para el aroma y sabor de las frutas. El comportamiento de la acidez durante el almacenamiento refrigerado fue dependiente del tratamiento al que se sometió el fruto.

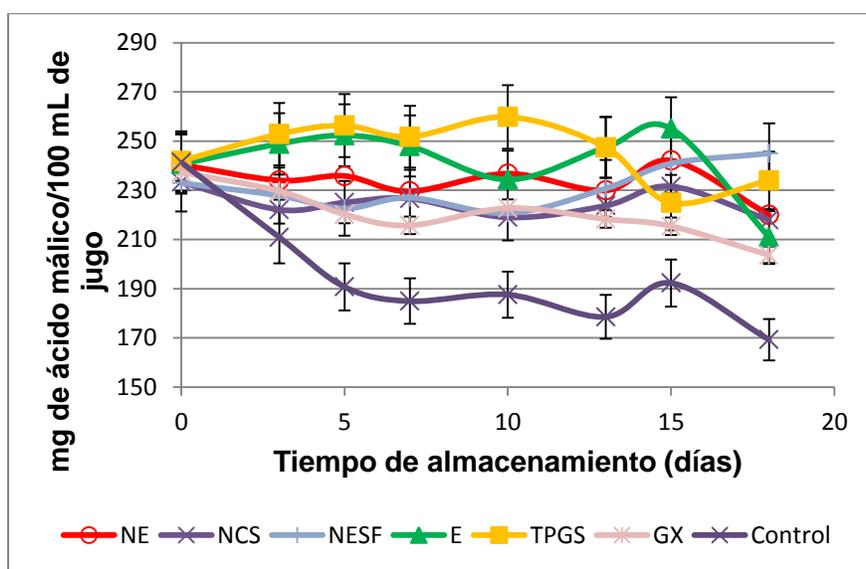


Figura 7.25 Cambios en acidez durante el almacenamiento de manzana con diferentes recubrimientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.

En las Figura 7.25 se observa que las muestras control tuvieron un comportamiento que se diferencia marcadamente de los otros tratamientos, observándose un comportamiento atribuible a la rápida pérdida de calidad que muestran los frutos frescos cortados, al igual que en el resto de las propiedades analizadas, los cambios más importantes se muestran antes de los 3 días de almacenamiento, con una disminución de 240 a 190 mg de ácido málico /100 mL de jugo, durante los primeros 3 días de almacenamiento. De acuerdo con Olivas *et al.*, (2007) la acidez tiende a disminuir durante el almacenamiento de manzanas “Golden Delicious” debido a los cambios metabólicos y a la maduración de los frutos; no obstante, cuando se aplican recubrimientos que alteran el intercambio de gases, la tasa de respiración puede disminuir lo cual puede llevar a prolongar la vida de anaquel; esta condición puede variar con la composición del recubrimiento utilizado. Cortez-Vega *et al.*, (2008), reportaron que las manzanas “Fuji” tratadas con metabisulfito de sodio o ácido ascórbico no mostraron variaciones significativas durante el almacenamiento en cuanto a los cambios en acidez titulable. En este trabajo las muestras con goma xantana mostraron una tendencia similar a las muestras control con una menor velocidad de cambio, asociada a la naturaleza de la goma xantana. A partir de estos reportes se puede establecer que el tipo de tratamiento, la variedad del fruto y las condiciones de almacenamiento son factores determinantes en las variaciones de acidez. Las muestras con solución de TPGS mostraron una disminución de la acidez a partir de los 10 días; la menor variación se presentó en las manzanas tratadas con nanoesferas con un contenido de 234 mg de ácido málico /100 mL de jugo al final del almacenamiento. Las muestras con nanocápsulas y nanoemulsión no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) durante el almacenamiento con un contenido de 211 y 219 mg de ácido málico /100 mL de jugo.

7.3.3.4 Cambios en pH durante el almacenamiento

En la Figura 7.26 se muestran las variaciones en pH por efecto del tipo de tratamiento en función del tiempo de almacenamiento.

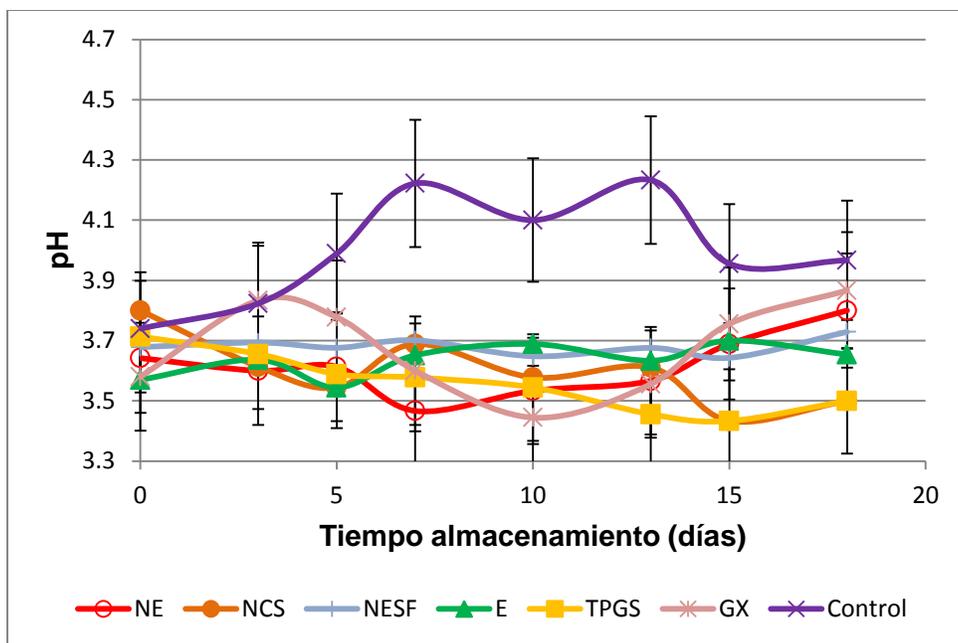


Figura 7.26 Cambios en pH durante el almacenamiento a 4°C para los diferentes tratamientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.

Para las manzanas control, la acidez tuvo un importante incremento inicial, seguido de una ligera disminución después de 10 días de almacenamiento refrigerado. No se registraron diferencias significativas entre los tratamientos con nanoemulsión, emulsión y goma xantana. Las nanocápsulas mantuvieron el pH aproximadamente constante hasta los 10 días de almacenamiento con una ligera disminución del pH de 3.6 a 3.4 a los 15 días. Olivas *et al.*, (2007) trabajando con manzanas variedad “Royal Gala”, concluyeron que la disminución o mantenimiento del pH determina el oscurecimiento del fruto, mientras que un aumento del pH implica menor protección y por ende un mayor oscurecimiento. Este es el caso de nuestras manzanas control

El hecho de que las muestras con los recubrimientos submicrónicos muestren menores cambios en estos parámetros parece indicar que, estas controlaron la actividad metabólica por lo que el consumo de azúcares disminuyó manteniendo mayores contenidos de sólidos solubles y hubo menor utilización de ácidos orgánicos para la respiración; esto indicaría que los recubrimientos tuvieron un efecto retardador del metabolismo y por tanto un incremento en la retención de calidad.

7.3.4 Cambios de textura

Los cambios de textura o firmeza se muestran en la Figura 7.27, mostrándose con los gráficos de barras la variabilidad de los resultados durante el almacenamiento.

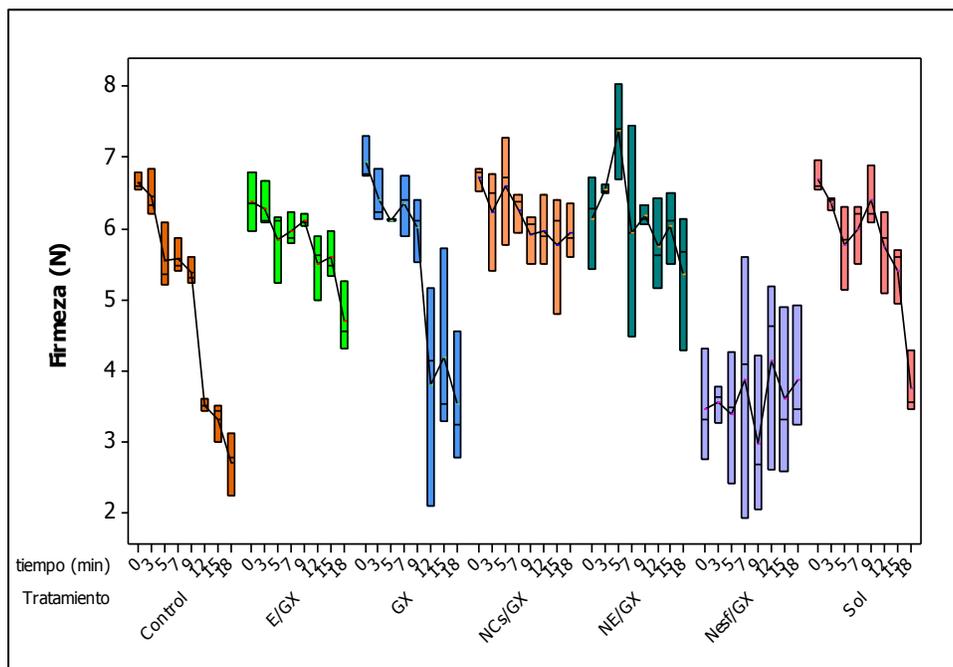


Figura 7.27 Cambios de firmeza durante el almacenamiento a 4°C para los diferentes recubrimientos utilizados: E/GX = emulsión, GX = goma xantana, NcS/GX = nanocápsulas, NE/Gx = nanoemulsión, Nesf/Gx = Nanoesferas, Sol = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en función al tratamiento aplicado y al tiempo de almacenamiento. Las manzanas control mostraron los mayores cambios, la firmeza disminuyó de 6.2 a 2.8 N durante el almacenamiento refrigerado, seguidas por las muestras tratadas con la solución y emulsión, las que además, no mostraron diferencia significativa entre sí, con una disminución de firmeza del 25 % con respecto a la condición inicial. Resalta el hecho de que las muestras tratadas con solución de TPGS disminuyeron considerablemente su textura después de 3 días de almacenamiento, permaneciendo sin cambio hasta el día 9, para disminuir drásticamente a partir de los 12 días. La firmeza para los recubrimientos a base de goma xantana disminuye considerablemente (de 6.3 a 5 N) durante los primeros 3 días de almacenamiento,

permaneciendo prácticamente constante y sin diferencia estadísticamente significativa a partir del día 5 de almacenamiento refrigerado. Para el recubrimiento con nanoemulsión/goma xantana, los cambios en firmeza fueron paulatinos, teniendo una velocidad de cambio de 0.13 N/día.

Aunado a la apariencia visual, la textura (expresada como firmeza) que presentaron los frutos frescos cortados es un factor importante que determina la decisión de compra de un producto. De acuerdo con Soliva-Fortuny *et al.* (2005), el ablandamiento de la fruta es consecuencia de los cambios en las propiedades físicas y mecánicas del tejido y está directamente asociada a los cambios químicos en polisacáridos, de tal manera, que la utilización de CaCl_2 como operación previa al recubrimiento contribuye a mantener la textura de los frutos. Rojas-Graü *et al.*, (2008) reportaron que el CaCl_2 incorporado a formulaciones con proteína de soya contribuye a mejorar la firmeza del fruto, atribuyéndolo a la composición del recubrimiento y a la acción del calcio en la pared celular. Entonces, la composición y características del recubrimiento modifican en gran medida el comportamiento durante el almacenamiento, Es importante destacar que el tamaño de partícula y las características del recubrimiento tienen un importante efecto sobre la textura. En el caso del recubrimiento con nanocápsulas se observó un efecto conservador en la firmeza de los frutos. De manera general, estos recubrimientos presentaron menor variación durante el almacenamiento, seguidos de los tratados con nanoemulsión. Este comportamiento permite sugerir que la amplia área de exposición debida a la talla submicrónica de las nanocápsulas y de la nanoemulsión (254 nm y 194 nm respectivamente) y su distribución dentro del recubrimiento permite mejorar la interacción de estos sistemas con los componentes de la pared celular del fruto (Abbott y Buta, 2002, Rojas-Graü *et al.*, 2008). Por otro lado, Varela *et al.*, (2007) realizaron un estudio de textura durante 14 días de almacenamiento en dos variedades de manzana, Granny Smith y Golden Delicious, utilizando ensayos de punción hasta 10 mm de la superficie de cubos de manzana. Los resultados mostraron que la firmeza de la manzana Golden Delicious es menor que la de la manzana Granny Smith. Los

valores de firmeza reportados en este estudio son de magnitud semejante a los obtenidos para nuestras muestras de manzana Red Delicious.

De acuerdo con Varela *et al.* (2007) el módulo de compresión es un parámetro recomendado e indicativo para seguir la pérdida de la integridad estructural de las frutas el cual se manifiesta como una disminución de la rigidez durante el almacenamiento de productos frescos cortados. Los resultados obtenidos para los diferentes recubrimientos en almacenamiento son mostrados en la Figura 7.28, está también evidencia que las muestras de talla submicrónica mantuvieron más cohesión el tejido dando mayores valores de compresión y por tanto mayor firmeza de las muestras

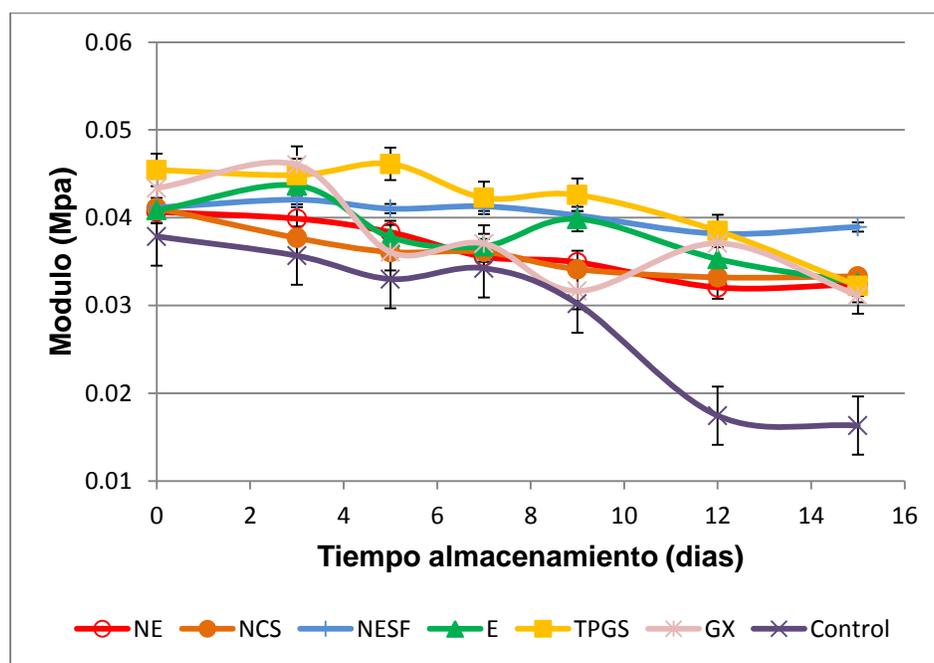


Figura 7.28. Comportamiento del módulo de compresión para manzana almacenada con diferentes recubrimientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.

Grotte *et al.* (2002) realizaron un análisis del módulo de compresión junto con otras propiedades en manzanas Golden Delicious, observando una disminución del módulo durante el almacenamiento de manzanas enteras, teniendo un 43 % de pérdida de rigidez durante 360 h en cierta medida es un comportamiento similar a las manzanas de control analizadas en el presente trabajo. El módulo de

compresión para las manzanas control disminuyó lentamente hasta los 7 días, después de este tiempo la disminución llegó al 50 %. Las manzanas tratadas con goma xantana mostraron un comportamiento irregular en el caso de las manzanas con solución y emulsión no se encontró diferencia significativa en la modificación del módulo. Para la solución se tuvieron variaciones mínimas durante los 3 primeros días, después de este tiempo la pérdida de rigidez fue incrementándose paulatinamente a una velocidad de 1.1 Pa/día ($R^2 = 0.89$). Las muestras con emulsión tuvieron una pérdida de rigidez a razón de 0.9 Pa/día ($R^2 = 0.88$). Para los recubrimientos con nanocápsulas y nanoemulsión no se encontró diferencia estadísticamente significativa del módulo. El resultado más destacable de esta evaluación fue que las muestras tratadas con nanocápsulas permanecieron prácticamente constantes durante el periodo de almacenamiento con una velocidad de cambio de firmeza de 0.51 Pa/día ($R^2 = 0.91$). El recubrimiento con nanoemulsión tuvo valores también bajos con 0.64 Pa/día ($R^2 = 0.93$). Nuestros resultados confirman que las nanocápsulas y la nanoemulsión contribuyen significativamente al mantenimiento de la rigidez, e incrementar la vida útil de las manzanas.

7.3.5. Cambios en actividad de polifenoloxidasas (PFO)

En el cuadro 7.5 se resumen los resultados para la actividad de PFO en manzana fresca cortada previo al tratamiento. El análisis de estas muestras tiene como finalidad estandarizar el método y comparar los resultados con los reportados en la bibliografía, ya que estas son el punto de comparación para los distintos sistemas coloidales estudiados y su correlación con el índice de oscurecimiento y contenido de fenoles totales.

La actividad promedio fue de 1156 UA/mL. Wakayama (1995) estudió la actividad polifenoloxidasa en la piel, el mesocarpio y el endocarpio de cinco variedades de manzana cultivadas en Japón, entre las que se encuentra la Red Delicious, esta variedad presentó la mayor actividad de esta enzima respecto de todas las estudiadas con un total de 1570 UA/mL, en donde el mesocarpio y el endocarpio juntos muestran una actividad de 1230 UA/mL, la que es comparable

con la actividad promedio reportada para nuestras muestras. La variación (74 UA/mL) puede ser atribuida a factores no controlables como son el lugar de procedencia, época de cosecha, condiciones climáticas y de manejo, razón por la que con estos resultados se procedió a realizar las pruebas correspondientes a manzanas frescas cortadas y tratadas con los diferentes sistemas coloidales, que se analizan a continuación.

Cuadro 7.5 Actividad enzimática PFO de manzanas sin tratamiento.

Muestra	Pendiente	Unidades de Actividad UA)	Actividad relativa (UA/mL)
Muestra 1	0.201	201	1005
Muestra 2	0.255	255	1275
Muestra 3	0.236	236	1180
Muestra 4	0.245	245	1225
Muestra 5	0.219	219	1095
		Promedio	1156
		D.E.	84.8
		C.V.	7.33

Rojas-Graü *et al.*, (2006) indicaron que uno de los parámetros más importantes a considerar para determinar la efectividad de tratamientos en frutas frescas cortadas es monitorear los cambios en actividad polifenoloxidasasa durante el almacenamiento del producto.

La Figura 7.29 muestra el comportamiento de la actividad PFO en función al tratamiento y tiempo de almacenamiento. En las muestras control la actividad de PFO aumentó a razón de 53.02 U/mL día ($R^2 = 0.93$) hasta el séptimo día de almacenamiento, este resultado se correlaciona con el cambio en el índice de oscurecimiento reportado previamente (7.3.5.3) el cual permanece prácticamente constante después de 7 días. Este comportamiento es relacionado al agotamiento del sustrato en la superficie de la manzana ya que los productos de oxidación de los compuestos fenólicos tienen potencial de interactuar con las proteínas, generando condensaciones covalentes con los grupos $-SH$ y NH_2 de los aminoácidos susceptibles a la unión o alquilación por quinonas, de aquí la formación de enlaces entre las quinonas y las proteína que puede resultar en cambios en las características estructurales y funcionales de las proteínas, dando

como resultado la inhibición de la síntesis de “*novo*” de fenoles y reduciendo por ende la actividad enzimática (Wojdylo *et al.*, 2008; Stelzig *et al.*, 1972).

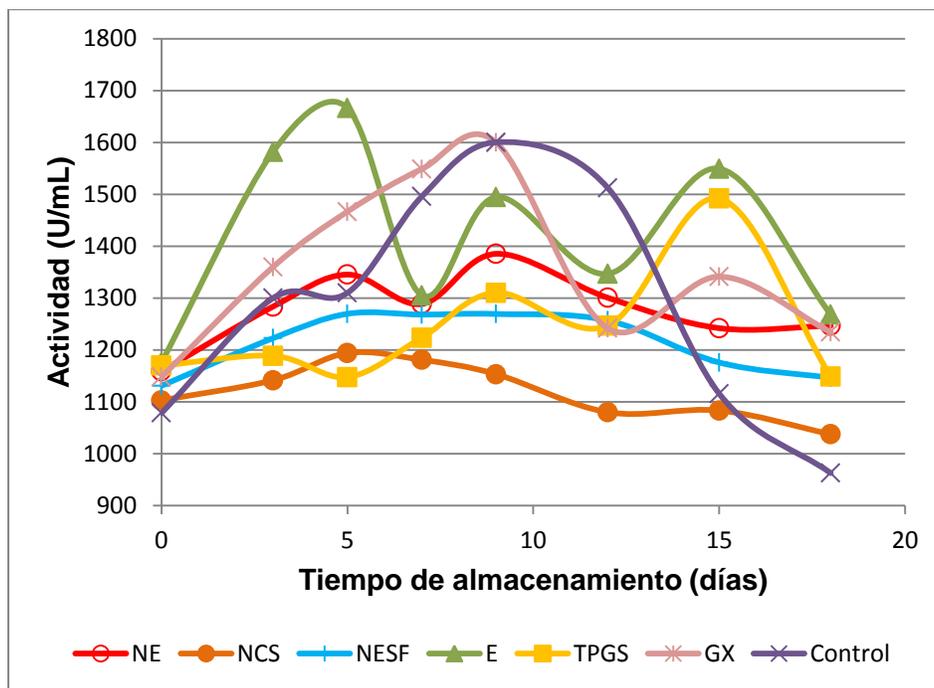


Figura 7.29 Actividad de PFO en manzana fresca cortada durante almacenamiento con diferentes tratamientos: NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, E = emulsión, TPGS = α -tocoferol propilenglicol succinato, GX = goma xantana.

