UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGROINDUSTRIAS

TESIS

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE NANOPARTÍCULAS DE QUITOSANO EN RECUBRIMIENTOS DE QUITOSANO/GOMA DE TARA (*Caesalpinia spinosa*) SOBRE LA CONSERVACIÓN DE ARÁNDANO (*Vaccinium myrtillus*)

Para optar el título de Ingeniero Agroindustrial

Autor:

Br. Belen Isabel Veliz Miranda

Tumbes, 2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGROINDUSTRIAS

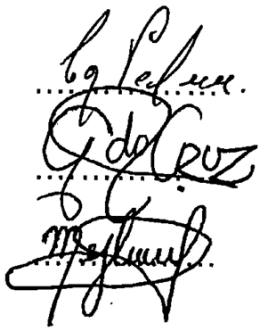
Efecto de la concentración de nanopartículas de quitosano en recubrimiento de quitosano/goma de tara (*Caesalpinia spinosa*) sobre la conservación de arándano (*Vaccinium myrtillus*)

Los suscritos declaramos que el presente trabajo de tesis es original en su contenido y forma

Br. Belen Isabel Veliz Miranda (Autor)

Dr. Gerardo Juan F. Cruz Cerro (Asesor)

Ing. Maritza Y. Navarro Purizaga (Co-Asesor)



Tumbes, 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGROINDUSTRIAS

Efecto de la concentración de nanopartículas de quitosano en recubrimiento de quitosano/goma de tara (*Caesalpinia spinosa*) sobre la conservación de arándano (*Vaccinium myrtillus*)

Tesis aprobada en contenido y estilo por:

Mg. Dorian Yasser Aguirre (Presidente) .....

Mg. José Luis Cabrera Reyes (Secretario) .....

Mg. Rosa Liliana Solís Castro (Vocal) .....

Tumbes, 2021

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TUMBES
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGROINDUSTRIAS
CAMPUS UNIVERSITARIO S/N "LA CRUZ"
SECRETARÍA ACADÉMICA
TUMBES - PERÚ

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Tumbes, a los catorce días del mes de octubre de dos mil veinte, se reunieron en sesión virtual, los integrantes del Jurado designados por Resolución Decanal N° 041-2019/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D y Resolución Decanal N° 033-2020/UNTUMBES-VRACAD-FCA-D que aprueban el proyecto de tesis y modifica el título, designa y ratifica a los miembros del Jurado, con el objeto de evaluar la sustentaciónde la tesis denominada: **"Efecto de la concentración de nanopartículas de quitosano en recubrimientos de quitosano/goma de tara (*Caesalpinia spinosa*) sobre la conservación de arándano (*Vaccinium myrtillus*)"** para optar el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial.

A las NUEVE horas con QUINCE minutos y, de acuerdo a lo estipulado en el reglamento respectivo, el presidente del Jurado dio por iniciado el acto de sustentación.

Luego de la exposición del trabajo, la formulación de preguntas y la deliberación del Jurado la declararon APROBADA por UNANIMIDAD con el calificativo de MUY BUENA.

Por lo tanto, la Bachiller **BELEN ISABEL VELIZ MIRANDA**, está apta para que el Consejo Universitario de la Universidad Nacional de Tumbes, le expida el Título Profesional de Ingeniero Agroindustrial de conformidad con lo estipulado en el Artículo 90° del Estatuto de la Universidad Nacional de Tumbes y a lo normado en el Reglamento de Grados y Títulos.

Siendo las DIEZ horas con VEINTE minutos, el presidente del Jurado dio por concluido el presente acto académico y para mayor constancia de lo actuado firman en señal de conformidad todos los integrantes de este jurado, presentes en el acto de sustentación.

Ing. DORIAN YASSER AGUIRRE CAMPOS
Presidente
DNI: 40442207

Mg. JOSÉ LUIS CABRERA REYES
Secretario
DNI: 00327891

Mg. ROSA LILIANA SOLÍS CASTRO
Vocal
DNI: 17628592

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a la memoria de Valentina, mi soporte, mi fiel compañera la que llegó a mi vida como una luz e iluminó mi camino con amor y con una dulzura que siempre llevaré en mi corazón, siendo mi sostén durante mis estudios de mi carrera profesional, a mi pequeño hermano por haberse convertido en el hombre noble e íntegro que es hoy en día, a mi abuelita la mujer más fuerte que conozco, la que nos enseñó a mi mamá y a mí la luz y la fortaleza que toda mujer lleva dentro.

AGRADECIMIENTO

Agradezco sinceramente la ayuda que muchas personas y profesionales han ofrecido durante la investigación de esta tesis en especial a la Universidad Nacional de Tumbes que financió la investigación mediante el proyecto **"Recubrimientos basados en quitosano de alto peso molecular derivado de pluma de pota *(Dosidicus gigas)*, nanopartículas de quitosano ZnO para inhibir los microorganismos que atacan la fruta de exportación en el Norte del Perú y su efecto sobre la vida útil".**

A mi Co-asesor Ing. Navarro Purizaga Maritza Yliana por su amistad y paciencia, al Dr. Gerardo Juan Francisco Cruz Cerro por su apoyo incondicional como asesor de esta tesis, al Ing. Rimaycuna y a la docente de la Universidad Mayor de San Marcos la Mg. Ruth Noemí Saavedra por su apoyo en la parte experimental; al laboratorio de biología molecular de la FCS-UNTumbes, al Microb. Rubén Alfaro y a la Ing. Gloria, por brindarme el apoyo en el área de microbiología. A los docentes de la Universidad Nacional de Trujillo al Dr. Segundo y a la Mg. Samanamud por su apoyo brindado en el análisis de las nanopartículas, además del Dr. Raúl Siche, por su apoyo en los análisis de conservación de los arándanos con recubrimientos.

Además, agradezco a cada uno de los docentes que, con su sabiduría y ética profesional, inspiraron en mí el desarrollo académico, profesional y personal en mi alma mater la Universidad Nacional de Tumbes.

Así como a toda mi familia y amigos por confiar siempre en mí, ayudarme en todo lo posible y darme ánimos para poder concluir satisfactoriamente mi tesis.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN 13

2.1. Antecedentes 15

2.2. Bases teórico-científicas 17

2.2.1. Nanopartículas de quitosano 17

2.2.2. Quitosano 17

2.2.2.1 Definición, fuentes y producción del quitosano 17

2.2.3. Propiedades antimicrobianas del quitosano sobre hongos enpostcosecha y mecanismos generales de acción 18

2.2.4. Recubrimientos del quitosano para reducir la descomposición postcosecha en productos hortícolas 21

2.2.5. Arándano 23

2.2.6. Tecnología de espectroscopia infrarrojo cercana NIR aplicada en alimentos 26

III. Materiales Y Métodos 27

3.1. Materiales y equipos. 27

3.1.1. Materiales 27

3.1.2. Equipos 29

3.1.3. Lugar y período de ejecución 30

3.1.4. Tipo de estudio y diseño de investigación 30

3.1.5. Población, muestra y muestreo 31

3.2. Métodos 32

3.2.1. Producción y caracterización de las nanopartículas de quitosano (NpQ) 31

3.2.2. Producción del recubrimiento 37

3.2.3. Hongos utilizados para las pruebas in vitro 42

3.2.4. Prueba del recubrimiento en arándanos 50

IV. Resultados Y Discusión 54

4.1. Obtención de nanopartículas de quitosano 54

4.2. Caracterización de nanopartículas de quitosano 55

4.2.1. Gravimetría 55

4.2.2. Difracción por rayos X 56

4.2.3. Dynamic light Scattering (DLS) 57

4.3. Elaboración de recubrimientos de nanopartículas de quitosano a base de quitosano/goma De Tara 58
4.4. Identificación de los hongos. 59
4.5. Medición de poder antifúngico. 59
4.6. Conservación del arándano en función de sus características fisicoquímicas. 60
4.6.1. Variación de grados Brix. 61
4.6.2. Variación del pH 63
4.6.3. Variación del peso 64
4.6.4. Variación de la firmeza 66
4.7. Imágenes Hiperespectrales 69
V. CONCLUSIONES 72
VI. RECOMENDACIONES 74
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 75
VIII. ANEXOS 86

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Alteraciones morfológicas y celulares de hifas y conidios de diversos hongos postcosecha después del tratamiento con quitosano. 19

Cuadro 2: Recubrimiento de quitosano y su efecto en el desarrollo de pudriciones enpostcosecha en algunos productos hortícolas. 21

Cuadro 3. Comparación de variedades de arándanos 24

Cuadro 4. Composición de las fórmulas y testigos 39

Cuadro 5. primer usados para la identificación de hongos 46

Cuadro 6. Condiciones de PCR para la amplificación de la región espaciadora interna ITS en la identificación de los hongos 47

Cuadro 7. Caracterización con DLS de las nanopartículas de quitosano 56

Cuadro 8. Especies de hongos identificadas extraídas del arándano 58

Cuadro 9. Análisis de varianza (ANOVA) para °Brix de las muestras de arándano 61

Cuadro 10. Análisis de varianza (ANOVA) para pH de las muestras de arándanos 63

Cuadro 11. Análisis de varianza (ANOVA) para % pérdida de peso (%pp) de las muestras de arándanos 64

Cuadro 12. Análisis de varianza (ANOVA) para firmeza de las muestras de arándanos 67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma de soluciones base	34
Figura 2. Flujograma de proceso de nanopartículas de quitosano	35
Figura 3. Flujograma de la elaboración del recubrimiento	40
Figura 4. Flujograma del análisis microbiológico	48
Figura 5. Flujograma de prueba de arándanos	50
Figura 6. Caracterización de nanopartículas de quitosano por Gravimetría.	54
Figura 7. Caracterización de nanopartículas de quitosano por DRX	55
Figura 8. Formulaciones de nanopartículas de quitosano	57
Figura 9. Efecto del retardo microbiano in vitro	59
Figura 10. Comportamiento de los °Brix de las muestras de arándanos durante el almacenamiento	60
Figura 11. Comportamiento del pH de los arándanos durante el almacenamiento	62
Figura 12. Comportamiento de la %pp de las muestras de arándano	64
Figura 13. Comportamiento de firmeza de las muestras de arándonos durante el almacenamiento	66
Figura 14. Análisis de componentes principales (PCA): (A) Análisis de discriminación de PC arándanos sin recubrimiento, (B) Análisis de discriminación de PC arándanos con recubrimiento	68
Figura 15. Análisis de componentes principales (PCA): (A) Longitud de onda para muestras de arándanos sin recubrimiento, (B) Longitud de onda para muestras de arándano con recubrimiento	69

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como propósito evaluar el efecto de cuatro concentraciones distintas (25, 50, 75 y 100%) de nanopartículas de quitosano en recubrimientos de quitosano, combinadas con goma de tara *(Caesalpinia spinosa)* para la conservación del arándano *(Vaccinium myrtillus)*.

La formulación número 2 (con 75% de solución de nanopartículas de quitosano, 15% de solución de quitosano y 10% de solución de goma de tara) logró un 73% de retardo del crecimiento fúngico con respecto al testigo; y se logró retardar en un 28.62% la pérdida de peso por transpiración del fruto con respecto al testigo, el recubrimiento logró disminuir un 11.63% la pérdida de firmeza con respecto al testigo. Como base de esta investigación experimental se planteó un diseño de bloques; en su primera fase, se realizó una prueba de descarte utilizandoel criterio de porcentaje de inhibición de las formulaciones, en la cual seencontró que la formulación número 2 tuvo mayor potencial antimicrobiano. Se seleccionaron 120 unidades de arándanos de exportación con la finalidad de determinar el efecto de conservación de la variable arándano *(Vaccinium myrtillus).* Se concluyó una mejor conservación en los primeros 5 días de almacenamiento a 5 °C. en los parámetros de pérdida de peso por transpiración del fruto y firmeza por degradación de azúcares.

Palabras clave: arándano, nanopartículas, quitosano, calidad, hiperespectroscopia.

ABSTRACT

The purpose of this research work was to evaluate the effect of four different concentrations (25, 50, 75 and 100%) of chitosan nanoparticles in chitosan coatings, combined with Tara gum (Caesalpinia spinosa) for the conservation of blueberry (Vaccinium myrtillus). With formulation number 2 (with 75% chitosan nanopartic le solution, 15% chitosan solution and 10% Tara gum solution), a 73% delay of fungal growth was achieved with respect to the control; and it was possible to delay by 28.62% the loss of weight due to transpiration of the fruit with respect to the control, while the coating managed to reduce the loss of firmness by 11.63% with respect to the control. As a basis for this experimental research, a block design was proposed; In its first phase, a discard test was carried out using the criterion of percentage inhibition of the formulations, in which it was found that formulation number 2 had the highest antimicrobial potential. 120 units of blueberries for export were selected in order to determine the conservation effect of the variable blueberry (Vaccinium myrtillus). Better preservation was concluded in the first 5 days of storage at 5 ° C. in the parameters of weight loss due to perspiration of the fruit and firmness due to the degradation of sugars.

Key words: bilberry, nanoparticles, chitosan, quality, hyperspectroscopy.

I. INTRODUCCIÓN

Destacando la problemática en la que vivimos actualmente, aproximadamente 1.300 millones de toneladas de alimentos por año son desperdiciados en el mundo, de estos alimentos el 55% son frutas y hortalizas teniendo así un déficit alimentario global; los países del mundo entero se han comprometido en buscar nuevas tecnologías alimentarias que ayuden a prolongar la vida útil de los mismos (FAO, 2017).

Ahora bien, según la FAO (2015) la pérdida de alimentos se conceptualiza como la merma de los alimentos en la etapa de producción, postcosecha, almacenamiento o procesamiento, mientras que desperdicio de alimentos se le llama a la misma merma en la fase de comercialización y consumo.

La misma necesidad de conservar los alimentos y a su vez no contaminar el medio ambiente hace que las industrias alimentarias hoy en día estén en la búsqueda de alternativas de envasado que contaminen menos nuestro planeta. Iniciativa que se comparte a nivel mundial, y que es motivo de numerosas investigaciones y la aparición de nuevas tecnologías. Dentro de estas nuevas tecnologías se encuentran los recubrimientos biodegradables, los cuales al estar en contacto con el alimento lo protegen del medio, evitando el intercambio de gases, la posibilidad de contaminación, además de una nueva presentación y representa una menor amenaza de contaminación ambiental.

Es tendencia también que se intente dar un valor agregado a la tecnología de recubrimientos biodegradables buscando su elaboración a partir de residuos naturales o industriales, aprovechando las propiedades que estos tienen, evitando que se pierdan y que puedan contaminar el medio ambiente. Dentro de las opciones tenemos al quitosano, el cual es un polímero derivado de diferentes grados de desacetilación de la quitina, presente en el caparazón de los crustáceos (Younes y Rinaudo, 2015).

Existe evidencia acerca de los mecanismos por los cuales el quitosano actúa en contra de bacterias y hongos fitopatógenos. Como se indica en numerosos estudios, los cambios en la permeabilidad celular de los microorganismos se deben a la interacción entre la naturaleza poli catiónica del grupo amino del quitosano y las cargas electronegativas en la superficie externa de la membrana fúngica o bacteriana (Dutta, 2009).

El arándano es una de las frutas que tiende a cosecharse muy cerca de su punto de madurez para que el fruto pueda desarrollar sus características organolépticas y fisicoquímicas de acuerdo como lo solicita el mercado. Este hecho, crea la necesidad de que su manejo postcosecha sea oportuno y rápido para evitar su pérdida.

De esta manera, la importancia de la investigación radica en una nueva tecnología de empaque y conservación de arándanos frescos, la cual retarda la degradación del arándano causado principalmente por hongos siendo este un inconveniente en la postcosecha de arándanos producido por hongos (Defillippi et al, 2013).

Además, la presente investigación busca el aprovechamiento de residuos agroindustriales orgánicos como exoesqueletos de langostinos, materia prima para la producción de quitosano y nanopartículas; con el fin de reducir las vertientes contaminantes de la industria acuícola. De esta manera, se busca proponer una alternativa para sustituir el uso de plásticos debido a su alto impacto ambiental e incentivar a las empresas y al consumidor el uso de tecnologías emergentes y sostenibles como son los recubrimientos biodegradables.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Matos (2020) nos indica que el empaquetado pasivo como defensa física entre la comida y su entorno ayuda a sus diferentes propiedades entre ellas su vida útil. Conjuntamente, el consumo de plástico no reciclado como materia prima para producir empaques es un dilema global, en el sentido contaminante de su origen como derivado directo del petróleo. Debido a ello, la investigación de materiales para envases que prometan tener mayores propiedades, tener menor huella de carbono, además, de mayor margen monetario, hoy en día es prioridad el desarrollo de estos. Es por ello por lo que el desarrollo de los envases activos ha mejorado la calidad y estabilidad de alimentos desarrollados en materiales amigables con el medioambiente.

En cuanto a cubiertas biodegradables debido a las propiedades antimicrobianas del quitosano muchos estudios se vienen realizando referente a ello, algunos autores como Bautista-Baños y Ventura-Aguilar (2017) nos indican que el quitosano y sus nanopartículas controlan numerosas enfermedades postcosecha en diversos productos hortícolas siendo esto un estudio emergente. Asimismo, muestran que el complemento de conservación con quitosano con otras tecnologías de control dilata la vida de diversos frutas y vegetales, debido a la disminución de la actividad microbiana. La presencia de grupos amino (-NH2) en su estructura química proporciona al quitosano propiedades únicas e ideales para diferentes sistemas agrícolas; incluyendo la conservación de alimentos mediante el desarrollo de recubrimientos comestibles biodegradables. Asimismo, el uso integrado de nano emulsiones de quitosano con otros tratamientos seguros y no contaminantes ofrece una alternativa para preservar la calidad de los productos frescos durante el almacenamiento.

Además, la investigación de Lamarra (2017) pudo determinar que la fijación de nanopartículas formó matrices con características mecánicas superiores debido a una mayor medida de fuerza en función al aumento de la medida agregada a la matriz de quitosano, en proporción con el acrecentamiento en la estructura en forma de cristal de los nanocompuestos.

Es más, en la investigación de Medina (2017) se estudió la actividad antimicrobiana de los recubrimientos de quitosano y ε-polilisina en moras de Castilla (*Rubus glaucus Benth)* inoculadas con *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* (103 ufc·g-1) y *Botrytis cinerea* (103 conidios·ml-1). La actividad antifúngica de los recubrimientos de quitosano y de ε-polilisina fue superior a un tiempo de exposición mayor de los polímeros en las células de B. cinérea.

Ahora bien, el estudio de Muñoz et al (2017) nos indica que las carnes con recubrimientos comestibles con goma de tara (*Caesalpinia spinosa*) al 2% p/v con 8°C. y 20 días de almacenamiento, tienen un 32% menos merma en peso en comparación con su control, además de mantener un pH por debajo del (7.2) e índice de oxidación (2.1), así como disminución en su microbiota.

Además, en la investigación de Pavón-Vargas (2016) desarrollaron recubrimientos que comestibles a partir de goma de tara, glicerina como plastificante y cera de abeja y goma laca como lípido, conjuntamente se incluyó dos fórmulas diluidas en agua 1:1 y un grupo control sin recubrimiento para cubrir las frutillas, con condiciones de almacenamiento de 5 °C., 98% de humedad por un tiempo de 8 días, posterior a ello se analizó “pérdida de peso, firmeza, pH, acidez titulable, contenido de sólidos solubles, tasa de respiración y evaluación sensorial”, ultimando que, la formulación principal sin dilución tenían mayor eficacia en mantener los parámetros antes mencionados.

2.2. Bases teórico-científicas

2.2.1. Nanopartículas de quitosano

Son biopolímeros en escalas nanométricas logrados a partir de quitosano poseedor de propiedades biológicas como mucoadhesividad, biocompatibilidad, biodegradabilidad y baja inmunogenicidad (Bento *et al*., 2015; Rinaudo, 2006; Rodrigues et al., 2012; Silva et al., 2017; Zhou et al., 2015). Estos se obtienen a partir de dos tipos de estrategias la primera de ellas es la estrategia de construcción la que se basa en agregar o acumularmoléculas, hasta obtener estructuras en el intervalo de tamaño deseado. La segunda forma para obtener nanopartículas es la estrategia de deconstrucción la que se basa en el fraccionamiento controlado de materiales (Caro et al., 2009; Zhang et al., 2019).

2.2.2. Quitosano

Hasta la fecha, el quitosano y su integración con otras sustancias vienen siendo valoradas como una opción para reducir las mermas por hongos y bacterias cuando se almacenan los productos frutícolas, puesto que existen investigaciones que nos revelan que ayuda a mantener la calidad de fruto alo largo del tiempo que permanece en almacenamiento, debido a su acciónantibacterial y antifúngica que estos tienen. En la actualidad, poder controlar este microbiota que degenera al fruto con nanotecnología es una tendencia que en los próximos años se seguirá desarrollando (Sotelo-Boyás et al., 2016).