En la misma Figura 7.29 se observa que el comportamiento de la actividad enzimática de PFO de las nanocápsulas permaneció prácticamente sin variaciones durante el almacenamiento, disminuyendo a partir del séptimo día. Es importante resaltar que en cuanto a la actividad de PFO las nanocápsulas tienen una actividad similar a la reportada por Ji-Hyun y Kwang-Deog (2011), quienes utilizaron un tratamiento ultrasónico y ácido ascórbico para controlar el oscurecimiento en manzana Fuji. Se puede hipotetizar que el dl- α -tocoferol tiene un efecto reductor que pudiese ser asociado a cambios en la actividad de la membrana y por ende a una disminución de los mecanismos de acción asociados a la polimerización de o-quinonas. Es ampliamente conocido el papel del dl- α -tocoferol como un compuesto inhibidor del ataque oxidativo de los ácidos grasos polinsaturados presentes en las membranas celulares, debido a su capacidad

antioxidante, su estructura química permite donar un hidrógeno e inactivar diferentes especies de radicales libres (Eitenmiller y Lee, 2004).

La acción protectora ejercida por los sistemas con nanoesferas (Figura 7.28) puede ser debida a su distribución en el recubrimiento la cual determina el intercambio gaseoso durante el almacenamiento del producto. Un efecto adicional es que la biodegradación del biopolímero matriz (poli- ϵ -caprolactona) es limitada por la presencia de agua. (Sinha et al., 2004) por lo que se requiere un tiempo para llevar a cabo la hidrólisis del polímero lo que contribuye a controlar la liberación del antioxidante (dl- α -tocoferol). El efecto protector de las nanoesferas es significativo y pudiera tener impacto tecnológico aun cuando esta dispersión no tiene dl- α -tocoferol, su actividad PFO en promedio es solo 10 % mayor a la mostrada por las nanocápsulas.

La solución de TPGS tuvo una actividad de PFO constante hasta los 12 días de almacenamiento, a partir de este tiempo se produjo un incremento aproximadamente constante con una velocidad de 56.2 U/mL día⁻¹ ($R^2 = 0.96$). Un argumento interesante para el uso de esta molécula como antioxidante es que la esterificación del anillo del tocoferol con el acetato protege al tocoferol de una temprana oxidación, puesto que estos grupos ocupan los sitios donde se origina la actividad antioxidante de este compuesto, entonces es requisito primario que los esterres sean hidrolizados, para que el α -tocoferol presente actividad biológica. Además, para que se lleve a cabo la reacción de la PFO es necesaria cierta cantidad de agua (Robb, 1995), por lo que el acetato de dl- α -tocoferol no puede inhibir la enzima PFO ya que es un compuesto hidrofóbico, sin embargo, este puede interactuar con los productos de reacción de la PFO inhibiendo así el oscurecimiento enzimático (Figura 7.20). Yan et al., (2007), asumieron la hipótesis de la hidrólisis de TPGS para explicar y correlacionar la absorción de α -tocoferol a nivel intestinal. Suponemos que la actividad protectora de la solución de TPGS es debida a un retardo en la liberación del dl- α -tocoferol que explicaría la baja actividad PFO en los primeros 12 días de almacenamiento, la Figura 7.30 muestra

la suposición en que se basa esta discusión respecto a la liberación del antioxidante para la captura de radicales libres (Jensen et al., 1999).

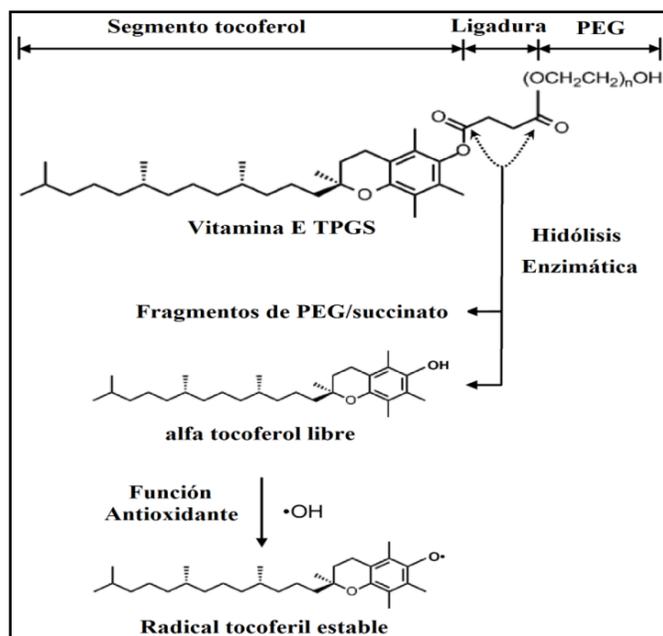


Figura 7.30. Estructura, hidrólisis y función antioxidante de TPGS

Yan et al., 2007.

En este trabajo se argumenta que el mecanismo potencial por el cual las nanocápsulas cargadas con dl- α -tocoferol limitan el desarrollo de oscurecimiento en manzana fresca cortada debido a que el tamaño de partícula impacta el área de liberación del tocoferol, permitiendo por ende la acción de este componente a nivel superficial del fruto. Después de la aplicación de las nanocápsulas a la superficie del fruto, se inicia la degradación de la membrana polimérica de poli- ϵ -caprolactona liberando así el α -tocoferol encapsulado desde los nanoglóbulos cuyo grupo éster será hidrolizado por enzimas carboxilesterasas presentes en la manzana, generándose ácido acético y α -tocoferol los cuales interactuarán con las o-quinonas formadas modificando el pH superficial e impidiendo la polimerización, ya que el tocoferol obtendrá su hidrógeno evitando que las quinonas se unan a los grupos -SH y -NH₂ inhibiendo de esta manera la formación de melaninas causantes del oscurecimiento del fruto.

La nanoemulsión tuvo una mayor actividad de PFO que los otros sistemas de talla submicrónica evaluados, sin embargo, presentó variaciones durante el

almacenamiento. Las muestras con goma xantana mostraron una variabilidad ondulatoria en el comportamiento de la actividad de PFO. Con un periodo inicial (primeros 5 días de almacenamiento) de cambio a velocidad constante, posiblemente debido a que la goma xantana forma un recubrimiento continuo que reduce la transferencia de oxígeno (Chen y Nussinovitch, 2000). Después de este tiempo existe un incremento en la actividad de PFO la cual fluctúa de forma aleatoria y poco predecible, pero con una actividad superior a la presentada en los sistemas de talla submicrónica.

7.3.7 Cambio en el contenido de fenoles totales

Previo a la determinación del contenido de polifenoles totales en las muestras tratadas con los diferentes sistemas, se llevó a cabo la obtención de la ecuación de trabajo para determinar el contenido de polifenoles realizando una curva patrón con ácido gálico a concentraciones de: 50, 100, 150, 250 y 500 mg/L. Obteniéndose la ecuación $y = 0.017 x$ ($R^2 = 0.995$), con la que se obtuvieron las concentraciones de las diferentes muestras de manzana.

El contenido de polifenoles en manzanas recién cortadas sin ningún tratamiento estuvo en un intervalo que va de 415 a 462 mg EAG/g de manzana, (media = 439 ± 14.62 mg EAG/g de manzana). Estos resultados se compararon con los obtenidos por otros autores (Sapers *et al.*, 1989; Tasao *et al.*, 2003); para establecer la reproducibilidad del método.

La Figura 7.31 muestra el comportamiento del contenido de polifenoles totales expresados en función al contenido equivalente de ácido gálico, para los tratamientos monitoreados durante los 18 días de almacenamiento refrigerado.

La amplitud de la caja representa la variabilidad de resultados en el contenido de polifenoles totales, en las manzanas control los polifenoles disminuyeron paulatinamente durante el almacenamiento llegando a una concentración de 395 mg EAG/g de muestra, esta disminución en la concentración de fenoles durante el almacenamiento se relaciona con el rápido oscurecimiento que presentaron las manzanas control (Figura 7.20), reflejado en un incremento en

la actividad PFO (Figura 7.29). El comportamiento mostrado se relaciona con lo reportado en relación a los compuestos fenólicos, actividad PFO grado de oscurecimiento en diferentes variedades de manzana, encontrando que para cuatro variedades, incluyendo la Red Delicious, la actividad PFO está directamente relacionada con el grado de oscurecimiento, tal y como sucedió con las manzanas control en este estudio (Amiot *et al.*, 1992; Amiot *et al.*, 1995).

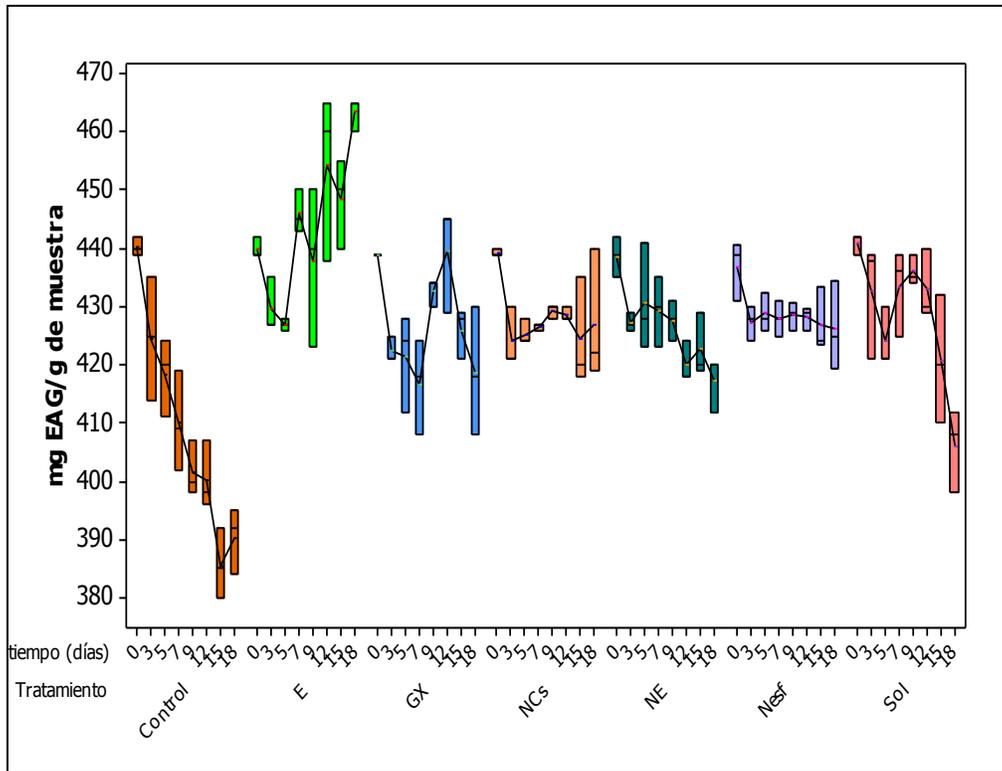


Figura 7.31 Variación en el contenido de fenoles totales: E = emulsión, GX = goma xantana, NCS = nanocápsulas, NE = nanoemulsión, NESF = nanoesferas, Sol = dl- α -tocoferol propilenglicol succinato

Las muestras tratadas con nanocápsulas y nanoesferas mostraron pocas variaciones en el contenido de fenoles totales, debido probablemente a que estos no entraron en contacto con las enzimas PFO, por lo que se puede suponer que la utilización de sistemas de talla submicrónica contribuye a modificar el metabolismo de las células superficiales de manzana Red Delicious, lo que contribuye a disminuir la velocidad de oscurecimiento y al mantenimiento de la calidad del producto durante el almacenamiento, prolongando su vida útil a más de 15 días de almacenamiento. La nanoemulsión presentó variaciones de entre (440 a 410 mg

UAG/g de muestra, las cuales pueden ser atribuidas a la presencia de los surfactantes Tween[®] y Span[®] (ingredientes estabilizantes incluidos en esta formulación) ya que estos estabilizantes tienen un efecto sobre las membranas celulares adyacentes que provocan la liberación de polifenoles y por ende este se cuantifica como un incremento (Sapers *et al.*, 1989). Las manzanas tratadas con la emulsión mostraron un incremento en el contenido de polifenoles totales después de 5 días de almacenamiento, mostrándose pocas variaciones a partir de este momento.

7.3.8 Actividad fenilalanin amonioliasa (PAL) en manzana

Una vez analizados los resultados correspondientes a los cambios en índice de oscurecimiento, actividad PFO y los cambios en polifenoles totales, se decidió determinar la actividad de PAL; sin embargo, únicamente se consideraron para esta evaluación los sistemas de talla submicrónica puesto que estos mostraron una mayor eficiencia en la disminución del índice de oscurecimiento, incremento de vida útil y cambios en actividad enzimática, contrastándose con el comportamiento para las muestras con goma xantana y aquellas sin recubrimiento (control). En la Figura 7.32 se muestran los resultados obtenidos para la actividad de PAL.

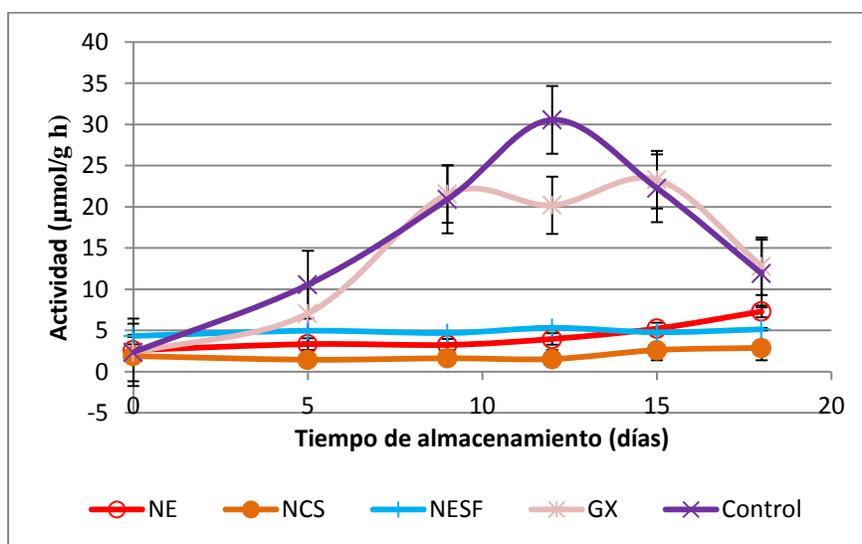


Figura 7.32 Actividad fenilalanin amonioliasa en manzana durante almacenamiento. NE = nanoemulsión, NCS = nanocápsulas, NESF = nanoesferas, GX = goma xantana.

La actividad PAL se ve incrementada considerablemente en aquellos frutos que han tenido heridas como las que presentan los frutos frescos cortados durante su transformación, siendo un factor importante a controlar con la finalidad de limitar el oscurecimiento enzimático e incrementar la vida útil del fruto (Hisaminato *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2005). La actividad PAL tiene un comportamiento parabólico para el caso del control y de la goma xantana, tal y como ha sido reportado en otros estudios donde se observa este comportamiento, además de que una vez obtenido el máximo la actividad disminuye debido a una inactivación por acumulación de polifenoles (Puschmann *et al.*, 2007). La actividad PAL se incrementó a razón de 2.33 días^{-1} en la manzana control, lo que implica que no existió protección sobre las heridas generadas durante el corte (cicatrización del tejido) (Pereyra *et al.*, 2005). Asociada también con el incremento en el índice de oscurecimiento (Figura 7.20), ya que la actividad PAL se ve estimulada cuando hay reacciones de oscurecimiento (Pérez-Cabrera *et al.*, 2003). La actividad PAL fue menor que para las muestras control cuando se empleó goma xantana como recubrimiento, este comportamiento es atribuido al efecto protector del recubrimiento que disminuye la disponibilidad de oxígeno provocando una menor velocidad enzimática. Por otro lado, la menor actividad PAL la presentaron las muestras de manzana tratadas con nanocápsulas, lo que se asocia a la inducción de la cicatrización en la superficie de la manzana. De acuerdo con Choi *et al.* (2005), los fenoles resultantes de la actividad PAL son retenidos en las vacuolas y participan en las reacciones de oscurecimiento solo cuando la alteración de las membranas permite a los sustratos mezclarse con las enzimas, por lo que es posible plantear que las nanocápsulas no permitieron modificaciones en la membrana celular de tal forma que la acción antioxidante del dl- α -tocoferol fue efectiva para la estabilidad celular, aunado a la distribución homogénea de los sistemas de talla submicrónica en la superficie del fruto. La actividad de este recubrimiento es consistente con los resultados obtenidos para índice de oscurecimiento, actividad PFO y el contenido de fenoles mostrados en las Figuras 7.20, 7.28 y 7.30. También se resalta que las nanoesferas tuvieron un efecto protector, atribuible como se había mencionado a los grupos carboxilo terminales

que proveen un efecto sobre la disminución de la actividad PFO por modificación del pH, lo que impide el desarrollo de oscurecimiento, además de que al ser un polímero que se degrada lentamente aunado a la modificación de la permeabilidad al oxígeno en la superficie del fruto, limitando su intercambio con el ambiente (Sinha *et al.*, 2004).

Etapa 2. Aplicación de Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS) en frutos de guayaba.

En esta etapa se desarrolló un recubrimiento alimenticio a base de nanopartículas lipídicas sólidas y explorar su aplicación en la conservación de guayaba Media China. Previo a su aplicación, se determinaron las condiciones de preparación óptimas para obtener dispersiones de talla submicrónica. Una mezcla de cera de carnauba y candelilla (cera candeuba) fue utilizada como lípido sólido modelo por sus propiedades físicas y químicas (Bosquez-Molina et al., 2003). El alcohol polivinílico (PVAL) se eligió por sus propiedades estabilizantes (Baker et al., 2012). Las NLS preparadas bajo diferentes condiciones fueron analizadas en su tamaño de partícula, PDI y ζ a fin de de generar dispersiones de talla nanométrica y buena estabilidad.

7.4. Establecimiento de condiciones de preparación de las NLS

Las NLS fueron preparadas por el método de homogenización en caliente (Camacho, 2010) utilizando un sistema rotor-estator de alta fuerza de corte Ultraturrax[®]. La determinación del número de ciclos de homogenización utilizados fue establecida en función al tamaño de partícula e PDI obtenidos.

7.4.1. Tamaño de partícula

La Figura 7.33 muestra la relación del tamaño de partícula en función de número de ciclos (10,000 rpm/5 min) empleados. Para los primeros dos ciclos se obtienen dispersiones con una amplia distribución de tamaño de partícula con comportamiento multimodal con más de dos poblaciones. Estas dispersiones tendieron rápidamente a la agregación e inestabilidad física. A partir del tercer ciclo se obtuvieron dispersiones nanométricas con comportamiento que se ajustó a una distribución normal. El ANOVA no indicó diferencias significativas ($\alpha= 0.05$) en el tamaño medio de partícula después del tercer ciclo de homogenización. De acuerdo con Mora-Huertas *et al.* (2010) el tamaño de partícula es un parámetro crítico para este proceso pues determina las capacidades (micro- o nano-) del método, reproducibilidad y probable escalamiento, además está directamente vinculado a la estabilidad, la captación celular, la biodistribución y la liberación de

sustancias activas y/o funcionales. Por ello se decidió usar tres ciclos de homogenización (10,000 rpm por 5 min con tiempos de reposo entre ciclo y ciclo de 5 min) que garantizaron la obtención de partículas de talla nanométrica con buena estabilidad durante un mes a temperatura ambiente.

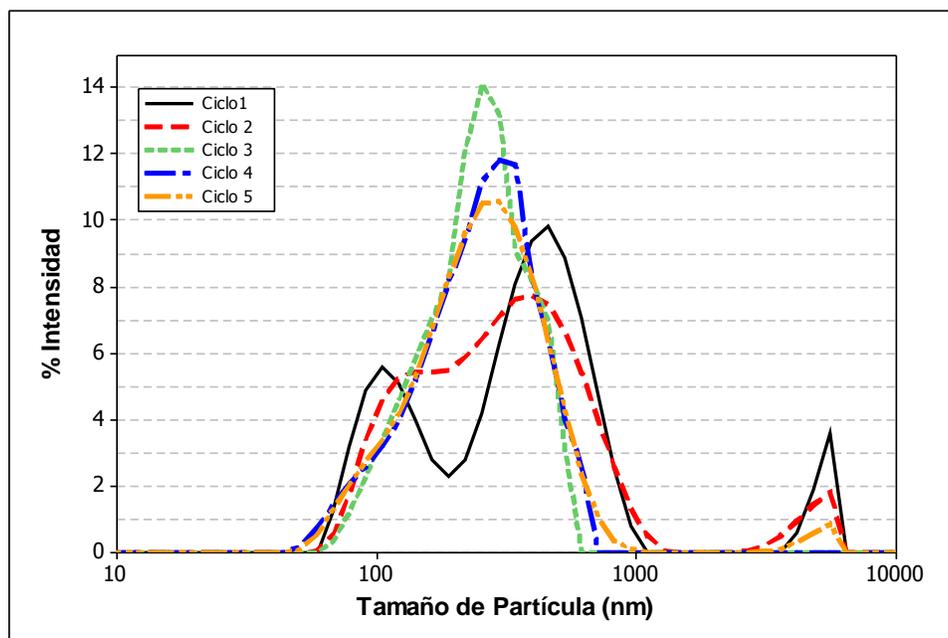


Figura 7.33 Distribución del tamaño de partículas de NLS en relación a los ciclos de homogenización.

7.4.2 Índice de polidispersión (PDI)

De acuerdo con Awad *et al.* (2008) un $PDI \leq 0.2$ garantiza la estabilidad del sistema ya que disminuye la probabilidad de cambio del tamaño de partícula en corto tiempo. En el desarrollo de las NLS se observó que en el primer ciclo el PDI fue de ≈ 1.0 y en el segundo de 0.67, lo que presupone la formación de un sistema inestable que muy probablemente no permitirá mantener en dispersión las partículas de talla submicrónica por tiempos prolongados. Para el tercer ciclo el PDI mostró valores promedio de 0.18. Este comportamiento sugiere un máximo efecto turbulento en este ciclo que se refleja en una distribución nanométrica unimodal estrecha. La talla de partícula se incrementó hasta 0.35 para los últimos ciclos de homogenización. Lo que indicó que no fue posible disminuir más el tamaño de partícula, el incremento en el PDI puede atribuirse a que el exceso de energía es absorbida en la superficie de las partículas a consecuencia del

esfuerzo mecánico, lo que provoca modificaciones en la distribución del tamaño de partícula y en la amplitud de las mismas (Xu y Zang, 2009).

7.4.3 Potencial zeta (ζ)

Como se indicó en la primera etapa, el ζ es un factor predictivo de la estabilidad física de una dispersión. Expresa la carga superficial de las partículas en dispersión y considera los efectos de todos los constituyentes del medio. Cuanto más alejado se encuentre de cero, el sistema tendrá menos probabilidad de fenómenos de separación de fases (agregación, coalescencia, floculación, etc). En la Figura 7.34 se presentan las variaciones en el ζ por efecto del número de ciclos de homogenización.

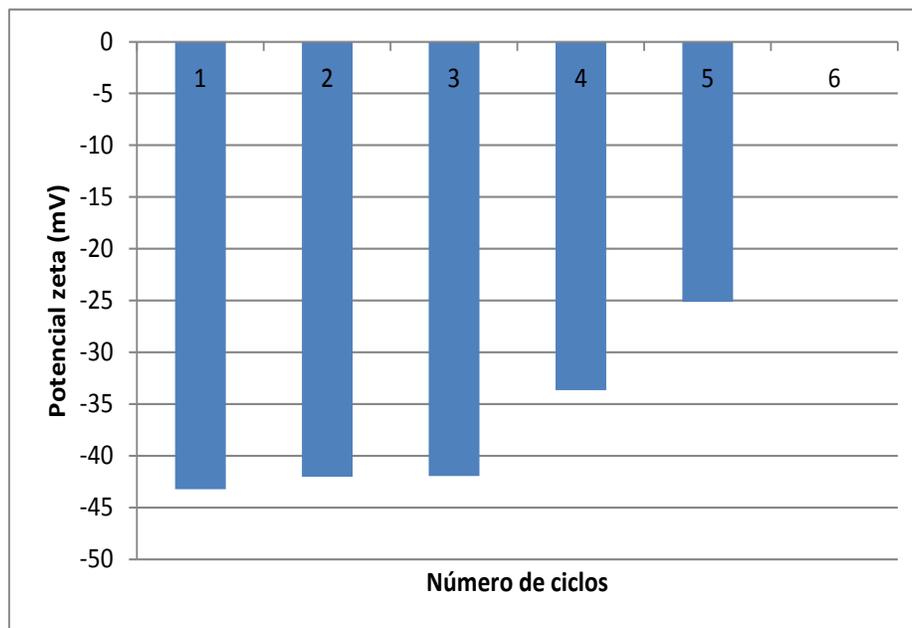


Figura 7.34 Variación del potencial zeta por efecto del número de ciclos de homogenización (10,000 rpm/min) para dispersiones de cera de candeuba.

Un ANOVA ($\alpha = 0.05$) demuestra que hubo diferencia estadísticamente significativa de la media del ζ entre los diferentes ciclos de homogenización. Se establece que las mayores diferencias se encuentran en el cuarto y quinto ciclo de homogenización, aparentemente la energía absorbida provoca una desestabilización del sistema disminuyendo la energía superficial lo que induce una disminución del ζ , razón por la que se decidió preparar las NLS con 3 ciclos de homogenización a alta velocidad de corte.

7.5. Desarrollo del recubrimiento con NLS

Después de analizar bibliográficamente (Tapia *et al.*, 2007; Rojas-Graü *et al.*, 2008; Tapia *et al.*, 2008) diferentes posibilidades de recubrimientos en particular con polisacáridos y a partir de la experiencia con trabajos previos dentro de nuestro grupo (Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2010), se decidió desarrollar un recubrimiento que tuviera como base goma xantana y NLS. La goma xantana es un polisacárido de baja viscosidad, capaz de dar brillantez, transparencia y mantenimiento de componentes aromáticos (sin limitar la transpiración del fruto) cuando se utiliza en recubrimientos para frutas, (Chen y Nussinovitch, 2000; Jouquad *et al.*, 2008). Para evaluar el efecto de la temperatura sobre la formación del recubrimiento y considerando que las temperaturas a las que se aplican oscilan para el caso de guayaba entre los 10 y 20 °C se decidió evaluar la cantidad de recubrimiento en función a estas temperaturas, considerando además el empleo de propilenglicol como plastificante (0.5 %), como criterio de decisión para aplicar los recubrimientos en la superficie del fruto.

La Figura 7.35 presenta la cantidad de recubrimiento retenido (g de goma/cm² de piel) para las diferentes concentraciones de goma xantana (0.3, 0.4 y 0.5 %) a dos temperaturas (10 y 20 °C) y con o sin uso de plastificante. Se observa que la utilización de plastificante y aumentar la concentración de goma xantana se incrementa la deposición de recubrimiento en el fruto. Los resultados confirman que la adición de plastificante ayuda a homogenizar la distribución del recubrimiento formando una película flexible de menor espesor por lo que la cantidad de recubrimiento retenida en el fruto es menor. Los plastificantes hidrofílicos reducen la longitud de la cadena del polímero debido a que modifican las interacciones para la formación de los puentes de hidrógeno, incrementando el espacio intermolecular con lo que se logra mayor homogeneidad del recubrimiento garantizando una mejor distribución sobre la superficie del fruto (Talens y Krochta, 2005).

Los resultados del análisis multifactorial muestran que hubo diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$) en la retención del recubrimiento en el

fruto debido a la utilización de plastificante y como una función de la concentración de goma xantana. Existiendo una interacción entre la concentración de goma, y el plastificante, lo que disminuye el efecto de la temperatura en la homogeneidad y cantidad de recubrimiento retenido.

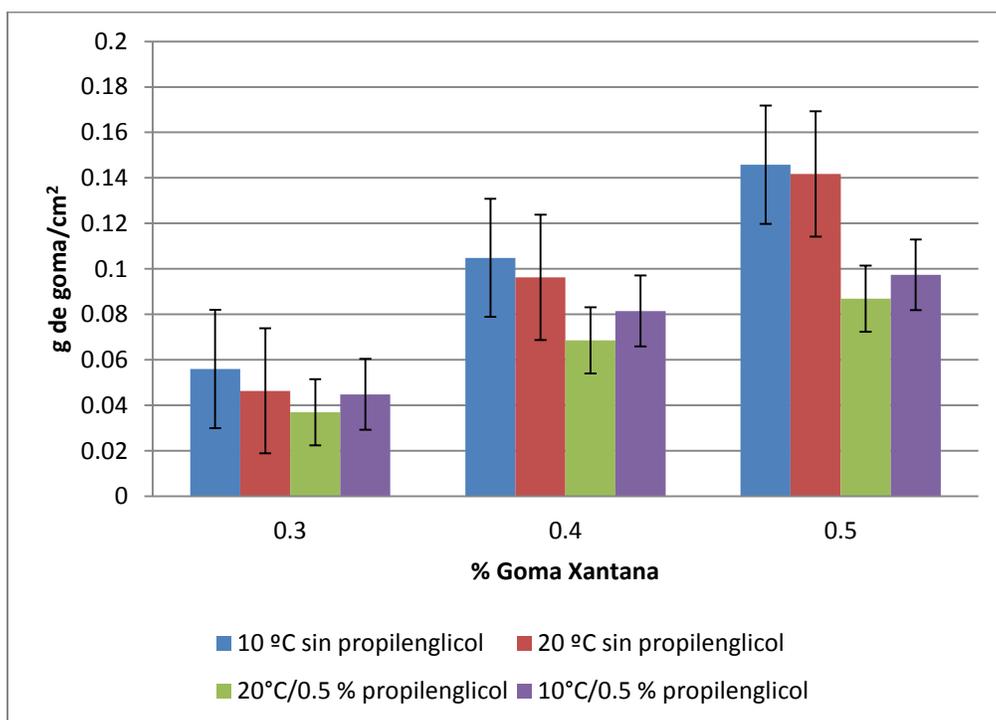


Figura 7.35 Efecto de la temperatura de aplicación, concentración de goma xantana y uso de plastificante (propilenglicol) sobre la cantidad de recubrimiento depositado en el fruto

7.5.1. Estabilidad de los recubrimientos de NLS/goma xantana

La estabilidad al almacenamiento de los recubrimientos desarrollados se llevó a cabo para determinar si la adición de goma xantana y plastificante al sistema tuvo algún efecto sobre el comportamiento del tamaño de partícula, PDI y ζ de las NLS. Se estudiaron las diferentes concentraciones de NLS a utilizar como recubrimiento.

La Figura 7.36 representa la distribución de tamaños de partícula de los recubrimientos con diferentes proporciones de NLS, las concentraciones de goma xantana (0.4 %) y propilenglicol (0.5 %) se mantuvieron constantes en todas las formulaciones.

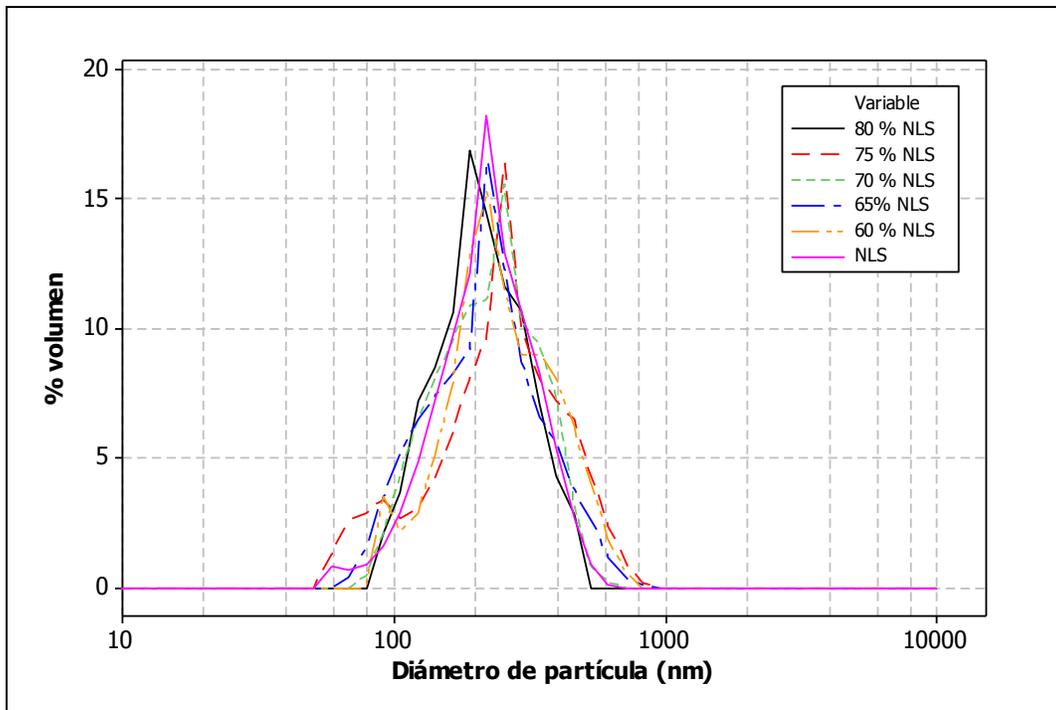


Figura 7.36. Distribución del tamaño de partícula de los recubrimientos con diferentes concentraciones de NLS y concentración constante de 0.4 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol comparadas con NLS solas.

Las NLS sin goma xantana tuvieron un tamaño de partícula promedio de 210 nm no observándose diferencias significativas en la media del tamaño de partícula por efecto de la adición de goma xantana y plastificante obteniéndose tamaños promedio de 204 a 240 nm. En la Figura 7.36 se aprecia también que no existieron variaciones significativas en el PDI ya que la amplitud de la distribución no se vio modificada significativamente.

Los resultados obtenidos para el PDI son resumidos en el Cuadro 7.6, siendo importante resaltar que los valores de PDI fueron menores a 0.3, con lo que fue posible establecer que la distribución de tamaño de partícula es homogénea (Zigoneau, 2008).

En el mismo Cuadro 7.6 se presentan los resultados de ζ para los recubrimientos con diferentes concentraciones de NLS, las mediciones se realizaron 24 h después de la preparación de las dispersiones.

Cuadro 7.6 Caracterización inicial de muestras NLS-goma xantana.

Muestra	PDI	ζ(mV)
NLS	0.25 ± 0.01^a	-38.9 ± 1.3^a
80 % NLS	0.22 ± 0.06^a	-43.2 ± 1.6^b
75 % NLS	0.26 ± 0.02^a	-47.2 ± 2.7^c
70 % NLS	0.26 ± 0.03^a	-49.4 ± 2.4^c
65 % NLS	0.25 ± 0.16^a	-43.2 ± 2.0^b
60 % NLS	0.22 ± 0.01^a	-38.4 ± 1.6^a

Letras iguales muestran que no existe diferencia estadísticamente significativa ($\alpha = 0.05$)

El ζ se ve ligeramente afectado por la adición de goma xantana, sin que por ello signifique que el sistema tenga mayor probabilidad de formar agregados ya que el ζ fue menor a -30 mV, por lo que se garantiza que el sistema presenta estabilidad física en dispersión (Schramm, 2005).

7.5.1.1. Tamaño de partícula e PDI durante el almacenamiento

Puesto que parte de la inestabilidad de los sistemas se ve reflejada por los cambios en el tamaño de partícula, la Figura 7.37 muestra el comportamiento de las suspensiones de NLS en función a la concentración y tiempo de almacenamiento.

Aunque hubo una tendencia de incremento en el tamaño de partícula a través del tiempo, el intervalo de tamaños fue de 210 hasta 265 nm dependiendo de la concentración de NLS. Resaltando que las muestras con goma xantana tienen un tamaño de partícula ligeramente menor que el de las NLS sin goma xantana, esto es atribuido a que durante la incorporación de la goma xantana fue necesario llevar a cabo una homogenización a 10,000 rpm, lo que contribuyó a darle homogeneidad al sistema.

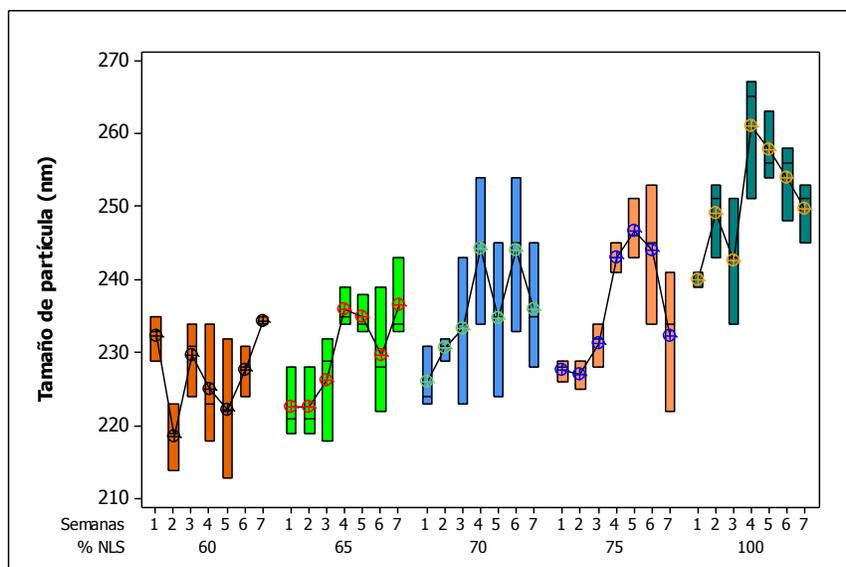


Figura 7.37 Variación del tamaño de partícula en función al tiempo de almacenamiento y % de NLS a una concentración constante de 0.4 % de goma xantana.

La estabilidad física de las nanopartículas lipídicas sólidas está en función de dos factores: la capacidad de la suspensión a permanecer dispersa homogéneamente (fenómenos electrocinéticos) y no presentar fenómenos de cristalización (polimorfos) (Weiss *et al.*, 2008). Las muestras con 60, 65 y 70% de NLS se mantienen estables en cuanto al tamaño de partícula durante las primeras cinco semanas, presentando un discreto incremento de 9 nm en promedio, lo cual no ocurrió para las concentraciones de 75%. Es importante destacar que el tamaño de partícula está íntimamente ligado al PDI debido a que al disminuir el tamaño de partícula la superficie de contacto de las partículas se reduce y se evita su aglomeración (Jiménez *et al.*, 2009).

El PDI presentó variaciones de entre 0.22 y hasta 0.35 durante las 8 semanas en las que se evaluó, lo que implica que las muestras no sufrieron modificaciones considerables en cuanto a la amplitud en la distribución de tamaños de partícula.

7.5.1.2. Cambios de ζ durante almacenamiento

La Figura 7.38 muestra la variación del ζ durante el almacenamiento. El ζ no mostró variaciones respecto a la concentración de NLS dentro de una misma

concentración de goma en el sistema, Aunque a medida que aumento el % de NLS se obtuvieron mayores valores del potencial. Por lo que se puede mencionar que las características de carga de los grupos carboxilo de la goma xantana contribuyen a darle mayor estabilidad al sistema (Radomska-Soukharev, 2007).

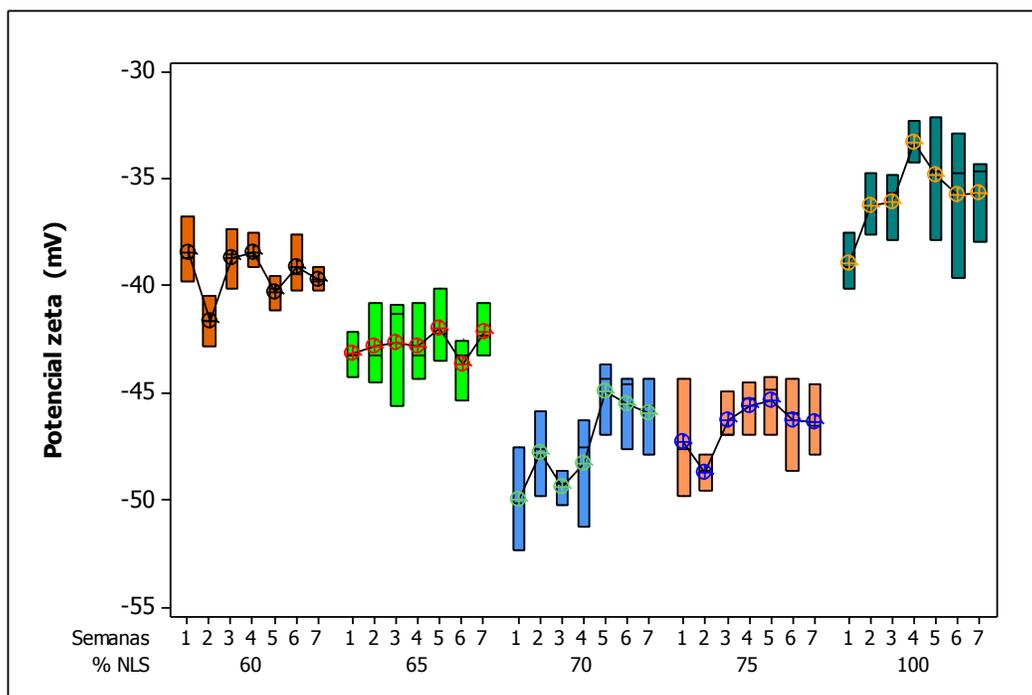


Figura 7.38 Variaciones el potencial zeta durante el almacenamiento de NLS con concentración constante de goma xantana (0.4%) y propilenglicol (0.5%).

El ANOVA, mostró diferencias estadísticamente significativas del ζ por efecto de la adición de goma xantana y plastificante a la formulación, sin que por ello implique que el sistema sea inestable puesto que este fue de entre -35 a -50 mV dependiendo del % NLS. Probablemente debido a las propiedades interfaciales que presentan ambos componentes, el propilenglicol y goma xantana. La disminución del potencial no pone en riesgo la estabilidad física de la dispersión, y por ello no se observaron fenómenos de agregación visibles durante las 8 semanas en que se monitoreó el comportamiento de las dispersiones. El mayor valor de ζ fue para las suspensiones con menor proporción de NLS, este comportamiento puede ser atribuido a un mayor efecto de los grupos carboxilo de la goma xantana y al efecto del polietilenglicol que interactúa con los puentes de hidrógeno, provocando una disminución en el ζ cuando él % de NLS aumenta.

Con los valores de potencial obtenidos para todos los recubrimientos es posible suponer que los sistemas se mantuvieron estables durante el almacenamiento (Noriega-Peláez *et al.*, 2011; Zambrano-Zaragoza *et al.*, 2011).

7.6. Caracterización Superficial de NLS

La Figura 7.39 muestra las observaciones en microscopía electrónica de barrido de las suspensiones de NLS con 10 % de cera de candeuba.

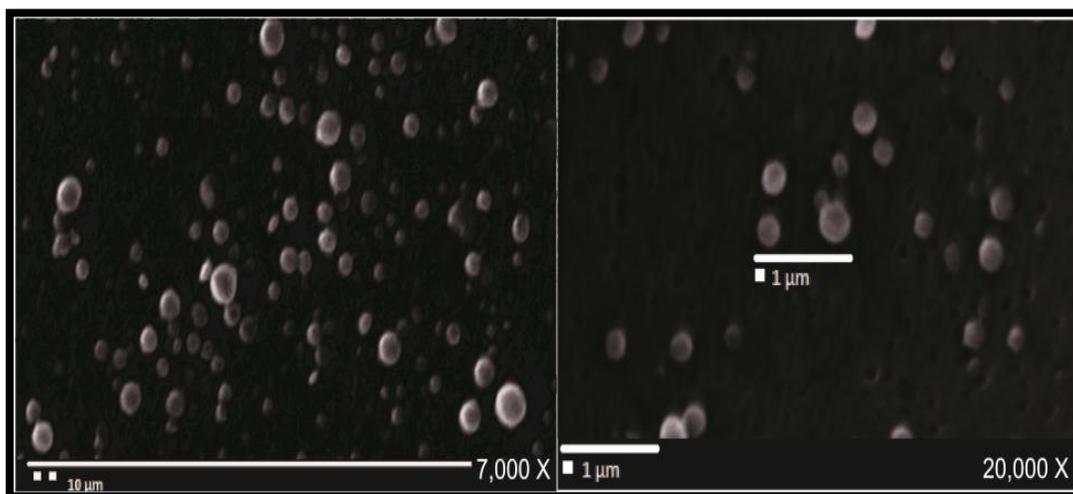


Figura 7.39 Micrografías de Nanopartículas Lipídicas Sólidas de cera candeuba (suspensión al 10 %).

Las partículas se mostraron de forma esférica regular con superficie no porosa, de talla submicrónica cuya magnitud y distribución se correlaciona con los datos obtenidos y discutidos en el tamaño de partícula obtenido por el método de dispersión de luz.

7.7. Calidad visual del Fruto durante el desarrollo experimental

La Figura 7.40 muestra fotos representativas del aspecto del recubrimiento sobre guayaba en función a la concentración de goma xantana con plastificante. La elección de la concentración más adecuada de goma xantana a utilizar se realizó tomando en cuenta el aspecto visual y la cantidad de recubrimiento retenido en la superficie del fruto.