2.2.2.1 Definición, fuentes y producción del quitosano

Younes y Rinaudo (2015), definen al quitosano como una familia de polímeros obtenidos de diferentes grados de desacetilación de

quitina. Así también Lizardi (2016), sostiene que una característic a distintiva de la estructura química del quitosano es la presencia predominante de grupos amino que pueden ser ionizados, convirtiéndose en medios ácidos, promoviendo la disolución del quitosano y el comportamiento poli electrolítico en las soluciones ácidas.

El quitosano se puede encontrar en conchas de crustáceos marinos y es un componente importante de la pared celular de ciertos hongos, particularmente aquellos pertenecientes a la clase Zygomycetes. La quitina puede convertirse en quitosano mediante reacciones enzimáticas o procesos químicos. Los métodos químicos se utilizan ampliamente con fines comerciales debido a su bajo costo e idoneidad para la producción en masa (Bautista y Ventura, 2017).

2.2.3. Propiedades antimicrobianas del quitosano sobre hongos en postcosecha y mecanismos generales de acción

Varios estudios han confirmado el efecto fungicida in vitro e in situ del quitosano en diversas familias de hongos fitopatógenos: "*Mucoraceae*, *Pleosporaceae* y *Glomerellaceae*. Además*, Alternaria alternata*, *Rhizopus stolonifer, Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum, Aspergillusflavus"* y varias especies de *Penicillium* también pueden ser afectados por este polímero.

Hoy en día, existe evidencia acerca de los mecanismos por los cuales el quitosano actúa en contra de bacterias y hongos fitopatógenos. Como se indica en numerosos estudios, los cambios en la permeabilidad celular de los microorganismos se deben a la interacción entre la naturaleza poli catiónica del grupo amino del quitosano y las cargas electronegativas en lasuperficie externa de la membrana fúngica o bacteriana. (Dutta, 2009).

Por otra parte, Bautista Baños et al, (2017) concluyeron que la fuerte unión del quitosano con la membrana de los microorganismos conduce a graves desequilibrios celulares de homeostasia iónica de K+ y Ca2+ causando la salida de pequeñas moléculas, incluyendo fosfatos, nucleótidos y sustrato de reacciones enzimáticas que eventualmente afectan la respiración fúngicay la fermentación.

Bautista-Baños et al (2016), indica que la interacción electrostática entre elquitosano y el microorganismo se da mediante alteraciones dramáticas en la estructura de la pared celular y la membrana plasmática de los hongos tratados. La integridad de los organelos que incluyen a las vacuolas se ve afectada conduciendo en algunos casos a la muerte celular. Adicionalmente, durante la interacción hospedero-patógeno, observaron la formación de barreras estructurales por parte del hospedero; esto, principalmente, a través de la síntesis intercelular e intracelular de material similar al de lignina con fenol que detiene la invasión fúngica (Cuadro 1). Enestos estudios, el crecimiento fúngico solo llega al área cortical externa de los tejidos infectados; mientras que, el daño en los hongos fue similar al observado en estudios in vitro.

.

Cuadro 1. Alteraciones morfológicas y celulares de hifas y conidios dediversos hongos postcosecha después del tratamiento con quitosano

Hongos	Estructura fúngica	Cambio estructural	Cambio morfológico	Cambio celular	Citas
Alternaria alternata	Hifas y conidios		Hinchazón, forma anormal y micelio desorganizado	Paredes celulares sin consistencia, quebradas y desiguales. Vacuolización intensa y prolongada. Formación de material fibrilar, fuga de citoplasma y lisis célula.	Sánchez-Domínguez et al. (2011); de Oliveira, el Gueddari, Moershbacher, and Franco (2012a); López-Mora et al. (2013
Aspergillus niger	Conidios		Hinchazón y agregados.	Alteraciones en las paredes celulares externas y en la membrana del núcleo	Plascencia-Jatomea, Viniegra, Olayo, Castillo-Ortega, and Shirai (2003); Liu, Tian, Meng, and Xu, (2008)
Botrytis cinerea	Hifas	Hinchazón, formas anormales y micelios desorganizados.	Formación de vesículas y ramificaciones excesivas	Células sin citoplasma.	De Oliveira, de Melo, and Teixeira (2012b)
Colletotrichum gloeosporioides	Hifas	Atrofiadas, formas anormales, deformadas y colapsadas.			Jung et al. (2011)
Penicillium expansum	Hifas		Hinchazón, formas anormales y desorganización micelial.		De Oliveira et al. (2012b)
Rhizopus stolonifer	Hifas	Ramificación excesiva.	Micelios distorsionados	Deshidratación intensa y pared celular desprendida, irregular y alterada.	Ramos-García et al. (2012)

FUENTE: Recuperado de Bautista et al, 2017.

2.2.4. Recubrimientos del quitosano para reducir la descomposición postcosecha en productos hortícolas

El quitosano puede llegar a formar un recubrimiento semipermeable que regula el intercambio gaseoso y reduce la pérdida de transpiración, frenando la maduración de los frutos. En general, la tasa de respiración y, por tanto, las pérdidas de agua se reducen. Como se ha mencionado, los recubrimientos de quitosano tienen la capacidad de retardar o evitar el desarrollo de hongos en diversos productos hortícolas durante el almacenamiento. Muchos frutos, incluyendo la ciruela mexicana, el aguacate, la papaya y la pitaya, se han beneficiado con el uso del quitosano. La eficacia promedio del quitosano aplicado solo para controlar enfermedades importantes (antracnosis, pudrición parda, pudrición por *Rhizopus*, moho gris y moho azul) osciló entre 45 y 100 % (Cuadro 2) (Bautista et al, 2017).

Asimismo, en muchos estudios se menciona que el control también puede estar sujeto al tipo de interacción hospedero-patógeno, tipo de quitosano, concentración, y condiciones de almacenamiento. El recubrimiento de quitosano con peso molecular más alto resultó mejor para controlar *Botrytis cinérea* durante el almacenamiento de jitomates a 2 y 25 º C. En la mayoría de los estudios, la concentración de este polímero fue un factor clave en la reducción de la enfermedad postcosecha y, como se reportó en estudios in vitro, a medida que la concentración aumentó, la infección por hongos disminuyó considerablemente (Correa-Pacheco et al, 2019).

Cuadro 2: Recubrimiento de quitosano y su efecto en el desarrollo de pudriciones en postcosecha en algunos productos hortícolas.

Producto hortícola	Quitosano	Enfermedad	Nivel de control	Cita
Pitaya	2 % de quitosano convencional. 0.5 a 2.0 % de quitosano modificado.	Antracnosis	80 % 93 %	Ali et al. (2013)
Mango	1.0 y 1.5 %	Antracnosis	100 %	Berumen-Varela et al. (2015)
Papaya	1.5 %	Antracnosis	70 %	Bautista-Baños, Hernández-López, Bósquez-Molina, and Wilson (2003)
Durazno	10 $mg \cdot ml^{-1}$	Pudrición café	60 %	Li and Yu (2000)
Fresa	2 % 1 %	Pudrición blanda Moho gris	45 % 70 %	Park et al. (2005) Romanazzi, Nigro, and Ippolito (2001)
Cereza	1 %	Moho gris	100 %	Romanazzi, Nigro, and Ippolito (2001)
Jitomate	Peso molecular de 5.7 x 10^4 y 2.9 x 10^5 $g \cdot mol^{-1}$	Pudrición café Moho gris	100 % 100 %	Romanazzi, Nigro, and Ippolito (2001) Badawy and Rabea (2009)
Uva de mesa	0.5 y 1 % 1 %	Moho azul Moho gris	45 % 70 %	Liu, Tian, Meng, and Xu (2007) Romanazzi, Nigro, and Ippolito (2001)

Fuente: Recuperado de Bautista et al (2017).

2.2.5. Arándano

a. Definición

El arándano es una baya originaria de Norteamérica. Se llama también fruta del bosque que crece de manera silvestre. Generalmente se cultivan dos tipos: el Louwbush Blueberry (especies pequeñas) y el Highbush Blueberry (arbustos grandes). El arándano pertenece a la familia de los Berries, destaca por sus cualidades hipocalóricas, antioxidantes, nutritivas y medicinales (MINAGRI, 2016).

La baya del arándano, el fruto, es casi esférico. Dependiendo de la especie, puede variar en tamaño desde 0.7 a 1.5 cm. de diámetro. Tiene color negro azulado y está cubierto de pruina azul, con un ribete en lo alto a modo de coronita. Su carne de un agradable sabor agridulce, es de color vinoso, y en la parte central contiene diversas simienes. Su piel le da una terminación muy atractiva similar a la ciruela y es rica en agua (85%), osas (3 a 7%), minerales (K, Ca, Mn) y ácidos (1% de cítrico). Las variedades Biloxi, Misty y Legacy son las que mejor se adaptan al clima y el suelo peruano (MINAGRI, 2016).

b. Tipos de arándano

Según el informe del MINAGRI (2016) existen tres tipos de arándanos en el Perú los cuales detallaremos a continuación:

A. Arándano azul *(Vaccinium corimbosum*)

   Destaca sus frutos de color negro azulado, bastante grandes y sabrosos; es la especie más cultivada (MINAGRI, 2016).

B. Arándano negro / Arándano uliginoso *(Vaccinium uliginosum)*

Sus frutos son negros con pulpa blanca y se recogen de forma silvestre; sus flores tienen un color de rosa pálido. Florece en primavera y fructifica en verano; no suele cultivarse (MINAGRI, 2016).

C. Arándano rojo *(Vaccinium vitis-idaea)*

Los frutos son redondeados, rojizos y aparecen a finales de otoño; su sabor es muy ácido y por eso se utiliza fundamentalmente en la elaboración de compotas y mermeladas (MINAGRI, 2016).

c. Perfil del producto

Según el cuadro de resumen de las variedades (cuadro 3), se puede determinar que la variedad Biloxi fue la escogida, pues actualmente es la variedad que más se exporta en Perú además de ello tiene rendimientos muy buenos respecto a otras variedades. Los arándanos son conocidos por tener varios valores nutricionales, entre ellos sus extraordinarias propiedades antioxidantes. Además, son utilizados en la industria farmacéutica, fortalecen el colágeno. Es una fruta perecible por lo que su lead time desde su salida de la planta hasta su llegada al mercado de destino es importante. El arándano puede comerse en fruto fresco, congelado o transformado (Juanito, 2018).