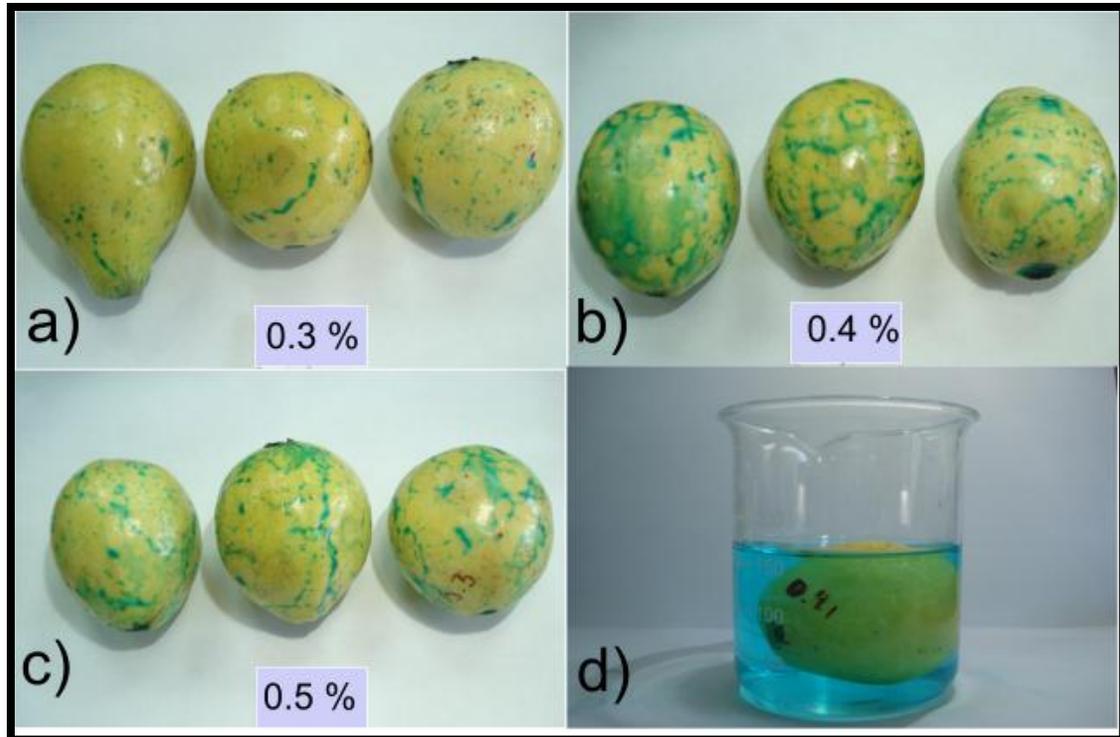


Figura 7.40. Fotos de los recubrimientos con goma xantana/plastificante. a) 0.3 % goma xantana, b) 0.4 % goma xantana y c) 0.5 % goma xantana aplicados a 20°C. d) solubilización del recubrimiento en agua

En la Figura 7.41 se presentan las fotografías tomadas a guayabas tratadas con una formulación que contenía 60 % de una suspensión inicial de NLS (10 % de cera de candeuba), entre 0.3 y 0.5 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol.

Se aprecia que a concentraciones de 0.5 % de goma xantana, la viscosidad del sistema aumenta debido a la presencia de las NLS, dando como resultado un recubrimiento de mayor espesor (visualmente perceptible). Este comportamiento nos sugiere que este recubrimiento podría limitar el intercambio gaseoso entre el ambiente y el pericarpio del fruto, disminuyendo con ello la disponibilidad de oxígeno y transpiración del fruto, por lo que esta concentración de goma xantana fue descartada. Considerando el resto de las concentraciones experimentadas se eligió una concentración de 0.4 % de goma xantana.

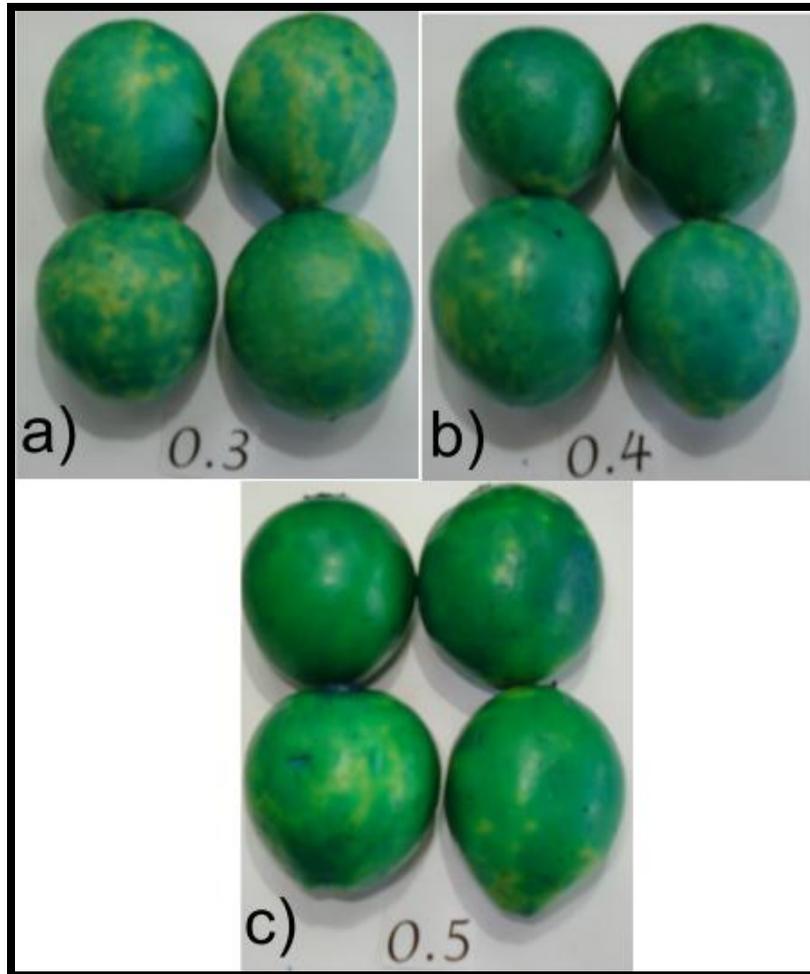


Figura 7.41 Distribución de recubrimientos con diferentes concentraciones de goma xantana, 60 % NLS y 0.5 % de propilenglicol a) 0.3 % de goma xantana, b) 0.4 % de goma xantana, c) 0.5 % de goma xantana.

7.7.1 Aspecto visual de guayaba previo a la aplicación de los recubrimientos

Previo a la aplicación de los recubrimientos se llevó a cabo la caracterización y homogenización inicial del lote de guayaba adquirido. Las guayabas fueron divididas en 6 lotes para la aplicación de los recubrimientos, se muestrearon 45 guayabas de cada lote para evaluar la homogeneidad en tamaño. La Figura 7.42 muestra el aspecto visual que resalta el color y tamaño promedio de las guayabas utilizadas para llevar a cabo la experimentación y que mostraron un diámetro promedio de 4.44 cm.



Figura 7.42 Guayaba variedad Media china al inicio de la experimentación con diámetro promedio de 4.44 cm.

7.7.2 Cambios en calidad visual de guayaba durante el almacenamiento

La Figura 7.43 muestra los cambios en el aspecto visual de los frutos de guayaba tratados con NLS (a base de cera de candeuba) a diferentes concentraciones durante el almacenamiento a 8 °C. Las muestras control mostraron senescencia después de dos semanas de almacenamiento; mientras que las tratadas con goma xantana sin NLS retrasaron el desarrollo de color durante tres semanas de almacenamiento; y los otros frutos tratados con 60% de NLS mostraron un retraso de cambio de color más prolongado indicando que la incorporación de NLS tuvo efectos en el proceso de cambio de color. Las muestras con 75 y 80 % de NLS no mostraron la evolución normal del cambio de color de la piel indicando una posible alteración fisiológica de los frutos tratados con esos recubrimientos. Las guayabas con 75 % de NLS mostraron daños visibles a partir de la tercera semana de almacenamiento. Mientras que en las muestras con 80 % de NLS, los daños fueron perceptibles desde la primera semana incrementándose significativamente en la segunda semana.

Tratamiento	SEMANA				
	1	2	3	4	5
CONTROL					
GOMA XANTANA					
60 % NLS					
65 % NLS					
70 % NLS					
75 % NLS					
80 % NLS					

Figura 7.43 Cambios en el aspecto visual de frutos de guayaba durante el almacenamiento refrigerado a 8°C.

Las muestras recubiertas con goma xantana, y 60, 65 y 70 % de NLS no mostraron diferencias visuales entre ellas durante los primeros 19 días de almacenamiento con un desarrollo de color amarillo (ángulo Hue de 99) No obstante, la evolución de este cambio fue más lento que el mostrado por los frutos control.

En la Figura 7.44 se muestra el aspecto visual de los frutos transferidos de refrigeración a 8°C y luego transferidos a ambiente (20 °C) por cinco días. Los frutos control mostraron síntomas de senescencia después de dos semanas de refrigeración y luego durante cinco días a 20°C; mientras que los frutos con goma de xantana mostraron esos síntomas después de tres semanas de almacenamiento refrigerado a 8°C y posteriormente cinco días a 20°C. Los frutos tratados con cera de candeuba y 60% de NLS retuvieron una mejor condición de color durante el almacenamiento refrigerado y sus transferencias a 20°C; mientras que los frutos tratados a partir de 70 % mostraron síntomas de alteraciones fisiológicas que pudieron ser indicadores de estrés para los frutos.

Por lo tanto desde el punto de vista visual pareciera que la condición de 60% de NLS podría ser una condición más aceptable de uso de estos recubrimientos.

Las muestras con 60, 65 y 70 % de NLS no revelan diferencia significativa en aspecto del color durante el periodo de almacenamiento. La mayor retención de color fue para las muestras con 65 y 70 % de NLS. A pesar de que los recubrimientos con 60 % de NLS desarrollan una mayor velocidad de cambio de color y SST, presentaron un menor periodo de vida útil. Por otro lado, la goma xantana no mostró diferencia estadísticamente significativa respecto a las recubiertas con NLS a 60 % hasta los 24 días de almacenamiento, a partir de este momento el fruto sufre cambios rápidamente, considerándose entonces que la concentración que mejora las características visuales del fruto corresponde al 60 % de NLS.

7.8 Observaciones de microscopía electrónica de guayabas recubiertas

En la Figura 7.45 se muestra la morfología del pericarpio de los frutos de guayaba control (sin recubrimiento).

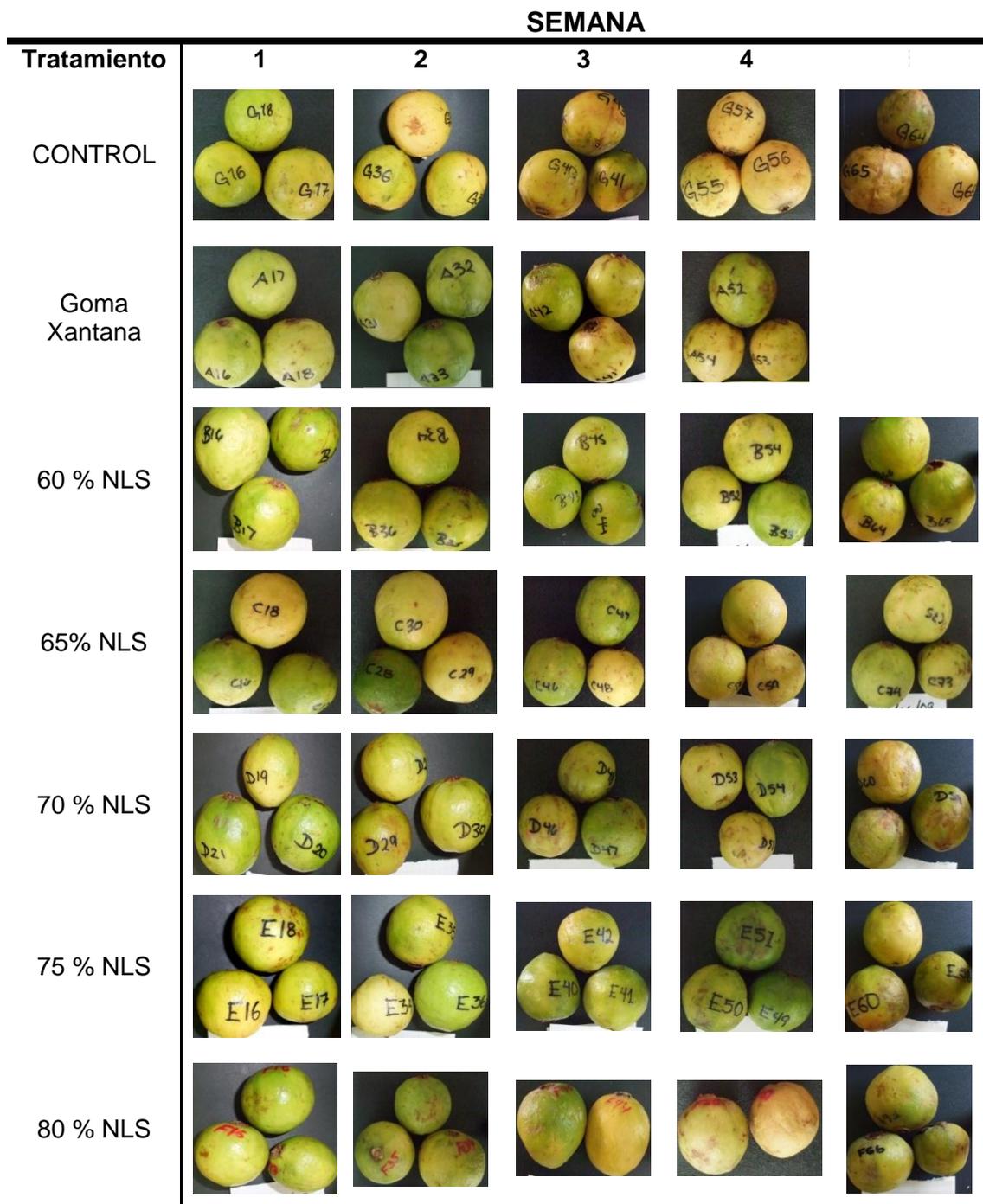


Figura 7.44 Cambios en el aspecto visual de guayabas transferidas 5 días a temperatura ambiente después del periodo de almacenamiento refrigerado poner temperatura 8°C.

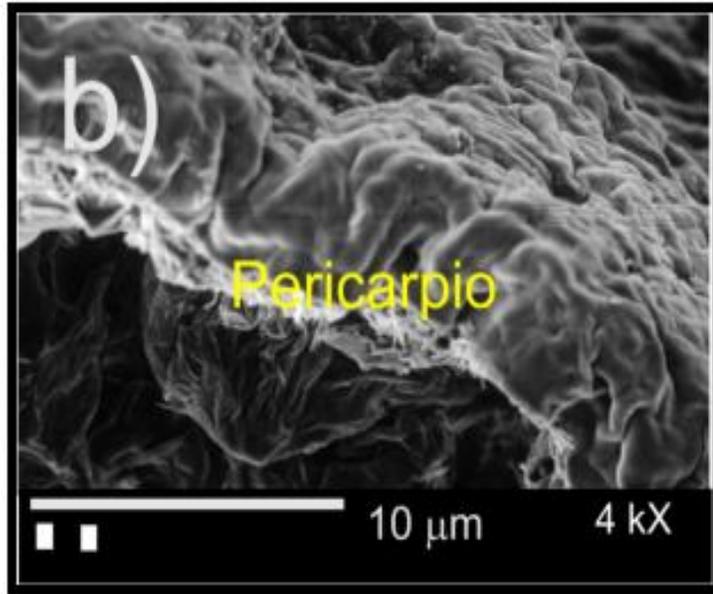


Figura 7.45 Micrografía del corte lateral de guayaba sin tratamiento inmediatamente después de aplicado el recubrimiento .

La distribución del recubrimiento formado con goma xantana sobre el pericarpio de guayaba se muestra en la Figura 7.46.

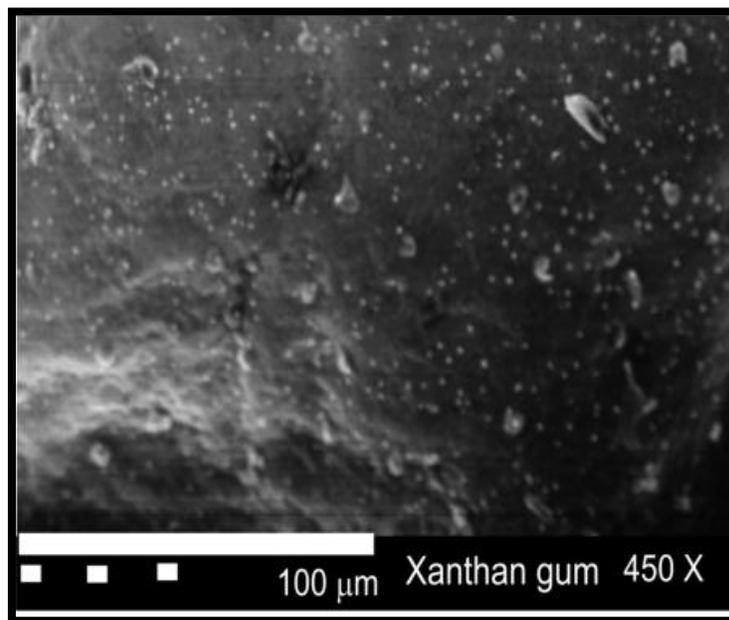


Figura 7.46 Micrografía de guayaba con recubrimiento a base de goma xantana (0.4 %) y propilenglicol (0.5%).

Se aprecia una película continua, lisa, homogénea con pequeñas burbujas de aire. La formación de una película homogénea permite el control del

intercambio de gases de la respiración del fruto a través de la permeabilidad de la película.

La Figura 7.47 muestra la superficie de las guayabas tratadas con 60 % de NLS.

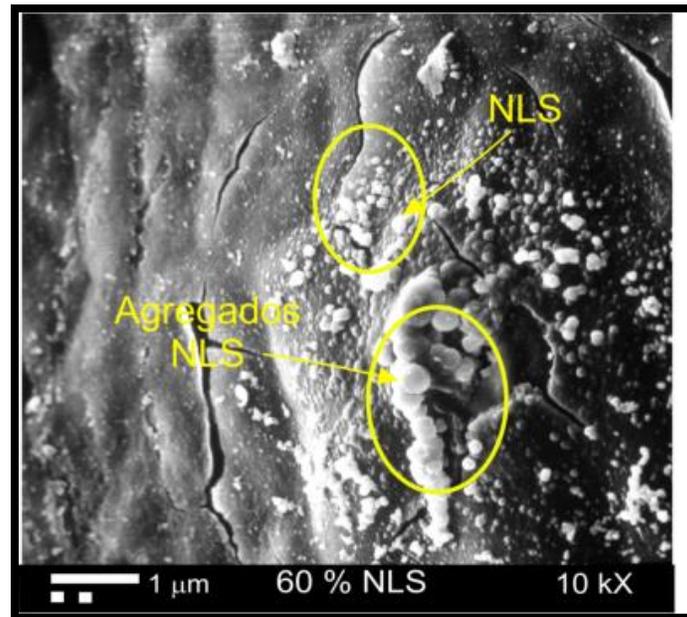


Figura 7.47. Micrografía de guayaba con recubrimiento 60 % de NLS, 0.4 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol.

Se observa la presencia de pequeñas esferas de talla submicrónica, presumiblemente las NLS. También es posible apreciar agregados de NLS alrededor de las lenticelas del fruto. Las lenticelas juegan un importante rol en el proceso de transpiración e intercambio gaseoso con el medio ambiente, razón por la que el agua que migra desde el interior a la superficie del fruto ocasiona que el material hidrofóbico se agregue por afinidad química y por ello la agregación. La presencia de NLS en estas regiones sugiere modificaciones en el proceso metabólico del fruto, debido a que el material agregado impide que el oxígeno se encuentre disponible lo que hace que el fruto cambie su fisiología.

Los recubrimientos con 60 % de NLS retardaron el proceso de maduración de los frutos, sin agregaciones aparentes, lo que es benéfico para la comercialización del producto, ya que logró mantener la calidad visual del fruto por

30 días. La Figura 7.48 muestra que las NLS se encuentran homogéneamente distribuidas en la superficie como parte del recubrimiento formado.

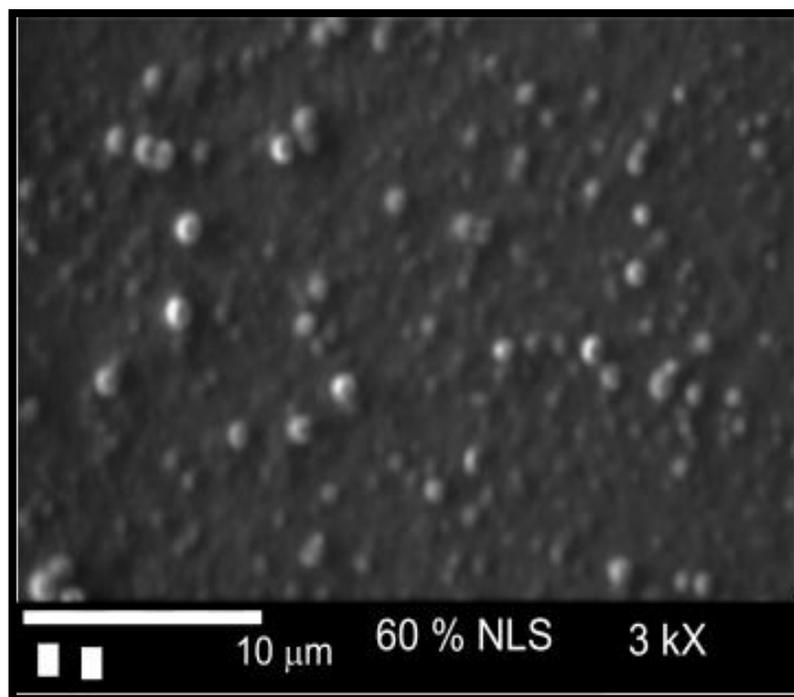


Figura 7.48 Distribución de recubrimiento con 60 % de NLS en el pericarpio de guayaba.

Esta distribución de las NLS posiblemente permita modificar la permeabilidad de los gases del recubrimiento, contribuyendo con ello a limitar el intercambio gaseoso y por ende la velocidad de respiración del fruto.

La Figura 7.49 muestra las micrografías del recubrimiento con 65 % de NLS, en las que se observa una distribución homogénea pero más densa de NLS en el pericarpio de guayaba, teniendo en apariencia que ver la funcionalidad del recubrimiento en la conservación, y junto con el de 60 % de NLS fueron los que tuvieron mejor funcionalidad en la conservación del producto.

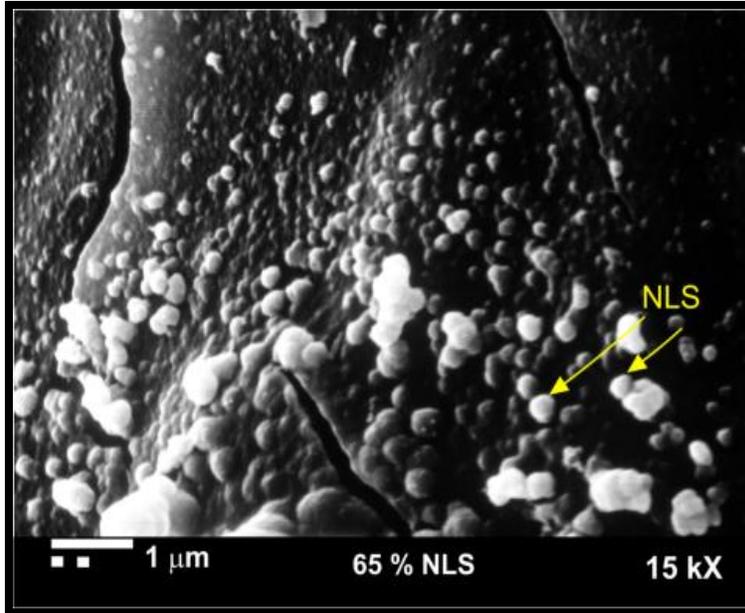


Figura 7.49 Micrografía de guayaba con 65 % de NLS, 0.4 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol.

La figura 7.50 muestra la micrografía correspondiente a guayaba recubierta con 70 % de NLS.

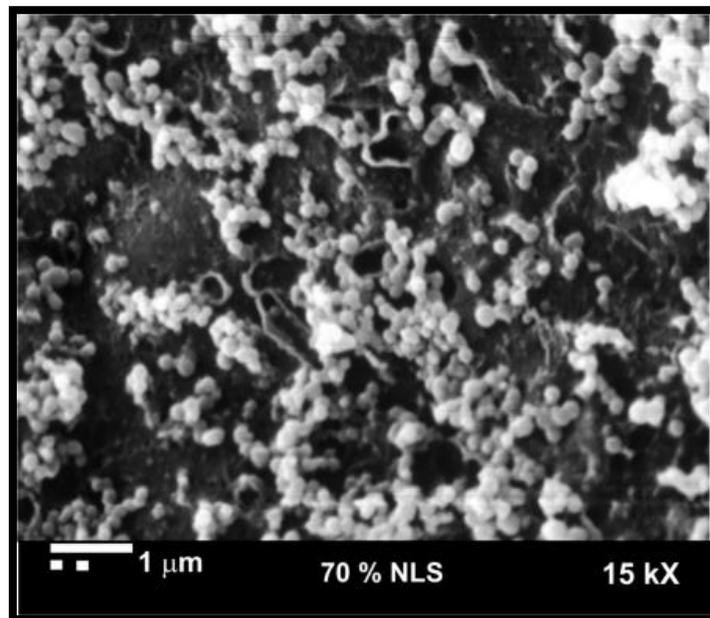


Figura 7.50 Superficie de guayaba recubierta con 70 % de NLS, 0.4 % de goma xantna y 0.5 % de propilenglicol.

La Figura 7.50 muestra una importante acumulación y mayor densidad de nanopartículas sobre la superficie del recubrimiento, esta distribución podría

modificar la disposición de oxígeno y por lo tanto la respiración del fruto, y probablemente relacionarse con los cambios asociados a la calidad visual de los frutos tratados con este recubrimiento.

La Figura 7.51 representa la superficie de la guayaba recubierta con 75 % de NLS.

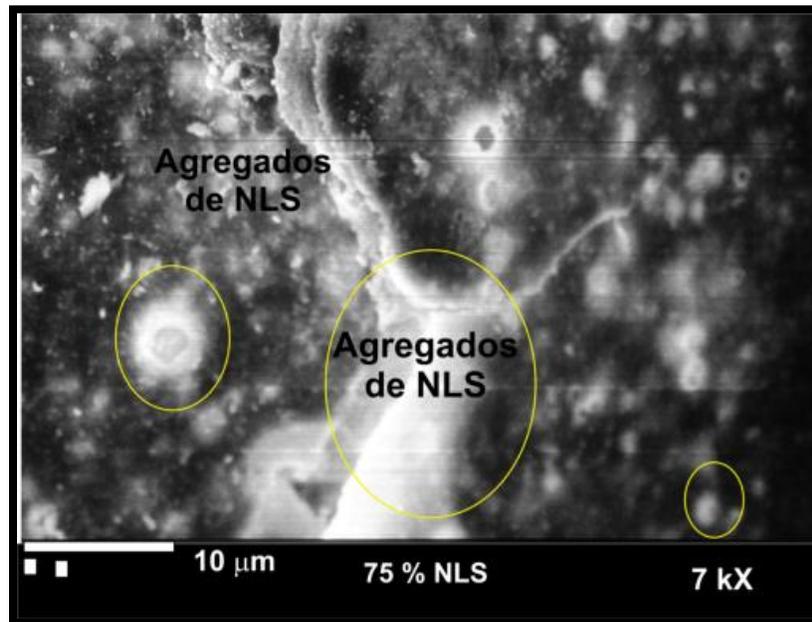


Figura 7.51 Superficie de guayaba recubierta con 75 % de NLS, 0.4 % de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol.

El aspecto más relevante de estas imágenes es la formación de agregados de NLS y formación de pequeños espacios donde se observa una mayor cantidad de cera, los cuales seguramente tuvieron un papel en el desarrollo de los síntomas de estrés y senescencia de los frutos debido a que estos agregados afectaron negativamente el transporte de gases del ambiente al fruto y viceversa. Razón por la que es importante considerar la concentración óptima de NLS de tal manera que la agregación por efecto de afinidad química no ponga en riesgo el proceso metabólico del fruto provocando cambios indeseables.

La Figura 7.52, presenta la imagen de guayaba recubierta con un sistema que contenía 80 % de NLS.

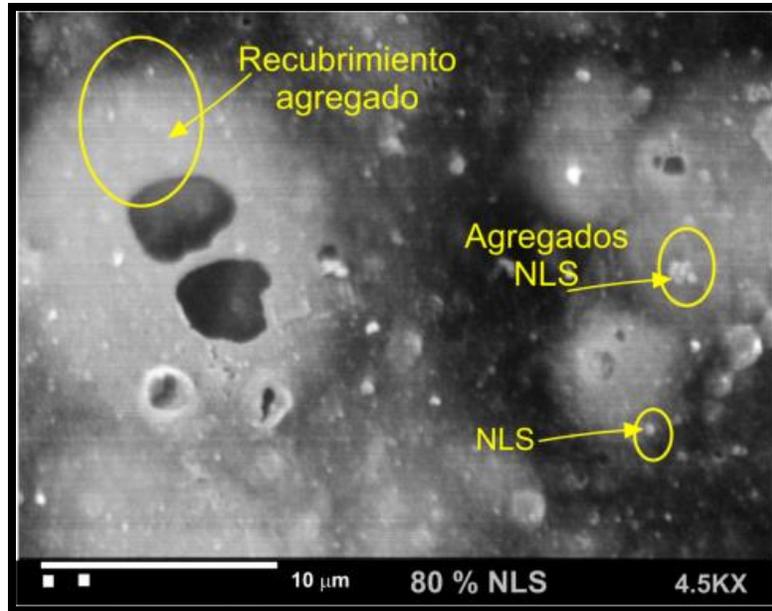


Figura 7.52 Micrografía de guayaba recubierta con 80 % de NLS, 0.4 % goma xantana y 0.5 % propilenglicol, con agregados de NLS.

Nuevamente en la Figura 7.52 se aprecia de manera evidente la fuerte agregación y formación de una capa de cera que alcanzo espesores de aproximados de $13\mu\text{m}$ lo cual seguramente alteró fuertemente la respiración del fruto.

7.9 Cambios de color en Guayaba recubierta con NLS

El color de la cáscara se relaciona con el ángulo de color Hue, que es una medida objetiva que expresa las diferencias de color del pericarpio del fruto y una visualización más precisa de los cambios de madurez. Un valor de 180° representa un color verde y uno de 90° un color amarillo. Los principales procesos involucrados en la pérdida de coloración verde durante el almacenamiento son la degradación de la clorofila y la síntesis de caroteno, siendo esta última uno de los principales criterios para valorar la maduración de frutas y hortalizas (Gross, 1987). En la Figura 7.53 se muestran los cambios en color asociados al almacenamiento refrigerado.

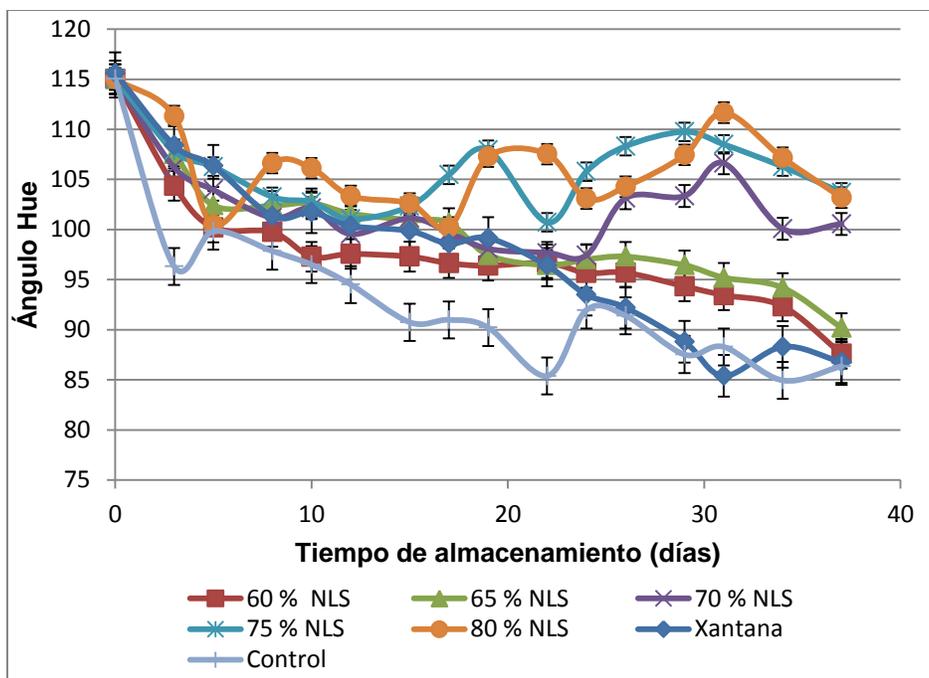


Figura 7.53 Cambios en ángulo de matiz (Hue) en guayaba refrigerada a diferentes concentraciones de NLS y una concentración constante de 0.3 % de goma xantana y 0.5 % de propilenlicol.

Los frutos de guayaba con los que se realizó el experimento tenían un color verde claro (valor de hue 116°), el cual cambio hasta un color amarillo (valor hue de 90°) a los 22 días de almacenamiento a 8°C. La goma xantana empleada como recubrimiento retrasó el cambio de color y alcanzó valores similares al control después de 24 días de almacenamiento (valor hue 93°); de forma similar, aunque de manera más evidente, las frutas recubiertas con 60 y 65 % de NLS (con 0.4 % de goma de xantana) retrasaron más su desarrollo de color alcanzando valores hue de 92 y 94° respectivamente después de 34 días de almacenamiento. Hasta el día 24 de almacenamiento los frutos con 70 % de NLS mostraron un retraso en el cambio de color verde claro (116°) a amarillo (~ 95°), de forma similar a la guayaba tratada con 60 y 65 %, sin embargo a partir de los 15 días de almacenamiento, aparentemente ya no existieron cambios evidentes en el pericarpio del fruto, asociándose este con daño fisiológico debido a que existió inhibición del proceso de respiración en el fruto, estos efectos se observaron en la Figura 7.42, mostrada en páginas anteriores, donde se observa el aspecto visual del fruto ante los diferentes recubrimientos empleados.

Las guayabas con 75 % de NLS muestran daños visibles a partir de la tercera semana de almacenamiento. En las muestras con 80 % de NLS, los daños son perceptibles desde el final de la primera semana incrementándose significativamente en la segunda.

Las muestras recubiertas con goma xantana, y 60, 65 y 70 % de NLS no mostraron diferencia estadísticamente significativa hasta los 19 días de almacenamiento con un desarrollo de color tendiente al amarillo (ángulo Hue de 99) que coincide con el aspecto mostrado en las fotografías. Después de este tiempo la guayaba recubierta con goma xantana incrementó su velocidad de maduración para alcanzar su máximo en refrigeración a 8 °C a los 22 días de almacenamiento. Por otro lado, las muestras con 70 % de NLS mostraron un buen desarrollo de maduración hasta la segunda semana de almacenamiento, como lo muestran las fotografías de la Figura 7.42, sin embargo, después de los 19 días las muestras tuvieron cambios de color asociados con efectos por acumulación de CO₂ atribuible al desarrollo de algunos daños fisiológicos que promovieron el desarrollo de manchas cafés y que no permitieron la maduración del fruto.

En la Figura 7.54 se muestra el desarrollo de color expresado en función al ángulo Hue para las muestras refrigeradas posteriormente 5 días de almacenamiento a temperatura ambiente (25°C).

Las muestras control mostraron un cambio de color más rápido en comparación de los frutos tratados; mientras que los frutos tratados con goma de xantana mostraron cierto retraso en el cambio de color que se igualó al control al final del periodo de almacenamiento. Los frutos tratados con goma de xantana adicionada con 60 y 65 % de NLS no mostraron diferencias significativas entre ambos tratamientos aunque mostraron un retraso respecto de los frutos control.

Las muestras tratadas con goma de xantana y 75 y 80 % de NLS mostraron los menores cambios de color durante el almacenamiento. Lo que indicó una alteración importante del proceso de maduración de los frutos que permanecieron prácticamente sin cambio respecto del color inicial (116°).

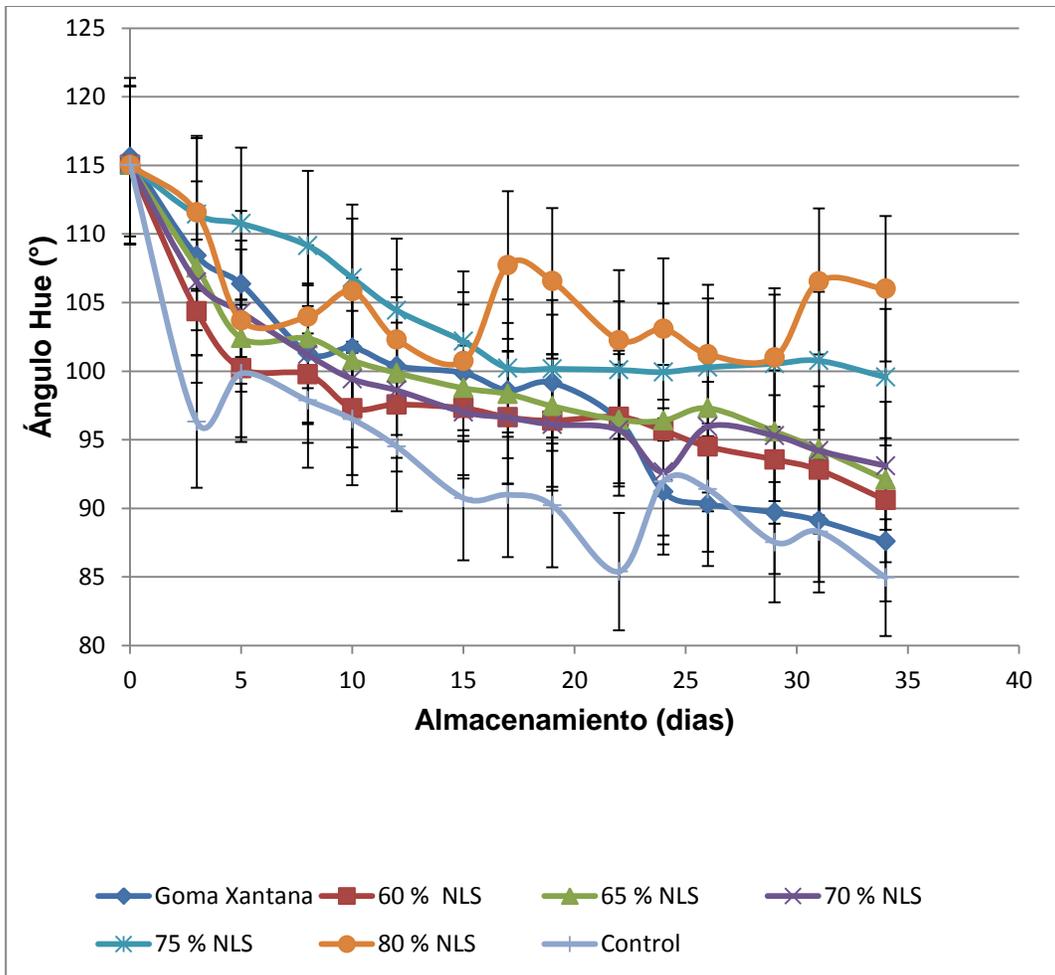


Figura 7.54. Cambios de color de guayabas refrigeradas + 5 días a temperatura ambiente.

Esto sugiere que una vez que el producto es transferido a temperatura ambiente, éste no desarrolla cambios de color que puedan ser asociados a la maduración normal del fruto (Mercado-Silva, 1998). Indicando con esto un efecto muy fuerte del recubrimiento sobre la fisiología del fruto.

De acuerdo con los datos de calidad visual, imágenes al microscopio electrónico y cambios de color es posible indicar que los tratamientos de goma de xantana adicionada con 60 % de NLS pudieran ser consideradas con posibilidades de aplicación en frutos de guayaba.

7.10 Cambios Fisicoquímicos

7.10.1. Pérdida de peso

Una vez aplicados los recubrimientos se tomaron muestras cada tercer día hasta los 31 días, esto se llevó a cabo tanto para las guayabas refrigeradas como para aquellas que fueron transferidas a temperatura ambiente.

Uno de los principales problemas durante el almacenamiento de los frutos, es la pérdida de peso por causa de los procesos de respiración y transpiración debido a que esto conduce a un ablandamiento de los tejidos y torna al producto más susceptible a deteriorarse (Baldwin *et al.*, 1999; Azzolini *et al.*, 2005).

La Figura 7.55 muestra la pérdida de peso para guayaba refrigerada a 8°C, durante el período de almacenamiento y previo a la transferencia del producto a temperatura ambiente.

De manera lógica, la mayor pérdida de peso (15.6%) la presentaron los frutos control o no recubiertos los cuales mostraron velocidades promedio de pérdida de peso de 0.71 g/día ($R^2 = 0.91$). Los frutos recubiertos con goma de xantana sin adición o con adición de 75 y 80% de NLS tuvieron pérdidas de peso similares entre sí pero ligeramente menores que el grupo control (12.9, 12.6 y 12.4 %). A estos tratamientos le siguieron los tratados con 65 y 70% de NLS los cuales alcanzaron una pérdida de peso de 9% y los frutos tratados con 60% alcanzaron pérdidas de peso de 7.7%, no obstante su velocidad de pérdida promedio fue muy parecida (0.24 g/día) aunque el tratamiento con 60% de NLS mantuvo valores más bajos durante el almacenamiento.

Para el caso de la goma xantana que mostró una pérdida de peso alta, se puede atribuir que esa pérdida de peso fue debida a la naturaleza hidrofílica de la goma lo que conlleva a adsorber más moléculas de agua del fruto, las cuales son transportadas y liberadas al ambiente exterior ocasionando una alta pérdida de peso (García *et al.*, 2000). Según Perez-Gago (2003), los recubrimientos de polisacáridos y de proteínas, debido a su naturaleza hidrofílica, forman una barrera poco efectiva al agua.

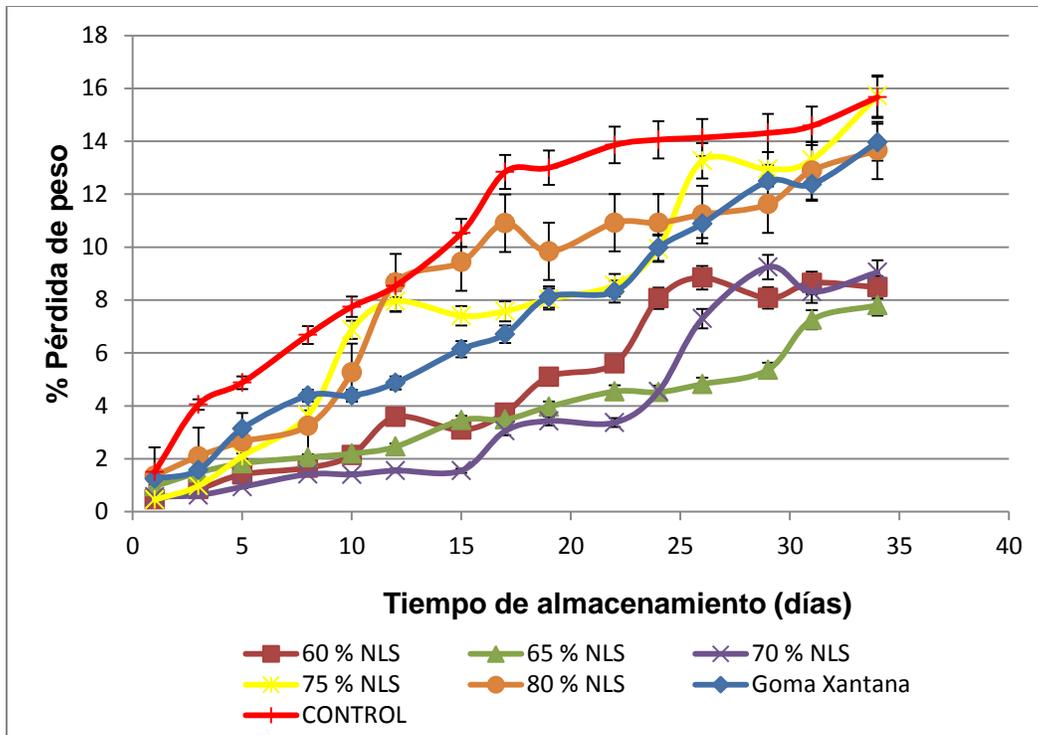


Figura 7.55 Pérdida de peso de guayaba refrigerada a 8°C durante almacenamiento.