Cuadro 3: Comparación de variedades de arándanos

Variedad	Tamaño	Cualidades	Requerimiento horas de frío	Rendimiento por Ha. (t)
Biloxi	Mediano	Color azulado, excelente sabor	150	15 a 20
Misky	Grande	Suave, sabor dulce y firme	250	15 a 20
O´Ncal	Grande	Azul muy oscuro y dulce	600	10 a 12
Star	Mediano-Grande	Color azul y excelente sabor	Mayor a 1000	18 a 20

Fuente: Juanito, 2018

d. Calidad del fruto del arándano

La calidad está definida por una serie de factores agrupados como calidad visible, calidad organoléptica y calidad nutritiva. La calidad visible se refiere a la apariencia de la fruta, definida en arándanos como: (i) un fruto de color azul uniforme, (ii) presencia de cera en la superficie de la fruta (conocida como bloom) que el consumidor relaciona a una fruta fresca, (iii) ausencia de defectos como daño mecánico y pudriciones, (iv) forma y tamaño de la fruta, y (v) firmeza adecuada. La calidad organoléptica está determinada por un contenido apropiado de azúcares, ácidos y compuestos volátiles, responsables del aroma característico de la fruta. Por lo tanto, todas las operaciones de precosecha y postcosecha deben orientarse a maximizar la llegada de un producto de calidad hasta el consumidor. Los índices de calidad usados normalmente por la industria de fruta fresca son: color, tamaño, forma, ausencia de defectos, firmeza y sabor (Juanito, 2018).

2.2.6. Tecnología de espectroscopia infrarrojo cercana NIR aplicada en alimentos

La tecnología de infrarrojo cercano se basa en la combinación de espectros y métodos matemáticos. Esta tecnología consiste en que la luz NIR sea reflejada sobre la muestra y esta sea modificada sutilmente convirtiéndose en imágenes multiespectrales. Complementariamente aplicando el análisis de imágenes multiespectrales convertir la información como la composición del alimento y utilizarla como herramientas que permitan determinar los parámetros de calidad de las frutas, seleccionando luego variables significativas con el fin de proponer modelos de calibración para ser aplicados en las líneas de clasificaciones de frutas teniendo el control de calidad de estas, evitando el gasto en la fruta destruida y posibles errores en la selección de muestras a analizar (Lazo, 2018; Lafuente R., 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales y equipos.

3.1.1. Materiales

a. Materia prima

- Arándano (*Vaccinium myrtillus*)

b. Reactivos e insumos

- Agua destilada.
- Quitosano
- Goma de tara (Caesalpinia spinosa)
- Nanopartículas de quitosano
- Agar PDA
- Ácido cítrico
- Tripolifosfato de sodio (TPP)
- Sílica gel

c. Materiales de laboratorio

- Mortero
- Mazo
- Fiolas (25, 50 250 ml.)
- Matraces (100, 250 y 500ml)
- Pipetas graduadas (1, 5 y 10 ml.)

- Micropipeta 10 ul.
- Probetas (10, 25 y 50 ml.)
- Vasos de precipitados (10, 100, 250 y 500 ml.)
- Placas Petri.
- Pera de succión (bombilla)
- Cronómetro.
- Pizeta de plástico (500 ml.)
- Cuchara espátula de metal.
- Penetrómetro.
- pH-metro.
- Tubos de cultivo (tamaño variado).
- Frascos de vidrio (capacidad variada)
- Papel filtro
- Embudo
- Tubos de ensayo
- Acrílicos de 15 x 15cm.
- Bolsas autosellables
- Tubos de polipropileno 50 ml.
- Tubos de polipropileno 2 ml.
- Papel Parafilm.

d. Materiales de escritorio

- Agenda
- Cuaderno
- Lapiceros
- Plumones indelebles
- Corrector
- Hojas
- Folder manila
- Sobre manila

3.1.2. Equipos

a. Balanza analítica

Marca: Sartorius

Modelo: Quintix

b. Refrigeradora

Marca: Perkin Elmer

Modelo: Lambda 365

c. Estufa al vacío.

Marca: Binder

Modelo: VDL

d. Refractómetro.

Marca: Equinlab

Modelo: DR301

e. Agitador magnético.

Marca: CIMAREC

Modelo: Thermo Scientific TM

f. Difractómetro de rayos X

Marca: Bruker

Modelo: D6 Advance

g. Analizador de nanopartículas por Dinamic Light Scattering (DLS)

Marca: Nicomp

Modelo: Z3000

h. Incubadora

Marca: MEMMERT

Modelo: SN 75 PLUS

i. Ultracentrífuga

Marca: HETTICH

Modelo: Rotina 380 R

j. Sistema de imágenes hiperespectrales

Marca: NIR-HSI

Modelo: 1003B-00572

3.1.3. Lugar y período de ejecución

La elaboración de las nanopartículas de quitosano se realizó en el laboratorio de la Universidad Mayor de San Marcos en la ciudad de Lima, posteriormente en la empresa INCA´Biotec SAC en la ciudad de Tumbes. En la Universidad Nacional de Trujillo en la ciudad de Trujillo se elaborarony analizaron las nanopartículas de quitosano respectivamente, la realización de los recubrimientos se efectuó en los laboratorios de la Universidad Nacional de Tumbes en la ciudad de Tumbes, asimismo los análisis de los efectos sobre los arándanos de las biorrecubrimientos se realizaron en el laboratorio de Operaciones de la Universidad Nacional de Trujillo en la ciudad de Trujillo. Los datos obtenidos fueron procesados en Minitab 17.0.

3.1.4. Tipo de estudio y diseño de investigación

La presente investigación tuvo un enfoque experimental, realizando un método inductivo.

3.1.5. Población, muestra y muestreo

La población fue de 2 kg de arándanos con características para su exportación cosechados en el departamento de la Libertad, la muestra fue de 250 arándanos y se realizó un muestreo aleatorio.

3.2. Métodos

3.2.1. Producción y caracterización de las nanopartículas de quitosano (NpQ)

3.2.1.1. Producción de las nanopartículas de quitosano

Se realizaron soluciones necesarias para la producción de las nanopartículas de quitosano tal como se puede observar en la figura 1,las que se detallan a continuación.

a. Concentración de ácido cítrico

Se preparó una solución de ácido cítrico debido a su naturaleza afín a los frutos y a sus características organolépticas, la concentración de ácido fue de 1.5% (p/v), seguidamente se disolvió el quitosano sometido a 1000 rpm y a una temperatura aproximada de 35 °C por espacio de 30 min se enfrió a temperatura ambiente y almacenó a 8 °C; el flujo del proceso de preparación lo podemos observar en la figura 1 (A).

b. Preparación de solución quitosano

Se preparó 335 ml de solución de quitosano comercial (1% p/v) disolviendo el polímero, en 335 ml de solución de ácido cítrico a concentración de 1.5% (p/v), utilizando para ello un agitador magnético a 1500 rpm a 35 °C por 12 h**.** A partir de 25 ml de la solución de quitosano comercial al 1%, se obtuvo 125 ml de solución de quitosano al 0.2%, se enfrió a temperatura ambiente y se almacenóa 8 °C; el flujo del proceso de preparación lo podemos observar en la figura 1 (B).

c. Concentración de tripolifosfato de sodio

De una solución de tripolifosfato de sodio (TPP) al 1%, se preparó la solución de TPP al 0.1% (p/v), necesaria para la obtención de las nanopartículas de quitosano**.** Para su preparación, se diluyó la solución de TPP al 1% en agua destilada a 1000 rpm por 30 min. Finalmente, la solución de TPP diluida al 0.1% se almacenó a temperatura ambiente; el flujo del proceso de preparación lo podemos observar en la figura 1 (C).

d. Obtención de nanopartículas de quitosano

Se logró obtener nanopartículas de quitosano en solución acuosa siguiendo la metodología de gelación iónica: se agregaron gotas de 50 µl de la solución de tripolifosfato de sodio (TPP) al 0.1% (ver el anexo 2(b) para su mejor comprensión), con ayuda de una micropipeta se vertió gotas de 0.5 ml de TPP a la solución de quitosano al 0.2% en proporción de 1 a 1, bajo agitación magnética a 1500 rpm y temperatura ambiente, obteniéndose soluciones de TPP-quitosano. Finalmente, se ultra centrifugaron las soluciones obtenidas a 15000 rpm y 20 °C durante 30 min para separar las nanopartículas**,** de las partículas de mayor tamaño que se encuentran en el precipitado obteniéndose en el sobrenadante las nanopartículas de quitosano de menor tamaño; el flujo del proceso de obtención lo podemos observar en la figura 2.

3.2.1.2. Caracterización de las nanopartículas de quitosano

Se procedió a evaluar la concentración de nanopartículas en el sobrenadante por el método de gravimetría utilizando una estufa al vacío, este análisis fue realizado en el laboratorio de ingeniería forestal y medio ambiente de la Universidad Nacional de Tumbes; se realizó la medición

del tamaño de las nanopartículas, así como su potencial Z, ejecutando esta fase en la escuela profesional de física y matemática de la Universidad nacional de Trujillo, donde se cuenta con equipo adecuado como el Dynamic Light Scattering (DLS) y el Difractómetro de rayos X, evaluando 5 ml de las muestras con periodos de obtención de 9 y 45 días previos al análisis.

a. Gravimetría

Se determinó la concentración de nanopartículas de quitosano mediante el análisis gravimétrico pesando primero la placa Petri, luego se taró para obtener el peso inicial de la solución de nanopartículas de quitosano. Posterior a esto, utilizando una estufa al vacío se secó por un espacio de 4 h; se enfrió en el desecador 30 min., para finalmente pesar el recipiente en la balanza analítica y por diferencia de pesos determinar la concentración de nanopartículas en la solución expresada en porcentaje.

b. Dynamic light Scattering (DLS)

Este análisis se realizó utilizando el equipo de Dynamic Light Scattering (DLS) & Laser Doppler Electrophoresis System- Malvern Zetasizer ZS90.

c. Difracción de rayos X

Este análisis se realizó con la ayuda del equipo Brunker D8 Advance a 40 Kv y 40 mA, con radiación de CuKa (λ= 1.54 A). El intervalo analizado fue 2θ de entre 5 – 80°.

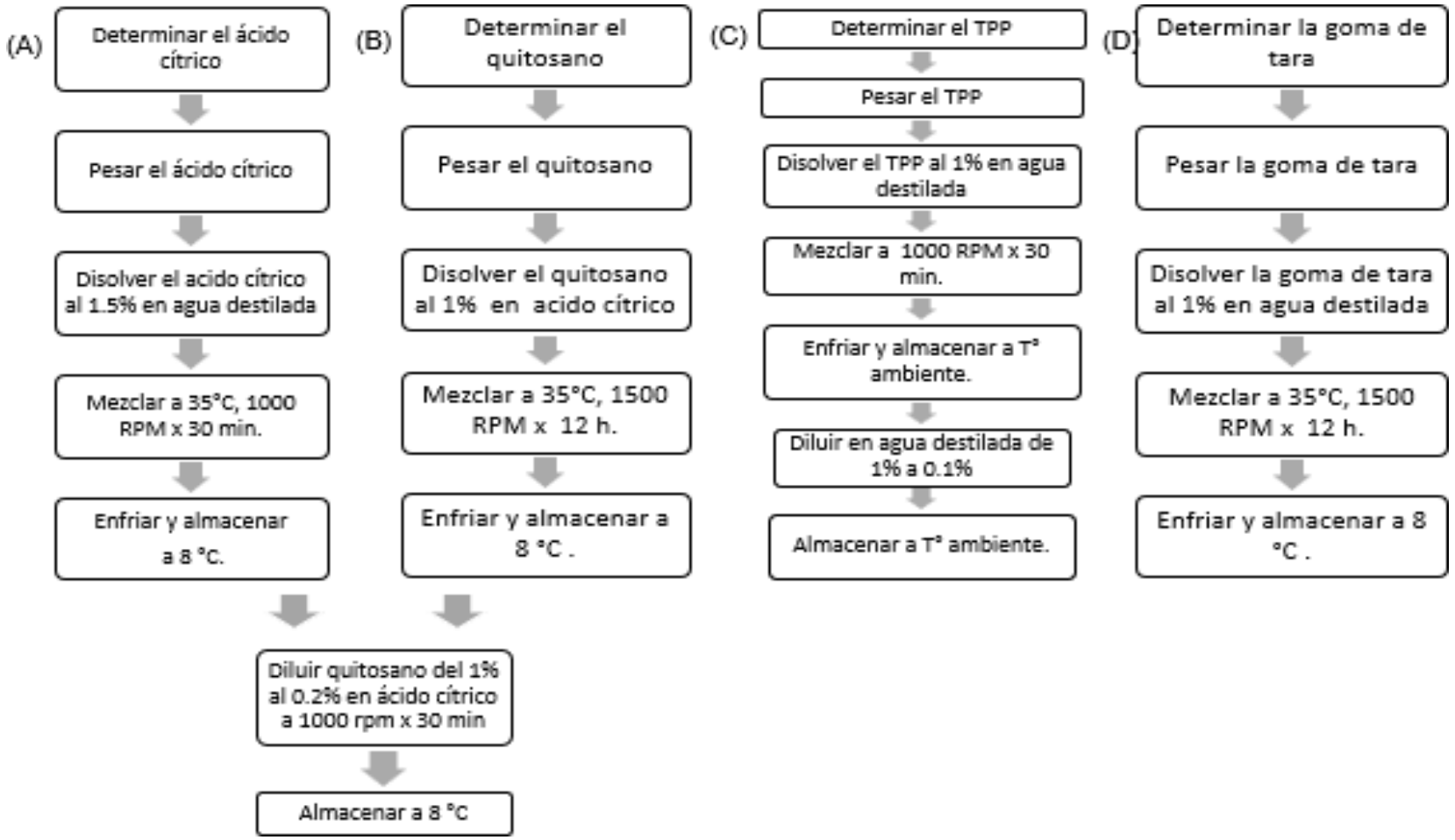


Figura 1. Flujograma de soluciones componentes.

FUENTE: Elaboración propia

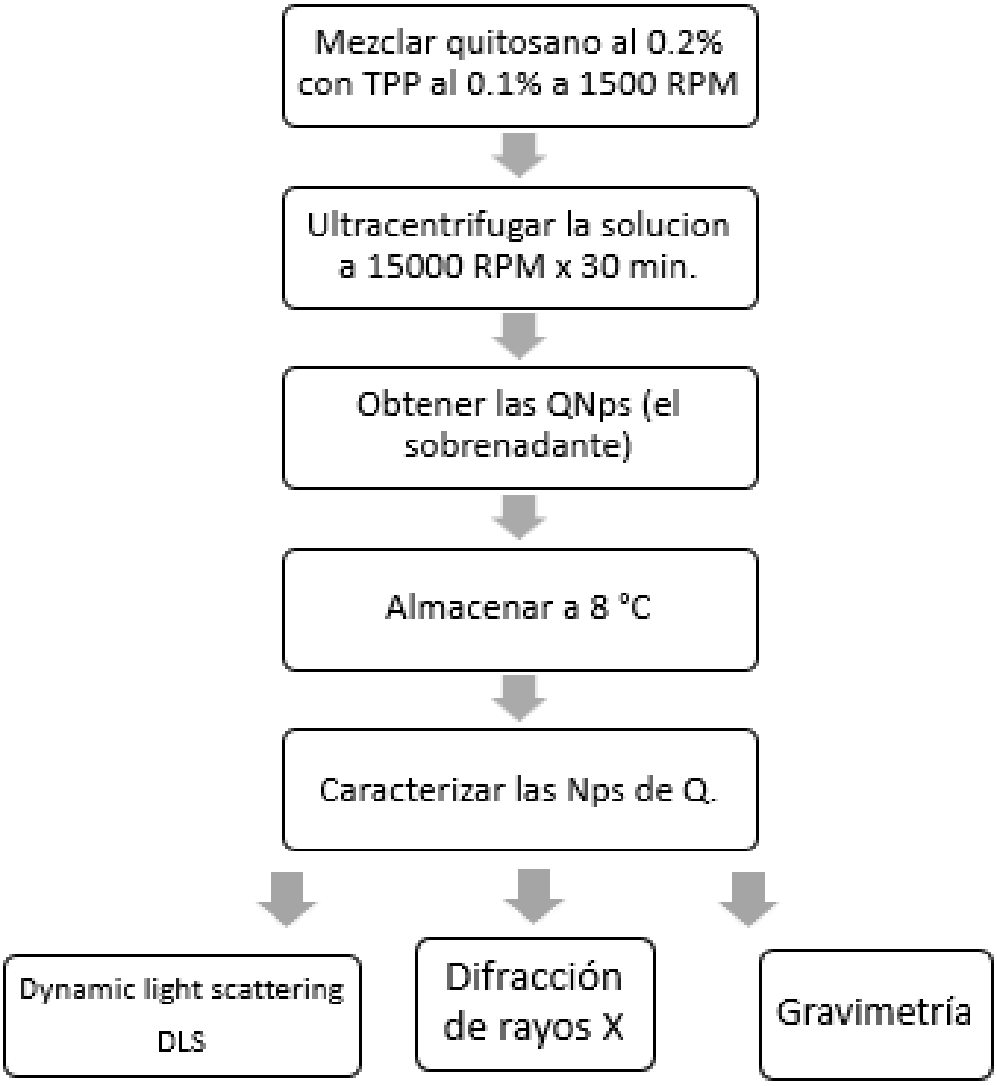


Figura 2. Flujograma de proceso de nanopartículas de quitosano

FUENTE: Elaboración propia

3.2.2. Producción del recubrimiento

La producción de los recubrimientos se realizó con las soluciones de quitosano al 1%, nanopartículas de quitosano al 1%, las cuales se obtienen con la misma metodología mencionada en la producción de las nanopartículas de quitosano (ver figura 2), además de las soluciones ya mencionadas se agregó un plastificante en solución al 1% de origen vegetal conocido como goma de tara el cual a continuación se detalla su producción.

3.2.2.1. Preparación de solución de goma de tara

Como plastificante se utilizó goma de tara; para la preparación de esta solución se pesó goma de tara en polvo, la cual fue diluida en agua destilada a 1500 rpm y 35° C por 12 h obteniéndose así una solución de goma de tara al 1% (p/v); el flujo del proceso de obtención lo podemos observar en la figura 2 (C).

3.2.2.2. Codificación de las soluciones

Las formulaciones que se realizaron contenían soluciones con concentraciones expresadas en porcentajes que se explican a continuación.

a. Quitosano (Q)

Se determinó quitosano al 1% como base estructural del recubrimiento, debido a que a concentraciones mayores al 2% en estudios anteriores demuestra su efectividad como agente antifúngico y no se pretendía que se le atribuya el efecto antifúngico al quitosano sino a las nanopartículas de quitosano.

b. Nanopartículas de quitosano (QNp)

Como agente antifúngico al 1%, debido a los resultados arrojados por el análisis gravimétrico.

c. Goma de tara (GT)

Se determinó al 1% para asegurar en el recubrimiento la propiedad de flexibilidad y así evitar su rotura.

d. Agua destilada (Ad)

Se determinó incluir solo agua destilada a una solución para poder utilizarla como testigo.

3.2.2.3. Formulación de los recubrimientos

En este paso se procedió con la mezcla de las soluciones compuestas por quitosano al 1%, goma de tara al 1% y nanopartículas de quitosano al 1%. Para poder evaluar sus efectos sobre la conservación del arándano (*Vaccinium myrtillus*), se trabajó con diferentes formulaciones que posiblemente podían cumplir con el objetivo del proyecto de investigación, la solución que obtuvo mayor efecto de inhibición fúngica se aplicó al fruto para evaluar su efecto en la conservación de la fruta. Se efectuaron cuatro formulaciones principales como posibles agentes antifúngicos y otras cuatro formulaciones como testigos.

a. Formulaciones principales

Las formulaciones principales tuvieron como componentes a las nanopartículas de quitosano, las cuales previamente se probó in vitro, en el laboratorio su efecto inhibitorio en los hongos para luego poder utilizarlas directamente en los arándanos.

Formulación 1

Esta formulación estuvo compuesta al 100% por nanopartículas de quitosano para poder probar su efecto inhibitorio en los hongos extraídos de arándanos.

Formulación 2

Esta formulación estuvo compuesta al 75% de nanopartículas de quitosano, 15% de quitosano y 10% de goma de tara.

Formulación 3

Esta formulación estuvo compuesta al 50% de nanopartículas de quitosano, 40% de quitosano y 10% de goma de tara.

Formulación 4

Esta formulación estuvo compuesta al 25% de nanopartículas de quitosano, 65% de quitosano y 10% de goma de tara.

b. Formulaciones testigo

Estas formulaciones por su mismo nombre indican que tuvieron como fin ser testigos frente a las formulaciones que incluía nanopartículas entre sus componentes.

Formulación 5

Esta formulación testigo tuvo un 90% de solución de quitosano al 1% y un 10% de solución de goma de tara al 1%.

Formulación 6

Esta formulación se constituyó 100% de solución de quitosano al 1%.

Formulación 7

Esta formulación testigo tuvo un 100% de solución de goma de tara al 1%.

Formulación 8

Esta formulación testigo tuvo un 100% de agua destilada.