Se esperaba que los tratamientos con adición de NLS controlaran la pérdida de peso de manera proporcional al contenido de NLS; no obstante y de manera interesante, esto no ocurrió ya que las de menor contenido de NLS mostraron las menores pérdidas de peso. Aunque no se tienen datos para explicar este comportamiento, es probable que al aumentar la densidad de NLS sobre la superficie de los frutos, además de la formación de agregados de los mismos, se formó una película que dificultó el paso de oxígeno al interior de fruto lo cual generó un ambiente anaerobio que indujo posiblemente la respiración anaerobia lo cual llevó a un consumo acelerado de sustratos en el tejido y por tanto una mayor pérdida de peso. Es factible que este mismo fenómeno explique los cambios anómalos de color para estos recubrimientos. Bajo esa misma explicación, la posibilidad que los recubrimientos de menor proporción de NLS actuaran como barreras de humedad (disminuyendo la pérdida de agua) limitando en menor proporción el intercambio de gases lo cual posiblemente evitó las condiciones de anaerobiosis y por tanto un mayor consumo de sustratos. Banks *et al.* (1993) resaltaron la importancia de relacionar la pérdida de masa fresca a las condiciones

de maduración de frutos puesto que la barrera al vapor de agua está en relación con la salida de gases, lo que ocasiona estrés biótico al proceso de maduración y anaerobiosis.

Se ha documentado que el empleo de ceras contribuye a disminuir la pérdida de peso. Saucedo-Pompa *et al.*, (2009) propusieron un recubrimiento a base de cera de candelilla para aguacate, observando que la pérdida de peso fue de 13.5 % después de 8 días de almacenamiento. Nuestros resultados soportan la hipótesis que las NLS a concentraciones de entre 60 y 65 % limitan la pérdida de peso a un mínimo del 7.7 %.

En la Figura 7.56 se muestran los cambios asociados a la pérdida de peso durante el tiempo que los frutos transferidos permanecieron en almacenamiento.

La tendencia de las muestras con 80 % de NLS es a incrementar la pérdida de peso a temperatura ambiente, siendo esta superior, en algunas etapas, a las del control. Se especula que a esta concentración de NLS la guayaba se afecta fisiológicamente lo que provoca un incremento en la transpiración y por ende una mayor pérdida de peso. Las muestras transferidas a temperatura ambiente con 60 y 65 % de NLS mostraron una evolución de maduración correspondiente a la guayaba sin cambios o modificaciones que hicieran inferir daño fisiológico.

Es necesario resaltar que las muestras con 60 y 65 % de NLS no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($\alpha= 0.05$) respecto a la pérdida de peso con 9.5 % durante el total del periodo de almacenamiento, lo que implica que los sistemas con estas concentraciones de NLS parecieran tener un efecto positivo en cuanto al intercambio de vapor de agua de las frutas almacenadas en refrigeración.

De acuerdo con los resultados obtenidos es posible afirmar que los sistemas de talla submicrónica contribuyen a disminuir la pérdida fisiológica de peso con un recubrimiento homogéneamente distribuido en la superficie del fruto. En este sentido, se ha confirmado por numerosos estudios que los recubrimientos

contribuyen a disminuir la pérdida de agua en guayaba (Pal et al., 2004; Singh y Pal, 2008).

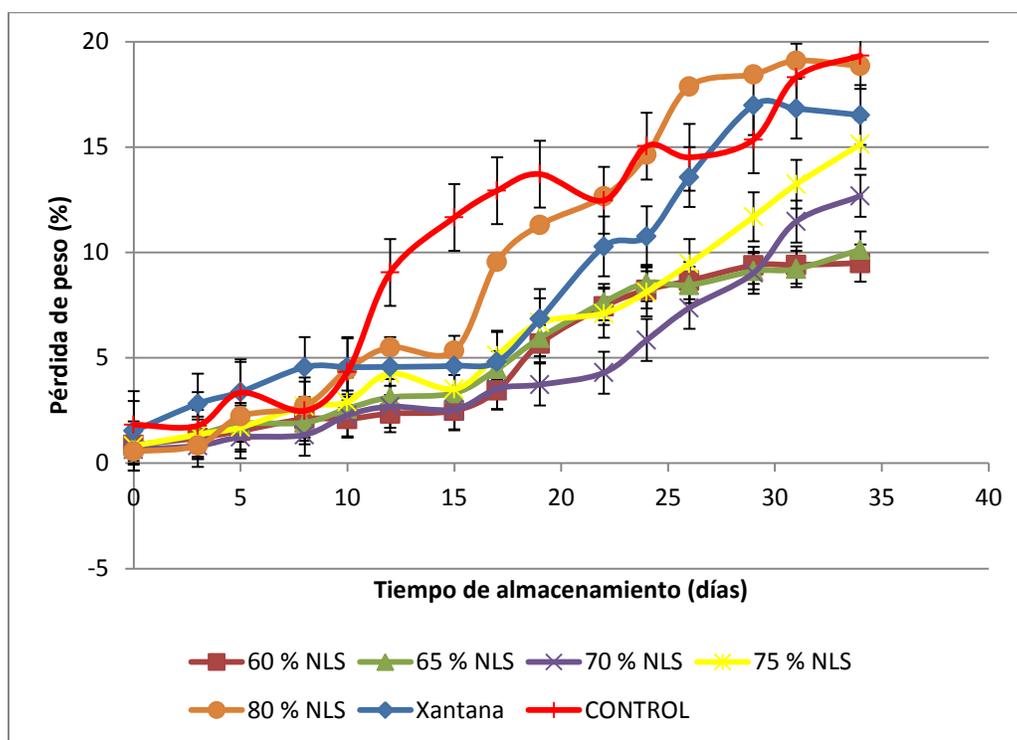


Figura 7.56 Pérdida de peso en guayaba transferida a temperatura ambiente después del periodo correspondiente de refrigeración.

Generalmente la pérdida de peso es debida a la modificación en la permeabilidad al vapor de agua en el pericarpio del fruto (Singh et al., 2008) y a la degradación de algunos compuestos químicos debido a la actividad fisiológica como el almidón a azúcares (Bashir y Abu-Goukh, 2003). De acuerdo a la FDA, la pérdida de peso del fruto no debe ser mayor al 8% durante el almacenamiento. La menor disminución en el contenido de humedad de las muestras recubiertas con respecto al control puede justificarse por la naturaleza hidrofóbica del recubrimiento, el cual actúa como barrera al agua y presenta mayor eficiencia en la retención (Garcia-Ochoa *et al.*, 2000; Baldwin *et al.*, 1995). La pérdida de peso en las muestras a temperatura ambiente es mayor a las que se encuentran en refrigeración debido a los cambios en la velocidad de evaporación del agua en la superficie del pericarpio y modificación en la actividad respiratoria del fruto por efecto de la temperatura, tal y como lo reporta Castellano *et al.* (2005), donde las

muestras control tuvieron una pérdida de peso de 16-18%, las muestras de esta experimentación perdieron el 20 % aproximadamente al día 30. Es claro que el uso de altas temperaturas contribuye a acelerar los procesos metabólicos y por ende la velocidad de respiración aumentando la presión parcial del O₂, como se ha reportado para aguacate cubierto con una película de polietileno de baja densidad (Zarazúa-Escobar *et al.*, 2005).

7.10.2. Cambios en Sólidos Solubles Totales (SST)

En la Figura 7.57 se muestran los cambios en SST que tuvieron las muestras de guayaba tratadas con distintos recubrimientos y almacenadas a 8°C durante 31 días.

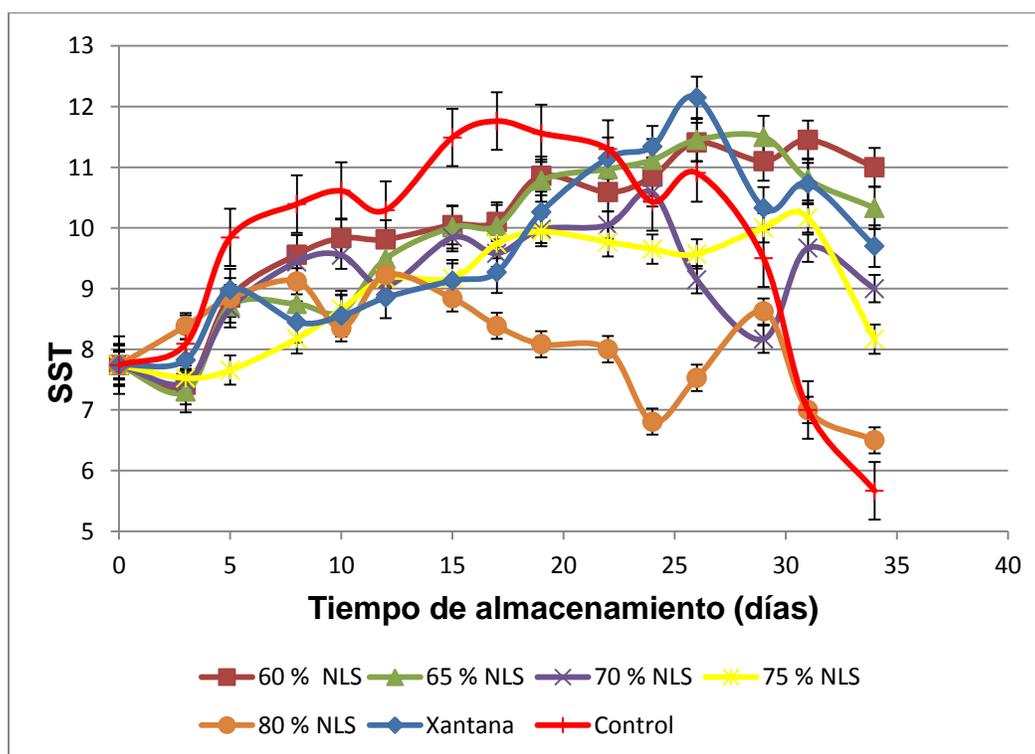


Figura 7.57 Cambios en sólidos solubles totales en guayaba refrigerada a 8°C con recubrimientos a diferentes proporciones de NLS, goma xantana (0.4 %) y propilenglicol (0.5 %).

Las guayabas control alcanzan su máximo contenido de SST (11.9%) a los 15 días de almacenamiento y disminuyen a partir de este tiempo. Este decremento posterior puede estar asociado al proceso de senescencia del fruto; como lo muestran las imágenes de calidad visual descritas en el inicio de la

descripción de estos resultados y concuerda con los valores anotados por Mercado-Silva et al. (1998) en frutos de guayaba de esta misma variedad. Las muestras con 60 y 65 % de NLS retrasaron el incremento en el contenido de sólidos solubles alcanzando valores similares al control después de 26 días de almacenamiento lo cual parece indicar que estos tratamientos modularon el metabolismo de los frutos. Por lo que el cambio en la concentración de gases en la superficie del fruto modifica el intercambio gaseoso de tal manera que se logra retardar la maduración e incrementar el tiempo de vida útil (Singh and Pal: 2008).

Las muestras recubiertas con goma xantana mostraron una evolución ascendente del contenido de SST hasta el día 26 de almacenamiento alcanzando una concentración de SST de 12.2, lo que se relaciona con el dulzor desarrollado por estos frutos. Sin embargo, a partir de este tiempo se inicia la senescencia del fruto existiendo una disminución en el contenido de SST. Los resultados obtenidos para los sistemas con concentraciones de 60 y 65 % de NLS fueron los que mantuvieron mejor las características del fruto con un promedio de SST de 11. Un incremento en la concentración de NLS, por encima del 75 % puede provocar la obstrucción de las lenticelas con lo que se propicia la acumulación de metabolitos y CO₂, impidiendo que el fruto lleve a cabo sus procesos fisiológicos y viéndose reflejado como un daño fisiológico en el fruto.

Los tratamientos de gomas de xantana adicionadas de 70 a 80% de NLS mostraron una alteración en el proceso de acumulación de SST evidenciando que corrobora que efectivamente bajo esas condiciones se propició un estrés anaerobio que provocó un incremento en el consumo de sustratos (disminución de SST) y muy probablemente un incremento en la producción de CO₂.

La Figura 7.58 muestra los resultados de los frutos que se almacenaron a temperatura ambiente durante cinco días después de transcurrido el periodo de almacenamiento refrigerado correspondiente.

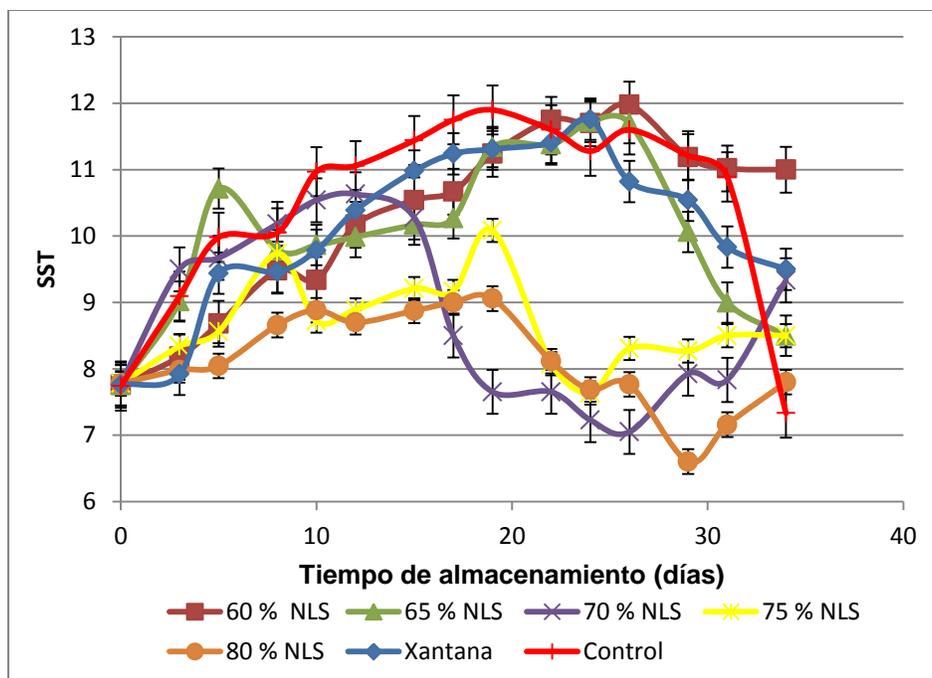


Figura 7.58 Cambios en SST para guayabas almacenadas a temperatura de refrigeración más 5 días a temperatura ambiente.

Las muestras control, mostraron un cambio gradual de los SST hasta los 15 días a medida que transcurrió el almacenamiento. Las muestras con 60 % de NLS retrasaron el incremento de SST alcanzando un máximo el día 24 con una velocidad de cambio de $0.17^{\circ}\text{Bx}/\text{día}$. También se observa que las guayabas con 65 % de NLS y goma xantana muestran un comportamiento similar, aunque después de 19 días comienza en ambos tratamientos (65 % NLS y goma xantana) una disminución en sólidos solubles. La muestras con 70% de NLS inicialmente no tuvieron problemas en el desarrollo de SST (10.3) hasta los 12 y cinco días a 25°C ; sin embargo, después de este tiempo disminuyeron drásticamente a un contenido de SST de 8. Los frutos con 75 y 80 % de NLS mostraron una marcada alteración del proceso y por tanto en la maduración, este comportamiento puede ser debido al microambiente generado en interior del fruto no propiciando un metabolismo normal; por lo que se produjeron cambios fisiológicos indeseables que se correlacionan con las alteraciones visuales y el cambio de color.

Los SST son una medida directa del contenido de azúcares de la guayaba, pues éstos representan el 85-90% del contenido total de SST en el producto, por lo que los resultados reflejan los cambios por desdoblamiento de

almidones y otros componentes. Los SST varían según la variedad y del tiempo en que se haya cosechado el producto (Mercado-Silva *et al.*, 1998).

No obstante y a pesar de que existen estudios donde se han aplicado otros recubrimientos como la goma de mezquite (Tomás *et al.*, 2005) es posible resaltar que el sistema con 60 % de NLS, logró modificar la atmósfera superficial limitando el intercambio gaseoso más efectivamente, logrando mantener el producto por mayor tiempo con un retardo en el máximo climatérico y por ende un incremento en los SST (Bashir y Abu-Goukh, 2003).

El comportamiento mostrado por los tratamientos a 60 y 65 % de NLS parece confirmar que este puede ser un tratamiento adecuado para la conservación de frutos de guayaba.

7.10.3. Cambios en acidez titulable

En la Figura 7.59 se muestra el comportamiento de la acidez titulable durante el almacenamiento refrigerado para las diferentes muestras tratadas con NLS y contrastadas con el empleo de goma xantana y aquellas que no fueron recubiertas (control).

Las muestras control disminuyeron su % de acidez desde 0.9 hasta 0.5 durante los primeros 19 días de almacenamiento. Este comportamiento se debe al proceso de maduración que induce una degradación de los ácidos orgánicos siendo estos los más importantes de la actividad respiratoria del fruto (Saucedo-Pompa *et al.*, 2007).

La guayaba tratada con gomas de xantana y 75 y 80 % de NLS también disminuyeron su contenido de acidez de manera muy similar que otros tratamientos; no obstante alrededor de los 22 días de almacenamiento, dicho contenido se incrementó drásticamente. Este comportamiento se asocia a los desórdenes provocados por efecto del recubrimiento utilizado y la probable formación de una película que limitó el intercambio de gases. Las muestras con goma xantana y 60 y 65 % de NLS mostraron una reducción de la acidez hasta los 29 días de almacenamiento con 0.53 % de acidez en promedio. Las muestras

tratadas con 60 y 65 % mostraron un ligero incremento (de 0.55 a 0.70 % de acidez) a partir de los 22 días y hasta los 30 días. Resultados de disminución de acidez para guayaba durante el almacenamiento han sido reportados por Castellano *et al.* (2005); Mercado-Silva *et al.* (1998) y Jain *et al.* (2003) han reportado que la acidez de guayaba disminuye desde 1.2 a 0.58 dependiendo de la variedad, época del año y estado de madurez inicial. Los resultados reportados para los recubrimientos con 60 y 65 % de NLS tienen una buena funcionalidad y potencial tecnológico para ser utilizados en la conservación de guayaba.

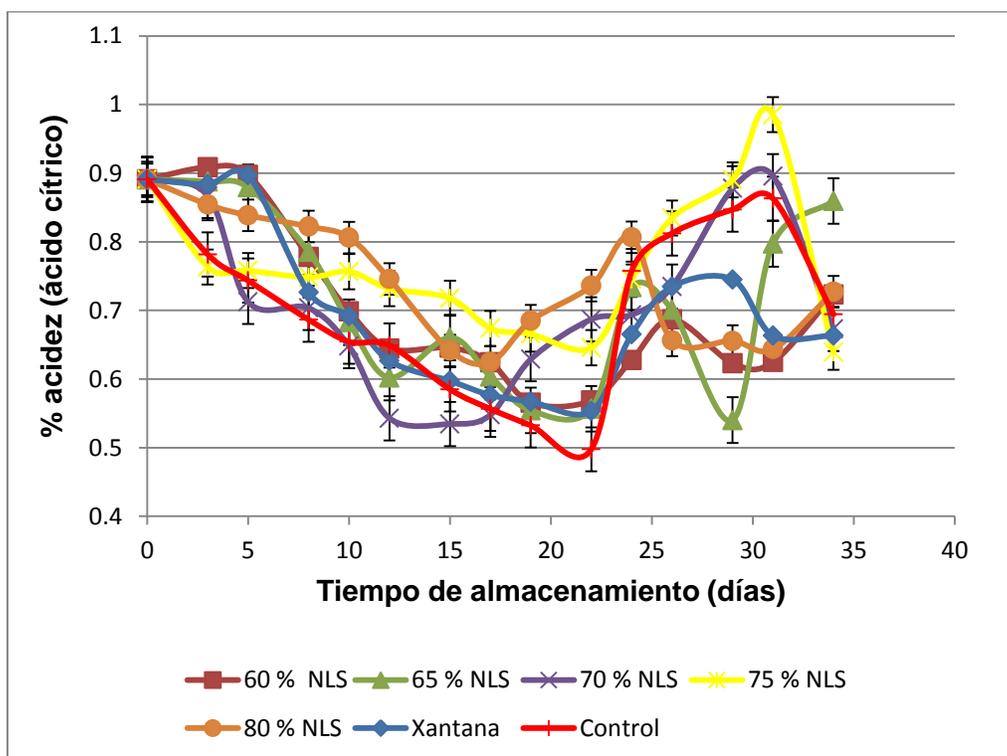


Figura 7.59 Variación en la acidez titulable durante el almacenamiento refrigerado a 8°C para los diferentes recubrimientos.

Como se ha mencionado es importante asociar la funcionalidad del recubrimiento en conjunto con la refrigeración y con el comportamiento del producto a temperatura ambiente.

En la Figura 7.60 se muestran las variaciones en la acidez titulable en muestras refrigeradas más 5 días de transferencia a temperatura ambiente.

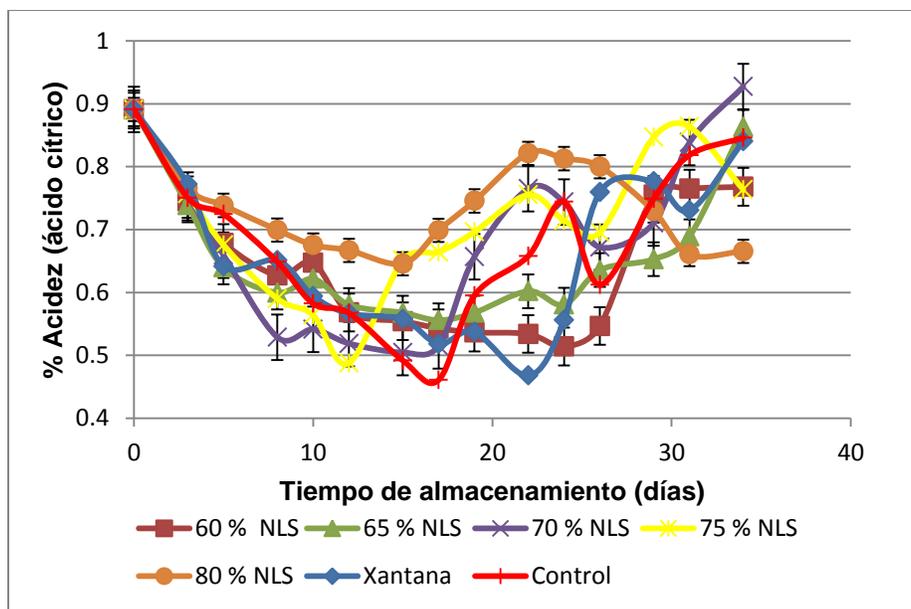


Figura 7.60 Cambios de acidez titulable en guayaba refrigerada más 5 días a temperatura ambiente.