Cuadro 4. Composición de las fórmulas y testigos

Formulaciones	% QNp	%Q	%Gt	%Ad
F1	100%	0%	0%	0%
F2	75%	15%	10%	0%
F3	50%	40%	10%	0%
F4	25%	65%	10%	0%
F5 (testigo)	0%	90%	10%	0%
F6 (testigo)	0%	100%	0%	0%
F7 (testigo)	0%	0%	100%	0%
F8 (testigo)	0%	0%	0%	100%

FUENTE: Elaboración propia

3.2.2.4. Preparación de recubrimientos de nanopartículas de quitosano a base de quitosano/goma De Tara

Habiéndose preparado las diferentes soluciones que componen los recubrimientos en función a sus formulaciones se procedió a elaborar recubrimientos de nanopartículas de quitosano combinadas con

quitosano y goma de tara. En un matraz se procedió a preparar 100 ml de solución por cada formulación, siendo mezcladas a 500 rpm agregando cada 30 min la solución de cada componente de la formulación. Una vez homogeneizadas, las soluciones se dejaron en reposo por un lapso de 24 h a 5 °C para descartar la presencia de burbujas de aire y así obtener finalmente los recubrimientos de nanopartículas de quitosano, tal y como se muestra en la figura 3.

Para comprobar el antagonismo con los hongos se procedió a elaborar películas a partir del recubrimiento líquido, es por ello por lo que se procedió a secar a 65 °C por 5 h, obteniéndose de esta manera películaslas cuales fueron cortadas en círculos de 5 mm con la ayuda de un perforador, almacenándolas a 25 °C +- 2 y con una humedad relativa del 53% (Navarro *et al*,2019).

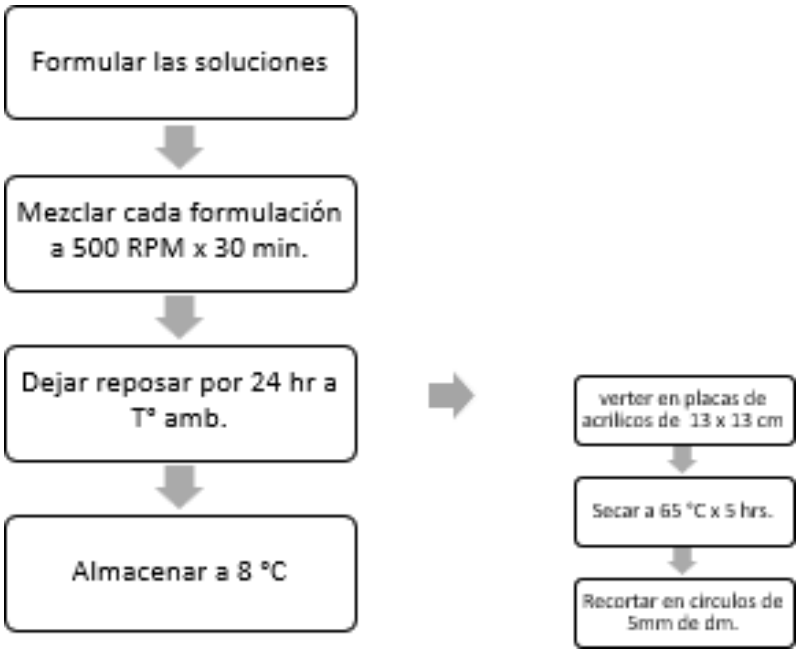


Figura 3. Flujograma de la elaboración del recubrimiento

FUENTE: (Elaboración propia)

3.2.3. Hongos utilizados para las pruebas in vitro

Las marchas que se emplearon en para el análisis microbiológico se basaronen la tesis de Zevallos (2017); el flujo del proceso de análisis microbiológico lo podemos observar en la figura 4.

3.2.3.1. Aislamiento de hongos a partir de arándano (*Vaccinium myrtillus*)

a. Preparación y adición de los materiales y sustancias a utilizar.

   Se preparó 15 gramos de agar PDA, calentándolo hasta obtenerlo completamente transparente, este caldo de 400 ml, se colocó en una autoclave junto con 500 ml de agua destilada, asas microbiológicas, todo esto se esterilizó a 121 °C por 15 min a 1 atm después de 45 min, aproximadamente se retiró de la autoclave y el agar se colocó en el equipo de baño maría para esterilizar manteniendo su estado líquido a una temperatura de 55 °C.

b. Selección del arándano con evidente proliferación de hongos en su superficie.

   Se obtuvo arándano directo del campo luego se seleccionó el arándano que evidenció tener en su superficie algún daño por un hongo, el cual se manipuló con guantes de látex y colocó en bolsas de plásticos con hielo para su conservación dentro de una caja térmica (cooler).

c. Desafección y lavado de arándanos.

   Se preparó una desinfección del arándano seleccionado, con hipoclorito de sodio al 1 %, alcohol al 75 % y 500 ml de agua destilada

estéril. Fue necesario esterilizar 5 vasos precipitados de 250 ml, agua destilada, pizas, placas Petri, porta bisturí.

d. Sembrado de hongos de arándanos en agar

El arándano que se desinfectó, pasó a ser cortado con un bisturí estéril un área de 1 cm^2, esta superficie se aplicó en el agar PDA, previamente habiendo adicionado penicilina de 200 000 ul por 200 ul, para evitar la proliferación de bacterias.

e. Proliferación de hongos.

La proliferación se dio de 5 a 7 días, pero se debió tener en cuenta esta información debido a que algunos hongos, crecen más rápido que otros. Una vez hubieron proliferado se pusieron en refrigeración para conservarlos y evitar su deterioro.

f. Purificación y conservación de los hongos

Una vez que se visualizó macroscópicamente el crecimiento de los hongos**,** se purificaron dos veces para asegurar la limpieza y conservación del hongo. Tomando con una espátula de Drigalski una porción mínima del medio de cultivo purificado, dejando por el mismo tiempo a temperatura ambiente logrando que el hongo prolifere.

g. Sembrado y conservación de hongos.

Se aplicó agar PDA en tubos de 100 ml y se puso en la autoclave para esterilizar a una temperatura de 121 °C. por 15 min y 1 atm. Una vez enfriados se inclinaron con cuidado hasta que el agar solidificó. Se preparó la cámara de trabajo estéril para sembrar de las placas a

los tubos, siendo flameadas las bocas de los tubos e introduciendo con cuidado la muestra de hongo en los tubos.

3.2.3.2. Antagonismo de hongos de arándano con el recubrimiento.

a. Inhibición de hongos.

Las soluciones se dispersaron en 5 µl sobre círculos de 5 mm de diámetro de papel filtro simple, debidamente esterilizadas en una autoclave a 120 °C por 15 min, previamente. Posteriormente los círculos impregnados de las formulaciones y testigos se procedieron a secarlos en la estufa a 60 °C por 24 h para luego proceder a realizar el mismo procedimiento de impregnación para potenciar el efecto inhibitorio que se intentó probar en los cuatro distintos hongos.

Se procedió a realizar la distribución de los discos con las formulaciones impregnadas y preliminarmente tratados para poder comprobar el efecto inhibitorio que tendrían las diferentes formulaciones sobre los hongos realizando la siembra de los hongos en el centro de las placas con PDA de la misma forma los discos fueron colocados con un intervalo de espacio de 2 cm desde el centro en donde se sembró el hongo hacia el exterior y un espacio de 3 cm entre los discos por lo que se colocaron 4 circunferencias impregnadas en cada placa, dos formulaciones y dos testigos en cada una. Se procedió a revisar las placas cada 3, 5 y 7 días después de haber realizado este procedimiento. El experimento se replicó 4 veces.

3.2.3.3. Identificación de los hongos de arándano.

a. Identificación los hongos por su género con la ayuda de una clave dicotómica.

Se identificaron los hongos de las placas, con ayuda del microscopio y la clave dicotómica como guía, para determinar el género.

b. Extracción de ADN mediante un proceso para cada hongo seleccionado.

Solución lisis:

- Se pesaron en la balanza 0.03 g. de la muestra.
- La muestra se pondrá en un microtubo.
- Se vertió 600 µl de la solución lisis.
- Se homogenizó con el micromacerador.
- Se puso 10 min. en la máquina de baño María a 75°C.
- Se sacó el microtubo y se enfrió por 5 min.
- Una vez frío se vertió 700 µl de cloroformo.
- Luego se mezcló en el agitador vórtex por 20 s.
- Se hizo reposar (decantar) por 5 min.
- Se puso a centrifugar por 5 min.

Solución de precipitación:

- En un microtubo nuevo se vertió 900 µl de agua destilada.
- 100 µl de solución de precipitación se adicionó.
- Se sacó la solución lisis (primer tubo) de la centrifugadora y se obtuvo tres etapas (ADN, tejido o contaminante, cloroformo).

- Del ADN se sacó 200 µl de solución con mucho cuidado y se adicionó la solución de precipitación.
- Se incubó a baño María a 75 °C por 5 min.
- Se dejó enfriar.
- Se centrifugó por 10 min.
- Se vació el líquido en un frasco.
- Luego el resto se echó en un papel absorbente por 1 min.

Solución del disolvente:

- A esa misma muestra se vertió 150 µl de la solución disolvente e incubar a baño María a 75 °C por 5 min.
- Se enfrió y se sometió a vórtex por 20 s.
- Se centrifugó y de la muestra se extrajo 150 µl y se mezcló con 300ul de etanol absoluto.
- Se mezcló a vórtex por 20 s.
- Se centrifugó por 5 min.
- Se obtuvo un sobre nadante en la superficie del microtubo.
- En la parte inferior estuvo una telita o botón llamado PELLET – ADN.
- Luego se eliminó el sobrenadante y se puso boca abajo por 10 min sobre papel absorbente.
- Se adicionó 300 µl de agua pura y se puso a baño María por 5 min.
- Se utilizó el vórtex para homogenizar por 20 s.
- Se congeló la muestra y se conservó.
- Se amplificó y se mandó a secuenciar utilizando primer.

c. Determinación de la especie microbiana

Para la identificación de los hongos, se realizó una PCR utilizando el iniciador o primer de la región Espaciadora Transcriptora Interna (ITS).

Cuadro 5. Primer usados para la identificación de hongos

Organismos	Primer	Dirección	Secuencia (5' – 3')	Referencia
Hongos	ITS1	Forward	TCCGTAGGTGA ACCTGCGG	White et al. (1990)
	ITS4	Reverse	TCCTCCGCTTA TTGATATGC	

FUENTE: (Elaboración propia)

Cada reacción se realizó en un volumen final de 25 µl con los siguientes componentes: 2.5 µl de Taq Buffer (10 X), 0.5 µl de dNTP (10 mm), 0.6 µl de cada primer ITS1 e ITS4 (15 pm), 2.5 de MgCL2 (25 mm), 0.1 ul de Taq DNA polimerasa (5 U/µl) 1 µl de ADN para el hongo y 2 µl para bacterias. Las condiciones de amplificación para hongos están descritas en el cuadro 6. Los productos fueron secuenciados e identificados utilizando el software de la herramienta de búsqueda y alineamiento local básico (BLAST). Luego los hongos aislados identificados, fueron conservados en medio LB y congelados en CryoCare a -80 °C (Cornejo, 2016).

Cuadro 7. Condiciones de PCR para la amplificación de la región Espaciadora Interna ITS en la identificación de los hongos.

Etapa	Temperatura	Tiempo	#Ciclos
Desnaturalización inicial	94°C.	6 min.	1
Desnaturalización	94°C.	30 s.	35
Alineamiento	54°C.	45 s.	
Extensión	72°C.	45 s.	
Extensión final	72°C.	5 min.	1

FUENTE: (Elaboración propia)

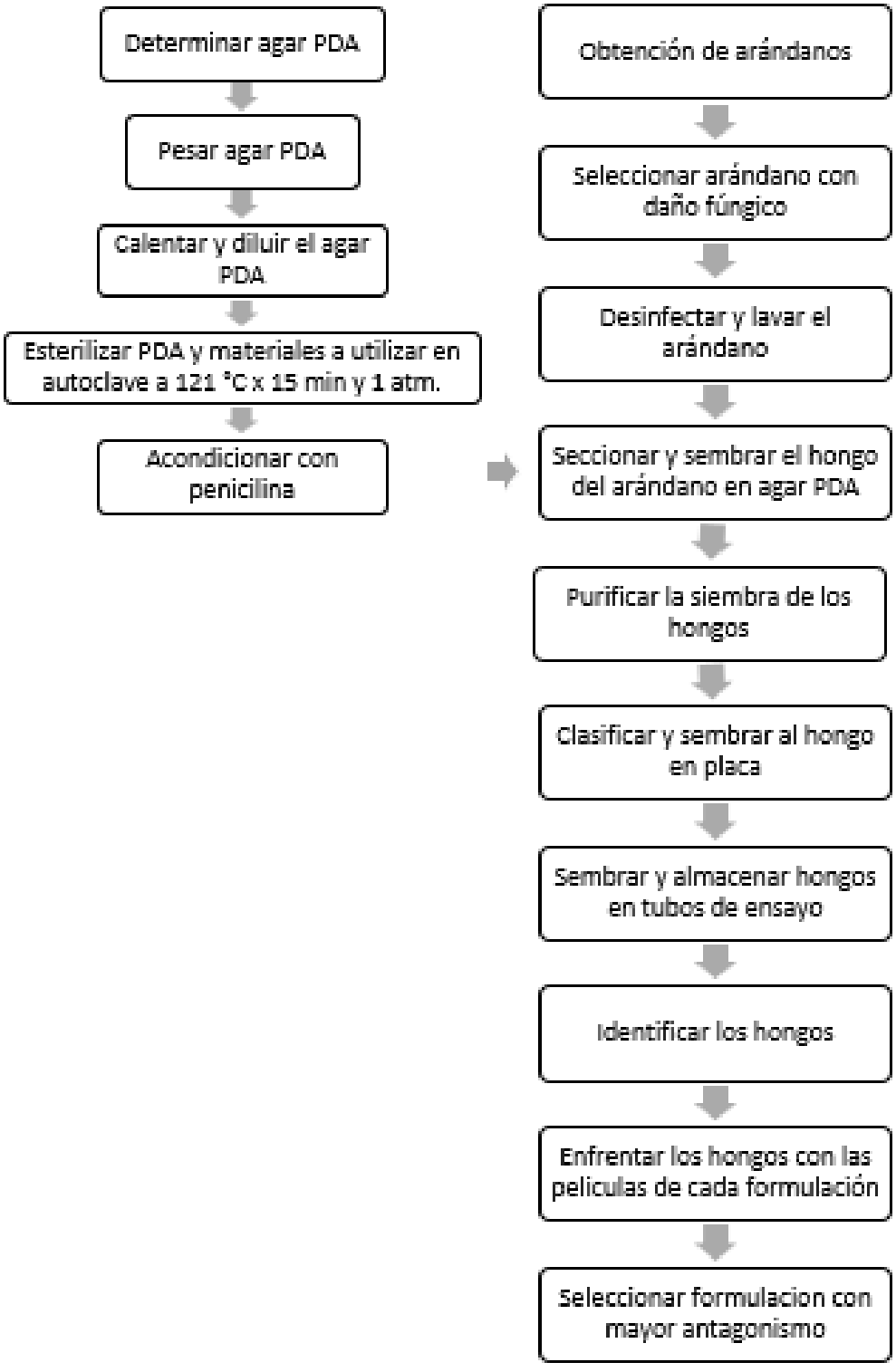


Figura 4. Flujograma del análisis microbiológico

FUENTE: (Elaboración propia)

3.2.4. Prueba del recubrimiento en arándanos

Los pasos que se siguieron para realizar las pruebas a los arándanos con el recubrimiento investigado se explican a continuación y lo podemos ver resumido en la figura 5.

3.2.4.1. Obtención del arándano (*Vaccinium myrtillus*)

La materia prima consistió de 1 kg de arándano *(Vaccinium myrtillus)* fresco de exportación, mediante la compra a un fundo que exporta arándano hacia USA en el departamento de La Libertad, con características óptimas de madurez fisiológica para exportación en cuanto a color, tamaño, textura suave y firme, sin daño físico ni daño microbiológico aparente, considerándose la contaminación por el ambiente en donde se han desarrollado.

3.2.4.2. Selección del arándano

La selección de la fruta se realizó en el laboratorio Forestal y Medio Ambiente, por la adecuada infraestructura y la factible utilización de equipos y materiales para la ejecución de esta etapa, con la finalidad de llevar un control del producto en lo que se refiere al estudio del recubrimiento**.** Se formaron 3 muestras de 5 arándanos cada una para cada día**.** Los arándanos escogidos tenían las características lo más similares posible en relación con su tamaño y forma.

3.2.4.3. Aplicación del recubrimiento al arándano

Los arándanos fueron cubiertos por una capa de nanopartículas mediante la aspersión de la solución con la formulación 3, se colocaron 15 arándanos en cada placa Petri, 2 repeticiones y 1 testigo para poder llevar un mejor control del ensayo, estos se colocaron en placas Petri

esterilizadas y se almacenaron a temperatura de refrigeración (4 °C) por un tiempo de 15 días Luchsinger (2017), con una humedad relativa. Previo al almacenamiento se evaluó los parámetros iniciales, y después se estableció evaluar el fruto a los días 4, 8, 12 y 15 días de almacenamiento.

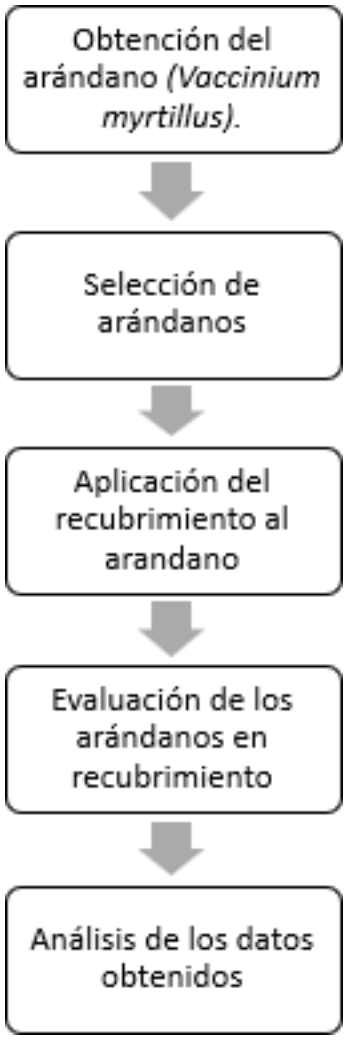


Figura 5. Flujograma de prueba del recubrimiento en arándanos

FUENTE: (Elaboración propia)

3.2.4.4. Evaluación de los arándanos con recubrimiento

Durante el período de 15 días, se evaluaron los parámetros de pérdida de peso, pH, sólidos solubles (°Brix), firmeza e imágenes hiperespectrales, de los arándanos con recubrimiento.

a. Peso

Se determinó por lectura en una balanza digital marca Sartorius modelo Entris 224I-1S, con una precisión de 0.0001 g (norma INCOTEC 756). Se realizó la pesada de forma diaria con 3 repeticiones desde el día 0 hasta el día 15.

b. Sólidos Solubles

Se determinó a partir del zumo de 20 frutos por tratamiento, midiendo los grados °Brix, en un refractómetro marca KRÜSS modelo DR 301-95.

c. pH

Este parámetro se determinó con el potenciómetro. La medida se realizó según lo descrito por la norma (AOAC 945.10), se tomó una muestra de 4 ml. de zumo y se introdujo el potenciómetro para obtener la medida.

d. Imágenes Hiperespectrales

Esta medida se realizó en el laboratorio de operaciones de la Universidad Nacional de Trujillo. Se utilizó el espectrómetro de imágenes hiperespectrales Headwall Photonics G4-389 para obtener las imágenes espectrales de los arándanos durante 15 días, para su procesamiento y análisis en el software Matlab 2019.

3.2.4.5. Análisis de los datos obtenidos

Los resultados de los parámetros obtenidos durante los 15 días de experimentación fueron procesados en el software estadístico Minitab 17.0 en el cual, mediante un análisis de varianza ANOVA se determinó la influencia de los factores en las variables de salida. Posteriormente, mediante una prueba Tukey, se determinó la magnitud de las diferencias de los resultados obtenidos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de nanopartículas de quitosano

Mediante la metodología de gelificación iónica se obtuvo las nanopartículasde quitosano utilizando el 0.1 % de tripolifosfato (TPP) y quitosano en 0.2 %. Castro (2014, p. 22) afirma que estos grupos amino protonados convierten al quitosano en un poli catión capaz de interactuar con el TPP, una molécula aniónica multivalente, a través de interacciones electrostáticas. Aprovechando el alto peso molecular del quitosano, se contó con mayor número de cargas positivas. Estas pueden interaccionar con las cargas negativas del TPP que según Calderón (2015, p. 52) mejora la eficiencia delmétodo de gelificación iónica para la obtención de nanopartículas. Posteriormente se secó a vacío la formulación obtenida para transformarla en un polvo blanco.

De acuerdo con Calderon (2015), el método de gelación iónica es un método ampliamente usado para la preparación de nanopartículas de quitosano. También se le conoce como reticulación iónica, este es generado por una auto agregación entre el quitosano o sus derivados y macromoléculas de carga opuesta, o cuando existe un agente reticulante. Además, afirma que entre las ventajas de este método cabe destacar que evita el uso de altas temperaturas, solventes orgánicos o procesos drásticos como la sonicación, que unido a la naturaleza poli catiónica del quitosano les confieren a estas sustancias, la capacidad para asociar de forma eficiente y preservar la estabilidad y bioactividad de macromoléculas terapéuticas contra su degradación.