Las muestras con goma xantana y con 60 % y 65 % de NLS no muestran diferencia significativa en su comportamiento respecto a los cambios en acidez hasta los 19 días de almacenamiento, tiempo en que se marcan claras diferencias, ya que las muestras con goma xantana incrementan considerablemente su acidez de 0.5 % a 0.75 % a los 26 días de almacenamiento. Este resultado confirma que estas concentraciones de NLS son las óptimas para la conservación de guayaba.

Como era de esperarse y de acuerdo a los resultados ya analizados para las muestras refrigeradas, las guayabas con 75 y 80 % de NLS y trasferidas por 5 días a temperatura ambiente desarrollaron cambios en acidez con disminución hasta los 9 días de almacenamiento y aumento de la misma a partir de este momento lo que se asocia con procesos de respiración anaeróbicos que provocaron daños fisiológicos en el fruto.

7.10.4. Cambios en firmeza de los frutos

En la Figura 7.61 se presentan los cambios en fuerza de compresión en función del tiempo de almacenamiento y al tipo de recubrimiento utilizado. El propósito es asociarlos con las modificaciones que presentó el pericarpio del fruto.

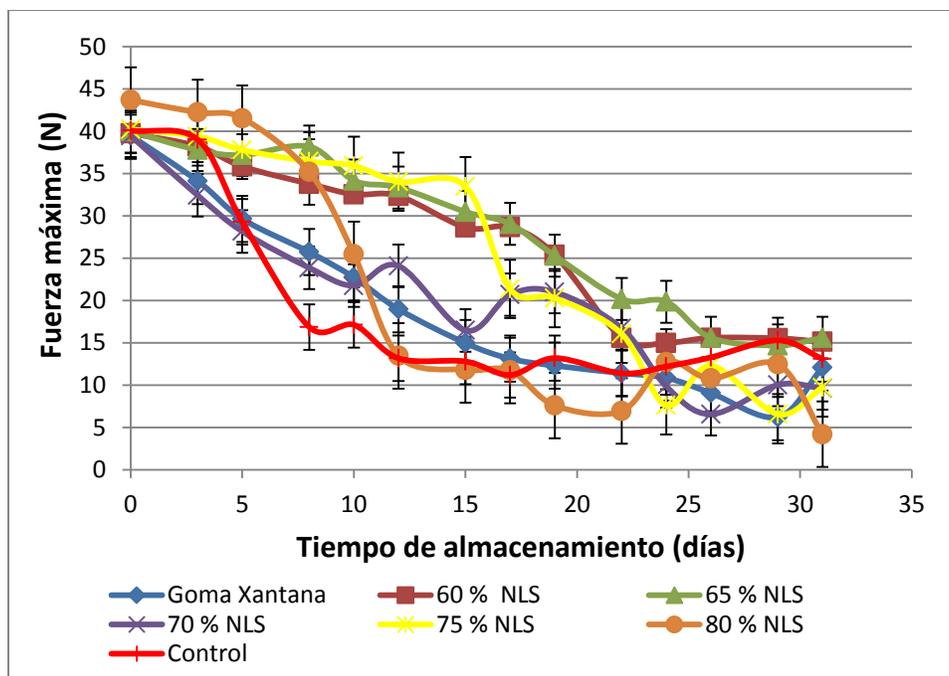


Figura 7.61 Cambios de textura en guayaba refrigerada a diferentes concentraciones de NLS, 0.3% de goma xantana y 0.5 % de propilenglicol.

Las muestras con 60 y 65 % de NLS son las que mantuvieron por mayor tiempo la textura durante el período de almacenamiento refrigerado con una resistencia a la compresión de 15.6 N a los 30 días, no perdiendo más del 24 % de la firmeza durante los primeros 22 días. En este sentido, Pal et al. (2004) reportaron una disminución de la firmeza durante el almacenamiento refrigerado de guayabas recubiertas con cera comercial o polietileno, concluyendo que existe menor pérdida de firmeza en las muestras recubiertas que con el control el cual mostró una considerable pérdida de textura a los 7 días de almacenamiento. Nuestros controles tuvieron un comportamiento similar en relación a la resistencia a la compresión que paso de 40.8 a 16.7 N en 8 días, es decir una pérdida del 59 %, respecto a la firmeza inicial. La pérdida de firmeza en los productos hortofrutícolas es directamente proporcional al grado de madurez del producto (Toivonen *et al.*, 2008). Esto es debido a la actividad de enzimas hidrolizantes como la poligalacturonasa y pectinmetilesterasa que promueven la solubilización de las pectinas constituyentes de la pared celular (Azzolini y Jacomino, 2004). La pérdida de firmeza también es atribuible a la pérdida del agua de la pared celular (Jain *et al.*, 2003).

Es importante resaltar que las muestras con 70, 75 y 80 % mostraron un comportamiento variable y dependiente de la concentración de NLS, En general la resistencia a la compresión fue menor que los tratamientos de 60 a 70% de NSL esto puede ser explicado por la mayor pérdida de peso ya discutida anteriormente además de una actividad metabólica alterada que llevó a un mayor consumo de SST y probablemente a un mayor agotamiento de los tejidos.

Las muestras recubiertas con goma xantana, a pesar de presentar un buen aspecto hasta los 19 días de almacenamiento, el carácter hidrofílico de este material propició una mayor pérdida de peso lo cual también explica la menor resistencia a la compresión el cual fue similar al mostrado por los frutos tratados con 70 y 80% de NLS pero fueron diferentes de las muestras recubiertas con 60 y 65 % de NLS.

Estos datos muestran nuevamente que los recubrimientos de goma de xantana con 60 o 65 % de NLS tienen un uso potencial para la conservación de los frutos de guayaba.

En la Figura 7.62 se muestran los cambios de textura de las muestras transferidas a temperatura ambiente durante 5 días después de concluido el periodo de almacenamiento refrigerado correspondiente.

Todos los tratamientos mostraron una disminución de la resistencia a la compresión sin poder indicar diferencias claras entre los diferentes tratamientos, No obstante, el tratamiento con 65% de NLS mantuvo una mejor resistencia hasta los 17 días de almacenamiento. Lo anterior indica que son necesarios más estudios para mejorar la resistencia del fruto a través de estos tratamientos.

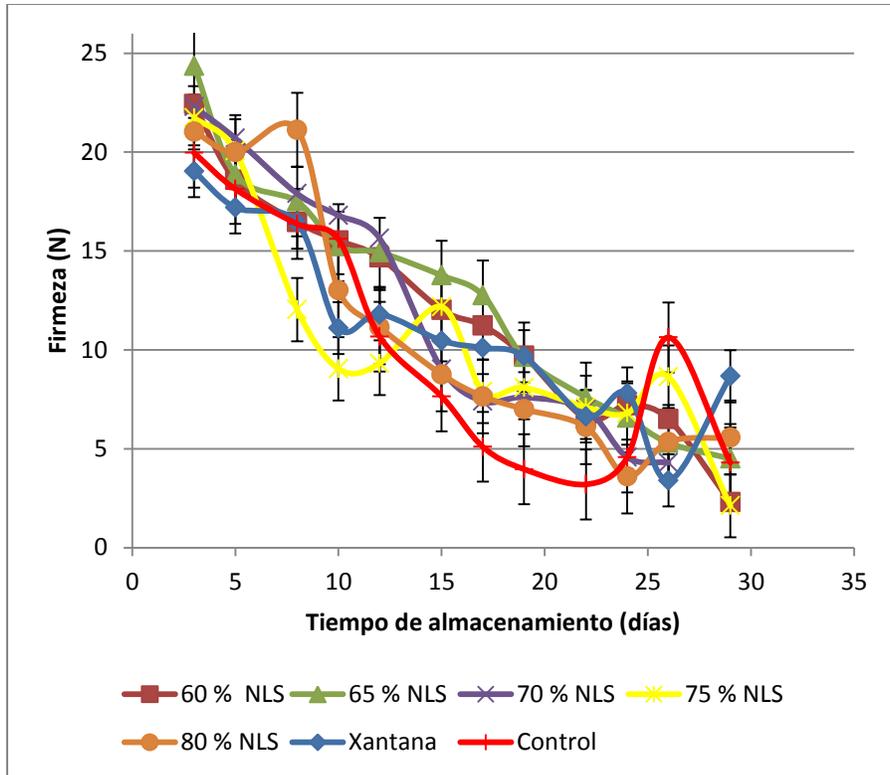


Figura 7.62. Cambios de firmeza de guayabas refrigeradas + 5 días a temperatura ambiente.

VIII CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos de la presente investigación, se pueden anotar las siguientes conclusiones:

Se estableció que el método de emulsificación-difusión es una excelente opción para preparar nanocápsulas utilizando ingredientes alimenticios con amplias posibilidades de aplicación en tecnología de alimentos, debido a su estructura capsular que fue confirmada por tamaño de partícula, densidad y microscopía electrónica de barrido.

Los sistemas nanoparticulados desarrollados (nanocápsulas y nanopartículas lipídicas sólidas) permitieron elaborar un recubrimiento estable al almacenamiento, demostrando efectividad en la conservación de manzana fresca cortada y guayaba.

La aplicación de nanopartículas de ≈ 250 nm y $\zeta \approx -40$ mV a rebanadas de manzana retrasó los cambios de color, la producción de fenoles, y controló la actividad enzimática asociada al proceso de oscurecimiento, abriendo una posibilidad para incrementar la vida útil de frutos.

La aplicación de nanocápsulas y nanoesferas permitió controlar de manera notable la exudación del tejido de manzana, constituyendo esto una notable mejora en el proceso de elaboración de manzana fresca cortada, abriendo la exploración a otro tipo de frutos y mostrando nuevamente las posibilidades de aplicación de nanopartículas en la conservación de frutas.

El desarrollo de recubrimientos con nanopartículas lipídicas sólidas al 60 %, 0.4 % de goma xantana y 0.5 % de propilén glicol, permitieron controlar la pérdida de peso, retrasar el proceso de maduración del fruto y mantener por mayor tiempo la firmeza de los frutos, lo que parece indicar un procedimiento con amplias posibilidades de alargar la vida útil de frutos de guayaba.

Con estos hallazgos fue posible corroborar la hipótesis planteada, estableciendo que los sistemas de talla submicrónica tienen amplias posibilidades de aplicación en el área de conservación de frutas frescas enteras y cortadas, así como su aplicación a diversas áreas del procesamiento y conservación de alimentos.

IX REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott J. and Buta G. 2002. Effect of antibrowning treatment on color and firmness of fresh-cut pears. *Journal of Food Quality*. 25(4); 333-341.
- Abdelwahed, W., Degobert, G., and Fessi, H. 2006. A pilot study of freeze drying of poly(epsilon-caprolactone) nanocapsules stabilized by poly(vinyl)alcohol: formulation and process optimization. *International Journal of Pharmaceutics*. 309(1-2); 178-188.
- Ahn, J. H., Kim, Y. P., Lee, Y. M., Seo, E. M., Lee, K. W., & Kim, H. S. 2008. Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*. 107(1); 98-105.
- Amiot M., Tacchini M., Aubert S. and Oleszek W. 1995. Influence of cultivar, maturity stage, and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(5); 1132-1137.
- Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S. and Nicolas J. 1992. Phenolic composition and browning susceptibility of various apple cultivars at maturity. *Journal Food Science*. 57(3); 958-962.
- AOAC. 2002. *Official Methods of Analysis*. 15th edition. Washington D.C.
- Artés F., Castañer M., Gil M., 1998. Enzymatic browning in minimally processed fruit and vegetables. *Food Science and Technology International*. 4(6);377-389.
- Artés, F., Escalona, V. H., and Artés-Hdez, F. 2002. Modified atmosphere packaging of fennel. *Journal of Food Science*. 67(4); 1550-1554
- Awad, T.S.; Helgason, T.; Kristbergsson, K.; Decker, E.A.; Weiss, J. and McClements, D.J. 2008. Effect of Cooling and Heating Rates on Polymorphic Transformations and Gelation of Tripalmitin Solid Lipid Nanoparticle (SLN) Suspensions. *Food Biophysics*, 3(2); 155–162.

- Azeredo, H.M.C. 2009. Nanocomposites for food packaging applications. *Food Research International*.42(9); 1240-1253.
- Azzolini, M.; Jacomino A.P. and Urbano, B.I. 2005. Ripening of "Pedro Sato" guava: study on its climateric or non –climateric nature. *Journal Plant Physiology.*, Brasil. 17(3); 299-306.
- Azzolini, M.; Jacomino, A.P. and Urbano, B.I. 2004. Indices to evaluate postharvest quality of guavas under different maturation stages. *Escuela Superior de Agricultura „Luiz de Queiroz“*. *Pesq. Agropec*, Brasil, Brasília. 39(2); 139-145.
- Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Sitterberg, J., Bakowsky, U. and RaviKumar, M. N. V. 2005. Design of biodegradable nanoparticles: a novel approach to encapsulating poorly soluble phytochemical ellagic acid. *Nanotechnology*. 16(12); 2819-2822.
- Baldwin E., Nisperos-Carriedo M., Shaw P. and Burns J., 1995. Effect of coatings and prolonged storage conditions on fresh orange flavor volatiles, degrees Brix, and ascorbic acid levels, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(5); 1321-1331.
- Baldwin, E. A., Burns, J. K., Kazokas, W., Brecht, J. K., Hagenmaier, R. D., Bender, R. J. and Pesis, E. 1999. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 17(3); 215-226.
- Ball J. 1999. Development and Effectiveness of Three Hydrocolloid-Lipid Emulsion Coatings on Preservation of Quality Characteristics in Green Bell Peppers. PhD Thesis. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. EU. P 67
- Balla, C. and Farkas, J. 2006. Minimally processed fruits and fruit products and their microbiological safety. En:Hui,H. (Ed.).*Handbook of fruit and fruit processing*.Blackwell Publishing.Oxford, Reino Unido: 115-125.

- Banks, N. H., Dadzie, B. K. and Cleland, D. J. 1993. Reducing gas exchange of fruits with surface coatings. *Postharvest Biology and Technology*. 3(3); 269-284.
- Barret, D., Somogyi P. and Ramaswamy H. 2005. *Processing fruits: science and technology*, 2^a Edición, CRC Press, USA.
- Bas, D., and Boyaci, I. H. 2007. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering*. 78(4); 836-845.
- Bashir, H. A., and Abu-Goukh, A. -. A. 2003. Compositional changes during guava fruit ripening. *Food Chemistry*, 80(4); 557-563.
- Bergeson, L., L. 2011 FDA's Regulation of nanotechnology: Will the new draft guidance help industry?. *Nanotechnology Law & Business*. 8,166-175
- Bilbao-Sáinz, C., Avena-Bustillos, R. J., Wood, D. F., Williams, T. G. and McHugh, T. H. 2010. Nanoemulsions prepared by a low-energy emulsification method applied to edible films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(22); 11932-11938.
- Bosquez-Molina, E., Guerrero-Legarreta, I., & Vernon-Carter, E. J. (2003). Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum-candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Research International*, 36(9-10), 885-893.
- Bowmester, H., and Marvin, H. J. P. 2010. Potential Risks of nanofood to consumers. In: *Nanotechnologies in food*, Ed. By Chaudhy, Q., Castle, L., & Watkins, Royal Society of chemistry, Cambridge, U. K. 134-149.
- Brayner, R. 2008. The toxicological impact of nanoparticles. *Nanotoday*, 3, (1-3); 48-55
- Bhushan, B., & Li, X. (2003). Nanomechanical characterisation of solid surfaces and thin films. *International Materials Reviews*, 48(3), 125-164.

- Camacho O. E. A. (2010). "Evaluación del uso de nanopartículas lipídicas solidas como modificadores de las propiedades de recubrimientos farmacéuticos". Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. Cuautitlán Izcalli. Edo. De Mex. P.p. 50-52.
- Castellano, G., Quijada, O., Ramírez, R. and Sayago E. 2005 Comportamiento poscosecha de frutas de guayaba (*Psidium guajava* L.) tratados con cloruro de calcio y agua caliente a dos temperaturas de almacenamiento. Revist Iberoamericana de Tecnología Postcosecha. 6(2); 78-82.
- Cavalli, R., Peira, E., Caputo, O. and Gasco, M. .R. 1999. Solid lipid nanoparticles as carriers of hydrocortisone and progesterone complexes with β -cyclodextrins. Intnational Journal Pharmaceutics. 182(1);59–69.
- Chau, C. F., Wu, S. H and Yen, G. C. 2007. The development of regulations for food nanotechnology. Trends Food Science Technology 18(5); 269-280.
- Chaydhry, Q. Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L., Aitken, R. and Watkins, R., 2008. Applications and implications of nanotechnologies for food sector. Food Additive and Contaminants. 25 (3); 241-258.
- Chen, C. and Lai, L. 2008. Mechanical and water vapor barrier properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsau leaf gum films in the presence of plasticizer. Food Hydrocolloids, 22(8), 1584-1595.
- Chen, S., and Nussinovitch, A. 2000. The role of xanthan gum in traditional coatings of easy peelers. Food Hydrocolloids. 14(4); 319-326.
- Chen., Z., Meng, H., Xing, G., Chen, C., Jia, G., Wang, T., Yuan H., and Ye, C. 2006b. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. Toxicol. Lett 163(2); 109-120.
- Chen, H., Weiss, J. and Shahidi, F. 2006a. Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods". Food Technolnology. 60(3);30–36.

- Choi, Y. -, Tomás-Barberán, F. A., and Saltveit, M. E. 2005. Wound-induced phenolic accumulation and browning in lettuce (*Lactuca sativa* L.) leaf tissue is reduced by exposure to n-alcohols. *Postharvest Biology and Technology*. 37(1); 47-55.
- Conforti, F. D. and Totty, J. A. 2007. Effect of three lipid/hydrocolloid coatings on shelf life stability of golden delicious apples. *International Journal of Food Science and Technology*, 42(9); 1101-1106.
- Cortez-Vega, W. R., Becerra-Prado, A. M., Soares, J. M., & Fonseca, G. G. (2008). Effect of L-ascorbic acid and sodium metabisulfite in the inhibition of the enzymatic browning of minimally processed apple. *International Journal of Agricultural Research*, 3(3), 196-201.
- Cushen, M., Kerry, J., Morris, M., Cruz-Romero, M., and Cummins E. 2012. Nanotechnologies in the food industry-Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology*. 24(1); 30-46.
- Eitenmiller, R. and Lee, J. 2004. Vitamin E: food chemistry, composition and analysis. Marcel Dekker Inc. Nueva York, Estados Unidos: 89-135.
- F.A.O.2011. *Food and Agriculture Organization*. www.faostat.fao.org. Visitada 18 enero 2011.
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/WorldHealth Organization]. 2009. *FAO/WHO expert meeting on the applications of nanotechnologies in the food and agriculture sectors: potential food safety implications*. FAO y WHO. Roma, Italia. 19-40.
- Foladori, G., & Invernizzi, N. 2005. Nanotechnology for the poor? [4]. *PLoS Medicine*, 2(8), 0810-0811.
- Floury, J., Desrumaux, A., and Lardières, J. 2000. Effect of high-pressure homogenization on droplet size distributions and rheological properties of

- model oil-in-water emulsions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 1(2); 127-134.
- García, E. and Barrett, D.M. 2002. Preservative treatments for fresh-cut fruits and vegetables: science, technology and market. En: Lamikanra, O. (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables science, technology and market*. CRC Press, Florida, Estados Unidos: 275-285.
- García-Ochoa, M.A., Martino, M.N. and Zaritzky, N.E. 2000. Lipid addition to improve barrier properties of edible starch-based films and coatings. *Journal Food Science*. 65(4); 941–947.
- González-Aguilar, G.A., Ayala-Zavala, F., de la Rosa, L.A. and Alvarez-Parrilla, E. 2010. Phytochemical changes in the postharvest and minimal processing of fresh fruit and vegetables. En: de la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E. y González-Aguilar G.A. (Eds.). *Fruit and vegetables phytochemicals: chemistry, nutritional value, and stability*. Blackwell Publishing. Iowa, Estados Unidos . 321.
- Gross J. 1987 *Pigments in fruit*. London, U.K.: Academic Press., 303p
- Grotte, M., Duprat, F., Piétri, E., and Loonis, D. 2002. Young's modulus, poisson's ratio, and lame's coefficients of golden delicious apple. *International Journal of Food Properties*, 5(2); 333-349.
- Hernández, M. C. 2004. Formación de nanoemulsiones o/w mediante el cambio en la composición-formulación por dilución con agua de sistemas próximos a la formulación óptima. Tesis de licenciatura. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería.
- Hidalgo-Álvarez, R., Martín, A., Fernández, A., Bastos, D., Martínez, F., and De Las Nieves, F. J. 1996. Electrokinetic properties, colloidal stability and aggregation kinetics of polymer colloids. *Advances in Colloid and Interface Science*. 67, 1-118.

- Hisaminato, H., Murata, M., & Homma, S. 2001. Relationship between the enzymatic browning and phenylalanine ammonia-lyase activity of cut lettuce, and the prevention of browning by inhibitors of polyphenol biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 65(5), 1016-1021.
- Hu, T., Gao, J., Wu, C., Auweter, H., and Iden, R. 2002 Temperature induced hydrophobic adsorption and desorption of linear polymer chains on surfactant free latex nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry B*. 106(6); 9815-9819.
- Islam, N., & Miyazaki, K. 2009. Nanotechnology innovation system: Understanding hidden dynamics of nanoscience fusion trajectories. *Technological Forecasting and Social Change*, 76(1), 128-140.
- Jain, N.; Dhawan, K.; Malhotra, S.; and Singh, R. 2003. Biochemistry of fruit ripening of guava (*Psidium guava* L.): compositional and enzymatic changes. *Plant Foods for Human Nutrition*, 58, 309-315.
- Jensen, S.K., Engberg, R.M. and Hedemann, M.S. 1999. All-rac- α -tocopherol acetate is a better vitamin E source than all-rac- α -tocopherol succinate for broilers. *The Journal of Nutrition*. 129, p.p. 1355-1360.
- Ji-Hyun, J. and Kwang-Deog, M. 2011. Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activity on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*. 124, p.p. 444-449.
- Jiménez, C. P. E.; López P. M. R. 2009. Evaluación del potencial uso de las nanopartículas lipídicas solidas en recubrimientos de película acuoso. Tesis de Licenciatura. UNAM. FESC Cuautitlán: 15-20.
- Jiménez-Vieyra and Zambrano Zaragoza M. L., 2011. Cuantificación de cobre en polifenoloxidasas de frutas tropicales por espectrofotometría de absorción atómica. *Información Tecnológica*. 22(2); 15-22

- Jouquand, C., Aguni, Y., Malhiac, C., and Grisel, M. 2008. Influence of chemical composition of polysaccharides on aroma retention. *Food Hydrocolloids*, 22(6); 1097-1104.
- Karlsson, M. N. A., Deppert, K., Karlsson, L. S., Magnusson, M. H., Malm, J. -, and Srinivasan, N. S. 2005. Compaction of agglomerates of aerosol nanoparticles: A compilation of experimental data. *Journal of Nanoparticle Research*. 7(1); 43-49.
- Kelsall, W. R., Hamley W. I. and Gheoghegan M. 2005. *Nanoscale science and technology*. John Wiley & Son Ltd UK. 472p
- Kumari, A., Yadav, S. K., & Yadav, S. C. 2010. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1-18.
- Lee, J. Y., Park, H. J., Lee, C. Y., and Choi, W. Y. 2003. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT - Food Science and Technology*. 36(3); 323-329.
- Lee, J., Ye, L., Landen Jr., W. O., & Eitenmiller, R. R. 2000. Optimization of an extraction procedure for the quantification of vitamin E in tomato and broccoli using response surface methodology. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13(1), 45-57.
- Leroux, J. C., Allemann, E., Doelker, E. and Gurny, R. 1995a New approach for the preparation of nanoparticles by an emulsification-diffusion method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 41(1); 14-18.
- Leroux, J. C., Cozens, R., Roesel, J. L., Galli, B., Kubel, F., Doelker, E., and Gurny R. 1995b. Pharmacokinetics of a novel HIV-1 protease inhibitor incorporated into biodegradable or enteric nanoparticles following intravenous and oral administration to mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 84(12); 1387-1391.

- Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Jongaroonngamsang, N., Rojsitthisak, P., & Nimmannit, U. 2008. Preparation of alginate nanocapsules containing turmeric oil. *Carbohydrate Polymers*, 74(2), 209-214.
- Lertsutthiwong, P., and Rojsitthisak, P. 2011. Chitosan-alginate nanocapsules for encapsulation of turmeric oil. *Pharmazie*. 66(12); 911-915.
- Li, H., & Yu, T. 2001. Effect of chitosan on incidence of brown rot, quality and physiological attributes of postharvest peach fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81(2); 269-274.
- McClements, D. J., Decker, E. A., Park, Y., and Weiss, J. 2009. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 49(6); 577-606.
- McHugh, T. H., and Senesi, E. 2000. Apple wraps: A novel method to improve the quality and extend the shelf life of fresh-cut apples. *Journal of Food Science*. 65(3); 480-490.
- Mehnert, W. and Mäder, K. 2001. Solid lipid nanoparticles production, characterisation and applications. *Advances. Drug Delivery. Review*. 47(2-3);165–196.
- Mei, Y., and Zhao, Y. 2003. Barrier and mechanical properties of milk protein-based edible films containing nutraceuticals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(7); 1914-1918.
- Mercado-Silva E. and López-Enríquez, E. 2003. Cambios fisiológicos y de calidad en guayaba mínimamente procesada, Facultad de Química, Depto. de Investigación y Posgrado en Alimentos, Querétaro. México.
- Mercado-Silva y Aquino-Bolaños. 2005. Enzimas involucradas en el deterioro. En G. A. González-Aguilar, A. Gardea, F. Cuamea-Navarro (Eds). *Nuevas*

Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados.
Logiprint Digital S. de R.L. de C.V. Guadalajara Jal. México. 177- 216

- Mercado-Silva, E., Benito-Bautista, P., and De los Angeles García-Velasco, M. (1998). Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. *Postharvest Biology and Technology*. 13(2); 143-150.
- Mirhosseini, H., Tan, Ch. P., Hamid, N. S. A., and Yusof, S. 2008. Effect of arabic gum, xanthan gum and orange oil contents on ζ -potential, conductivity, stability, size index and pH of orange beverage emulsion. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 315(1-3); 47-56.
- Moinard-Chécot, D., Chevalier, Y., Briançon, S., Beney, L., & Fessi, H. 2008. Mechanism of nanocapsules formation by the emulsion-diffusion process. *Journal of Colloid and Interface Science*. 317(2); 458-468.
- Montgomery, D. C. (2001). *Design and analysis of experiments* (5th ed.). New York: Wiley.
- Mora-Huertas, C. E., Fessi, H., and Elaissari, A. 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 385(1-2); 113-142.
- Mune Mune, M. A., Minka, S. R., and Mbome, I. L. 2008. Response surface methodology for optimisation of protein concentrate preparation from cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Food Chemistry*. 110(3); 735-741.
- Murata, M., Kurokami, Ch. and Homma, S. 1992. Purification and some Properties of Chlorogenic Acid Oxidase from Apple (*Malus pumila*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 56(11); 1705-1710.
- Myers, R. H., and Montgomery, D. C. 2002. *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments* (2nd ed.). New York, NY: Wiley.

- Nagarajan, R., Bradley, R. A., & Nair, B. R. 2009. Thermodynamically stable, size selective solubilization of carbon nanotubes in aqueous solutions of amphiphilic block copolymers. *Journal of Chemical Physics*, 131(10).
- Namal Senanayake, S. P. J., & Shahidi, F. (2002). Lipase-catalyzed incorporation of docosahexaenoic acid (DHA) into borage oil: Optimization using response surface methodology. *Food Chemistry*, 77(1), 115-123.
- Nastruzzi, C. 2005. *Lipospheres in Drug Targets and Delivery: Approaches, Methods and Applications*. CR Press. USA. 1-22, 41-46.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L., & Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 311(4); 622-627.
- Noriega-Peláez, E. K., Mendoza-Muñoz, N., Ganem-Quintanar, A., and Quintanar-Guerrero, D. 2011. Optimization of the emulsification and solvent displacement method for the preparation of solid lipid nanoparticles. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 37(2); 160-166.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*. 113(7); 823-839.
- Olivas G. and Barbosa-Cánovas G. 2005, Edible coating for fresh-cut fruits, *Food Science and Nutriology*. 45(7-8); 657-670.
- Olivas, G. I., Mattinson, D. S., and Barbosa-Cánovas, G. V. 2007. Alginate coatings for preservation of minimally processed 'gala' apples. *Postharvest Biology and Technology*. 45(1); 89-96.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R., and Martín-Belloso, O. 2008. Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon. *LWT - Food Science and Technology*. 41(10); 1862-1870.

- Ortiz-Hernández, G. R., Espinoza-Hernández, J., Saucedo-Veloz and Mercado-Silva E., 2010. Effect of 1-MCP on shelf-life and volatile production of Mexican guava fruits (cv."Media China"). *Acta Horticulture*. 487; 387-392.
- Pal, R. K., Ahmad, M. S., Roy, S. K. and Singh M. 2004. Influence of Storage Environment, Surface Coating, and Individual Shrink Wrapping on Quality Assurance of Guava (*Psidium guajava*) Fruits *Plant Foods for Human Nutrition*. 59(2); 67–72.
- Park, H. J. 1999. Development of advanced edible coatings for fruits. *Trends in Food Science and Technology*. 10(8); 254-260.
- Park, S. -, Zhao, Y., Leonard, S. W., and Traber, M. G. 2005. Vitamin E and mineral fortification in fresh-cut apples (Fuji) using vacuum impregnation. *Nutrition and Food Science*. 35(6); 393-402.
- Pavlath, A.E. and Orts, W. 2009. Edible films and coatings: why, what, and how? En: Embuscado, M.E. y Huber, K.C. (Eds.). *Edible films and coatings for food applications*. Springer. Nueva York, Estados Unidos.: 1-23.
- Pereyra, L., Roura, A.I. and del Valle, C.E. 2005. Phenylalanine ammonia lyase activity in minimally processed Romaine lettuce. *LWT Food Science and Technology*. 38(1); p.p. 67-72.
- Perez-Cabrera, L. E. 2003. Aplicación de métodos combinados para el control del desarrollo del pardeamiento enzimático en pera (variedad Blanquilla) mínimamente procesada. Valencia, España: Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia.
- Perez-Gago, M. B., Serra, M., and Río, M. A. D. 2006. Color change of fresh-cut apples coated with whey protein concentrate-based edible coatings. *Postharvest Biology and Technology*. 39(1); 84-92.
- Puschmann, R., Simoes, A., Moreira, S. I., Soares, N., Carnelossi, M., and Gil, M. I. 2007. Calidad y actividad de la fenilalanin amonio liasa (PAL) en

minizana horia con recubrimiento comestible antimicrobiano. V Congreso iberoamericano de tecnología postcosecha y agroexportaciones: 616-624). Brasil.

Quintanar-Guerrero D., Fessi, H., Allémann, E. and Doelker, E. 1996. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly (D, L-lactic acid) nanoparticles by emulsification-diffusion technique. *International Journal Pharmaceutics*. 143(2);133-141.

Quintanar-Guerrero D.; E. Allémann, H. Fessi and E. Doelker. 1997a Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 24(12); 1113-1117.

Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Doelker, E., and Fessi, H. 1998a. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. *Pharmaceutical Research*. 15(7); 1056-1062.

Quintanar-Guerrero, D., Allémann, E., Fessi, H. and Doelker, E. 1998b. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 24(12); 1113-1128.

Quintanar-Guerrero, D.; Allémann, E.; Fessi, H., and Doelker, E. 1997b. French Patent Appl. 97 09 672.

Quintanilla-Carvajal, M. X., Camacho-Díaz, B. H., Meraz-Toorres, I. S., Chanona-Pérez, J., Alamilla-Beltrán, L., Jiménez-Aparicio, A., Gutiérrez-López, G. F. 2010. Nanoencapsulation: A new trend in food engineering processing. *Food Engineering Review*. 2(1); 39-50.

Radomska-Soukharev, A. 2007. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 59(6); 411-418.

- Ramirez, E.C., Whitaker, J.R. and Virador, V.M. 2003. Polyphenol oxidase. En: Whitaker, J.R., Voragen A.G.J., y Wong, D.W.S. (Eds.). Handbook of food enzymology. Marcel-Dakker Inc. Nueva York, Estados Unidos. 505-519.
- Rao, C. N. R., Govindaraj, A., Gundiah, G., & Vivekchand, S. R. C. 2004. Nanotubes and nanowires. *Chemical Engineering Science*, 59(22-23), 4665-4671.
- Relkin, P., Yung, J. -, Kalnin, D., and Ollivon, M. 2008. Structural behaviour of lipid droplets in protein-stabilized nano-emulsions and stability of α -tocopherol. *Food Biophysics*. 3(2); 163-168.
- Robb, D.A. 1995. Exploiting activity in aqueous and nonaqueous media. En: Lee, Ch.Y., y Whitaker, J.R. (Eds.). Enzymatic browning and its prevention. ACS Symposium Series 600. American Chemical Society. Washington, Estados Unidos: 159-164.
- Rojas-Graü, M.A., Garner, E. and Martín-Belloso, O. 2011. The fresh-cut fruits and vegetables industry: current situation and market trends. En: Martín-Belloso, O., y Soliva-Fortuny, R. (Eds.). Advances in fresh-cut fruits and vegetables processing. CRC Press. Boca Raton, Florida, p.p. 1-10.
- Rojas-Graü, M. A., Sobrino-López, A., Tapia, M. S., and Martín-Belloso, O. 2006. Browning inhibition in fresh-cut 'fuji' apple slices by natural antibrowning agents. *Journal of Food Science*. 71(1); S59-S65.
- Rojas-Graü, M. A., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. 2010. Edible coatings: Past, present and future. *Stewart Postharvest Review*. 6(3); 1-5.
- Rojas-Graü, M. A., Tapia, M. S., and Martín-Belloso, O. 2008. Using polysaccharide-based edible coatings to maintain quality of fresh-cut fuji apples. *LWT - Food Science and Technology*. 41(1); 139-147.

- Rojas-Graü, M., Tapia M., Rodríguez F., Carmona A., and Martín-Belloso O., 2007, Alginate and gellan based edible coatings as support of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apple, *Food Hydrocolloids*. 21(1); 118-127.
- Rojas-Graü, M.A., Soliva-Fortuny, R. y Martín-Belloso, O. 2009. Edible coatings to incorporate active ingredients to fresh-cut fruits: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 20(10); 438-447.
- Roura, S. I., Pereyra, L., and del Valle, C. E. (2008). Phenylalanine ammonia lyase activity in fresh cut lettuce subjected to the combined action of heat mild shocks and chemical additives. *LWT - Food Science and Technology*. 41(5); 919-924.
- SAGARPA (2005), Anuarios SIAP, 2000-2006. México D. F.
- SAGARPA, <http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Paginas/Boletin1-Frutas.aspx#>, 2012
- Sapers, G.M., Hicks, K.B., Phillips, J.G., Garzarella, L., Pondish, D.L., Matulaitis, R.M., McCormack, T.J., Sondey, S.M., Seib, P.A. and El-Atawy, Y.S. 1989. Control of enzymatic browning in apple with ascorbic acid derivatives, polyphenol oxidase inhibitors and complexing agents. *Journal of Food Science*. 54;. 997-1002.
- Saucedo-Pompa, S., Rojas-Molina, R., Aguilera-Carbó, A. F., Saenz-Galindo, A., Garza, H. d. L., Jasso-Cantú, D., & Aguilar, C. N. (2009). Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International*, 42(4), 511-515.
- Schramm, L. L. 2005. *Emulsions, foams and suspensions fundamentals and applications*. Wiley-VCH Alemania, 448-453.
- Schwartz, J. 1992. Questions in particle theory. *Nature* 359:112

- Siekmann, B., Westesen, K., 1996. Investigations on solid lipid nanoparticles prepared by precipitation in o/w emulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 42: 104-109.
- Singh, A., Nath, A., Buragohain, J., & Deka, B. C. (2008). Quality and shelf-life of strawberry fruits in different packages during storage. *Journal of Food Science and Technology*, 45(5), 439-442.
- Singh S. P.; and Pal R. K. 2008. Response of climacteric-type guava (*Psidium guajava* L.) postharvest treatment with 1MCP. *Postharvest Biology and Technology*. 47(3); 301-314.
- Singleton, V., Orthofer, R. and Lamuera-Raventós, R. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*. 299; 152-178.
- Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., and Trehan, A. 2004. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: An overview. *International Journal of Pharmaceutics*. 278(1); 1-23.
- Sjöström, B., and Bergenstahl, B. 1992. Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I. Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate. *International Journal of Pharmaceutics* 88(1-3); 53-62.
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N. and García-Celma, M.J. 2005. Nano-emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 10(3-4); 102-110.
- Soliva-Fortuny R., Grigelmo-Miguel N., Odriozola-Serrano I., Gorinstein O., and Martín-Belloso O., 2001. Browning evaluation of ready-to-eat apples as affected by modified atmosphere packaging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49(8); 3685-3690.

- Soliva-Fortuny R., Lluch M., Quiles A., Grigelmo-Miguel N., and Martín-Belloso O. 2003. Evaluation of textural properties and microstructure during storage of minimally processed apples, *Journal of Food Science*; 68(1); 312-317.
- Soliva-Fortuny R., Oms-Oliu G., and Martín-Belloso O., 2002. Effects of ripeness stages on the storage atmosphere, color, and textural properties of minimally processed apple slices, *Journal of Food Science*. 67(5); 1958-1963.
- Soliva-Fortuny, R. C., Ricart-Coll, M., and Martín-Belloso, O. 2005. Sensory quality and internal atmosphere of fresh-cut golden delicious apples. *International Journal of Food Science and Technology*. 40(4); 369-375.
- Son, S. M., Moon, K. D., and Lee, C. Y. 2001. Inhibitory effects of various antibrowning agents on apple slices. *Food Chemistry*. 73(1); 23-30.
- Stelzig, D.A., Akhtar, S. and Ribeiro, S. 1972. Catechol oxidase of Red Delicious Apple peel. *Phytochemistry*. 11(2); 535-539.
- Talens, P., and Krochta, J. M. 2005. Plasticizing effects of beeswax and carnauba wax on tensile and water vapor permeability properties of whey protein films. *Journal of Food Science*. 70(3), E239-E243.
- Tan, C. P., and Nakajima, M. 2005. β -Carotene nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Food Chemistry*. 92(4), 661-671.
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Carmona, A., Rodríguez, F. J., Soliva-Fortuny, R., & Martín-Belloso, O. (2008). Use of alginate- and gellan-based coatings for improving barrier, texture and nutritional properties of fresh-cut papaya. *Food Hydrocolloids*, 22(8), 1493-1503.
- Tapia, M. S., Rojas-Graü, M. A., Rodríguez, F. J., Ramírez, J., Carmona, A., and Martín-Belloso, O. 2007. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *Journal of Food Science*, 72(4), E190-E196.

- Tsao, R., Yang, R., Young, J. C., & Zhu, H. 2003. Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(21), 6347-6353.
- Tewa-Tagne, P., Briançon, S., and Fessi, H. 2007. Preparation of redispersible dry nanocapsules by means of spray-drying: Development and characterisation. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 30(2); 124-135.
- Thompson, A.K. 2003. Fruit and vegetables: harvesting, handling and storage. Segunda edición. Blackwell Publishing Ltd, Iowa, USA: 38-39.
- Thompson, A.K. 2010. Controlled atmosphere storage of fruits and vegetable. Segunda edición. CABI Publishing. Massachusetts, Estados Unidos. 91.
- Toivonen, P. and DeEll, J. 2002. Physiology of fresh-cut fruits and vegetables. En: Lamikanra, O. (Ed.). *Fresh-cut fruits and vegetables science, technology and market*. CRC Press, Florida, Estados Unidos: 101-111.
- Toivonen, P. M. A., and Brummell, D. A., 2008. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 48(1); 1–14.
- Tomás, S. A.; Bosquez, M. E.; Stolik, S., and Sanchez, F. 2005. Effects of mesquite gum candelilla wax based edible coatings on the quality of guava fruit (*Psidium guajava* L.). *Journal Physique IV*, 125, 889-892.
- Varela, P., Salvador, A., and Fiszman, S. 2007. Changes in apple tissue with storage time: Rheological, textural and microstructural analyses. *Journal of Food Engineering*. 78(2), 622-629.
- Veiga-Santos, P., Suzuki C. K., Cereda M. P. and Scamparini A. R. P. 2005. Microstructure and color of starch–gum films: Effect of gum deacetylation and additives. Part 2. *Food Hydrocolloids*. 19(6); 1064–1073.

- Wakayama, T. 1995. Polyphenol oxidase activity in Japanese apples. En: Lee, Ch.Y., y Whitaker, J.R. (Eds.). Enzymatic browning and its prevention. ACS Symposium Series 600. American Chemical Society. Washington, Estados Unidos. 251-266.
- Weiss, J., Decker, E. A., and McClements, J. 2008. Solid lipid nanoparticles as deliver systems for bioactive food components. *Food Biophysics*. 3(2); 146-154.
- Weiss, J., Takhistov, P., and McClements, D.J. 2006. Functional materials in food nanotechnology. *Journal of Food Science*. 71(9); R107-R116.
- Wissing, S. A., Kayser, O., and Müller, R. H. 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Review*. 56(9);1257-1272.
- Wojdylo, A., Oszmiański, J. and Laskowski, P. (2008). Polyphenolic compounds and antioxidants activity of new and old apple varieties. *Journal Agricultural Food Chemistry*. 56(15);. 6520-6530.
- Xu, G., and Zhang, N. 2009. Nanoparticles for gene delivery: A brief patent review. *Recent Patents on Drug Delivery and Formulation*. 3(2); 125-136.
- Yan, A., Von Dem Bussche, A., Kane, A. B., and Hurt, R. H. 2007. Tocopheryl polyethylene glycol succinate as a safe, antioxidant surfactant for processing carbon nanotubes and fullerenes. *Carbon*. 45(13); 2463-2470.
- Yin, Y., Cui, F., Mu, C., Choi, M., Kim, J. S., Chung, S., et al. 2009. Docetaxel microemulsion for enhanced oral bioavailability: Preparation and in vitro and in vivo evaluation. *Journal of Controlled Release*. 140(2); 86-94.
- Yuan, Y., Gao, Y., Mao, L., and Zhao, J. 2008. Optimisation of conditions for the preparation of β -carotene nanoemulsions using response surface methodology. *Food Chemistry*. 107(3); 1300-1306.
- Zambrano-Zaragoza M. L., Mercado-Silva, E., Gutiérrez-Cortez, E., Castaño-Tostado, E., and Quintanar-Guerrero, D., (2011). Optimization of

nanocapsules preparation by the emulsion-diffusion method for food applications. *LWT - Food Science and Technology* 44(6) 1362-1368.

Zambrano-Zaragoza, M. L., Mercado-Silva, E., Sánchez-Reyes, V., Álvarez-Cárdenas, A.2, Quintanar-Guerrero, D. 2010. Effect of α -tocopherol emulsion-coatings on browning index and firmness in fresh cut apples "Red Delicus" at refrigerate conditions. NA-7 894-898. ISBN: 978-607-00-3785-6.

Zarazúa-Escobar J., Martínez-Damián M., Colinas-León M., Barrientos-Proego A., and Aguilar-Melchor J., 2005. Frigoconservación y atmósferas modificadas en frutos de aguacate mínimamente procesado, *Revista Chapingo serie Horticultura*, 11;. 143-148.

Zhang, J., Fan, Y. And Smith J. 2009. Experimental design for the optimization of lipid nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 98(5) 1813-1819.

Zhang, Q., Kusuka, Y., Zhu, X., Sato, K., Mo, Y., and Kluz, T. 2003. Comparative toxicity of standard nickel and ultrafine nickel in lung after intratracheal instillation. *Journal of Occupational Health*. 45(1); 23-30.

Zhou P., Smith N., and Lee Ch., 1993. Potential purification and some properties of Monroe apple peel polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 41(4); 532-536.

Zigoneanu, I. G., Astete, C. E., and Sabliov, C. M. 2008. Nanoparticles with entrapped α -tocopherol: Synthesis, characterization, and controlled release. *Nanotechnology*, 19(10) art. no. 105606.