4.2. Caracterización de nanopartículas de quitosano

4.2.1. Gravimetría

Al aplicar este método se obtuvo un porcentaje de nanopartículas dentro de la solución cercana al 1% para ser más exacta fue 99.9088%**,** los cálculos a continuación.

$$H\ \% = \frac{33.7524 - (33.7533 + 0.9877)}{0.9877}$$

$$H\ \% = 99.9088$$

(a) (b) (c)

Figura 6: Caracterización de nanopartículas de quitosano por Gravimetría.

(a) Peso de la placa, (b) peso de muestra de la solución de QNp y (c) peso final de la solución de QNp sometida a la estufa al vacío.

4.2.2. Difracción por rayos X

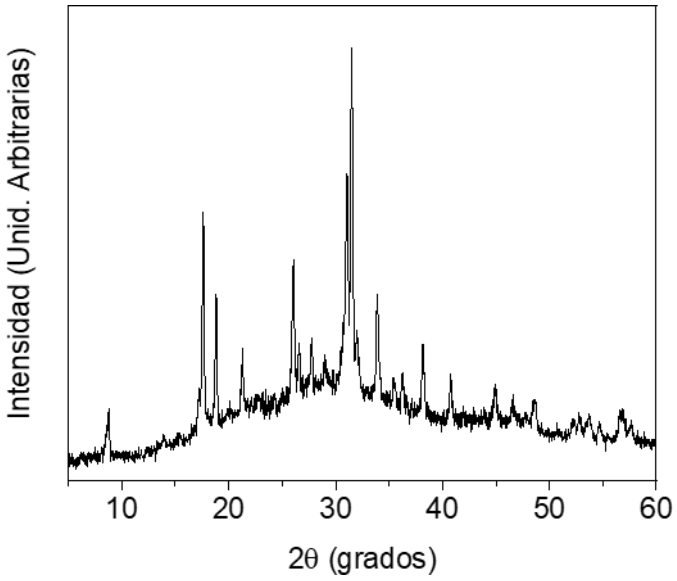


Figura 7. Caracterización de nanopartículas de quitosano por DRX.

De acuerdo con Xie et al (2013) la presencia de área de picos centrado a 22° 2θ se les asigna a cadenas de quitosano alineadas a través de interacciones moleculares. Además, Lamarra et al (2017) indica que la presencia de los picos cercanos al 22° 2θ se les puede atribuir a la presencia de compuestos cristalinos como TPP, que han sido desplazados debido a la presencia de goma de tara (Cevallos, N. & Medina, D., 2019).

4.2.3. Dynamic light Scattering (DLS)

Luego de secar a vacío la formulación de nanopartículas de quitosano, se obtuvo un polvo blanco. En el Cuadro 7 se muestra las características de diámetro y potencial Z.

Cuadro 7: Caracterización con DLS de las nanopartículas de quitosano.

Parámetros / Días	Día 1	Día 30
Diámetro	13647.6 nm	49840.2 nm
Potencial Z	0.00	0.00

Como se puede apreciar en el Cuadro 7, los resultados del diámetro para el día uno como el día treinta, muestran valores bastante elevados, y una tendencia a incrementar en el tiempo. Estos valores contrastan la investigación de Calderón (2015) en la que se afirma que el rango de tamaño de las nanopartículas es de 120 nm a 252 nm. Se considera que estos valores elevados de diámetro se deben a la capacidad higroscópic a de las nanopartículas y la relación quitosano/TPP.

Jang y Lee (2008), afirman que cuando el quitosano y el TPP se mezclan en la solución acuosa de ácido acético, se forma espontáneamente nano complejos compactos con una carga superficial total positiva, y la densidad de la carga superficial se ve reflejada en los valores de potencial Z.

De acuerdo con Hunter (2013), el potencial Z es una herramienta importante para el entendimiento del estado de la superficie de las nanopartículas y predice la estabilidad y bioactividad de macromoléculas terapéuticas contra su degradación. Además, Hartig (2007), concluyó que el rango el potencial zeta estable en suspensión acuosa ha sido empíricamente definido como mayor de +/- 30 mV. Lo propuesto por los autores pueden explicar también las altas medidas de diámetro obtenidas, ya que al contar con un potencial Z de más cero, se puede

considerar que estas no son muy estables y tienden a formar aglomerados.

4.3. Elaboración de recubrimientos de nanopartículas de quitosano a base de quitosano/goma De Tara

A partir del polvo blanco de nanopartículas de quitosano se elaboró las 8 formulaciones a base de quitosano/goma de tara de acuerdo con el Cuadro 4. El resultado se puede observar en la figura 8.

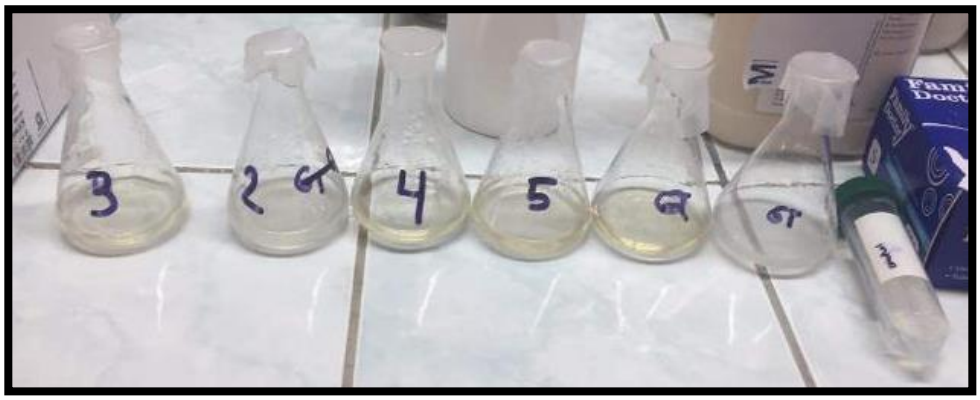


Figura 8. Formulaciones de nanopartículas de quitosano

La adición de goma de tara al quitosano permitió obtener recubrimientos con propiedades mecánicas más estables. Según Kester y Fennema (1986) los recubrimientos digeribles vienen siendo una gama variada de diferentes sustancias como carbohidratos, proteínas y lípidos en combinación con otras o con una sola sustancia en su formulación. Además, García (2008) afirma que igualmente podrían desarrollarse a partir de componentes amigables con el medio ambiente “como almidones, ceras, gel, entre otros”. Asimismo, Bósquez (2007) argumenta que las películas de polisacáridos poseen características muy favorables como barrera a los gases además de su poder de fijación a la forma irregular de productos hortofrutícolas.

4.4. Identificación de los hongos.

Mediante el proyecto de la Universidad Nacional de Tumbes “Recubrimientos basados en quitosano de alto peso molecular derivado de pluma de pota *(Dosidicus gigas)*, nanopartículas de quitosano ZnO para inhibir los microorganismos que atacan la fruta de exportación en el Norte del Perú y su efecto sobre la vida útil” se determinaron los hongos extraídos de los arándanos, teniendo como resultado lo siguiente.

Cuadro 8. Especies de hongos identificadas extraídas de arándano

Especie identificada	Tamaño de la secuencia (nucleótidos)	Porcentaje de identidad (%)
Alternaria alternata	539	100.00
Exserohilum rostratum	563	100.00
Alternaria longipes	543	100.00
Fusarium solani	539	100.00

4.5. Medición de poder antifúngico.

Una vez obtenidas las formulaciones se pasa a medir su poder antifúngico, colocándolas en placas Petri cultivadas previamente con *Alternaria alternata*. Los resultados se pueden observar en la Figura 9, donde podemos apreciar que la formulación 2 presentó mayor retardo de crecimiento microbiano. Llegándose a concluir que la concentración óptima para el recubrimiento sería la que presenta un porcentaje del 75% de nanopartículas de quitosano.

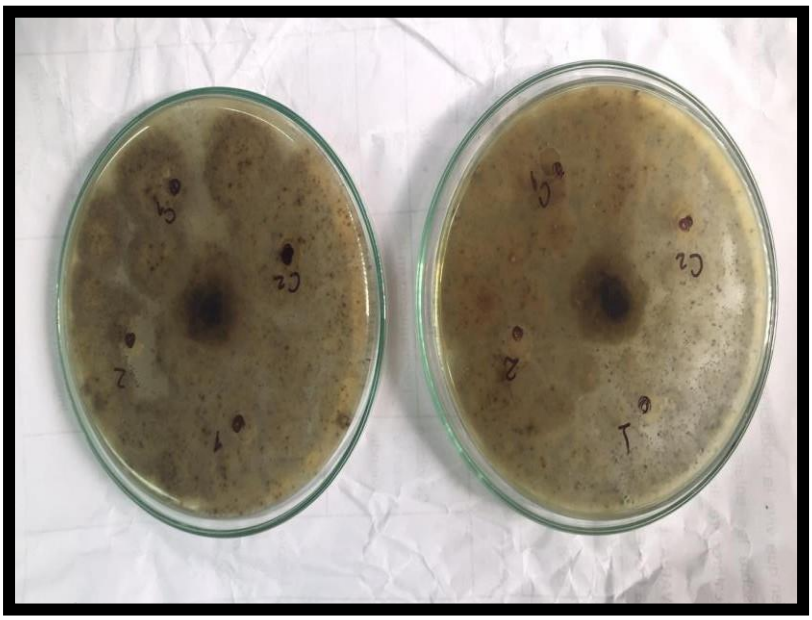


Figura 9. Efecto del retardo microbiano in vitro

(1) Formulación 1, (2) formulación 2, (C_1) quitosano al 1%, (C_2) agua.

En el presente estudio, las nanopartículas de quitosano tuvieron un efecto inhibitorio significativo (p-valor <= 0.05) sobre el crecimiento micelial de *Alternaria alternata*, porque su desarrollo fue el óptimo a comparación de otras, las formulaciones de nanopartículas de quitosano 1 (66%), 2 (73%), 3 (65%), 5 (40%), 6 (35%) y 7(41%) mostraron una inhibición del hongo con respecto al testigo. Según Bautista-Baños et al. (2003) el uso de sustancias naturales como quitosan (polimero de glucosamina y N-acetilo glucosamina), extractos vegetales y aceites esenciales, representan una alternativa importante para el control de hongos fitopatógenos. Además, Cruañes y Locaso (2011) afirma que los recubrimientos a base de quitosano retienen la acidez, resultando ser eficaz contra la acción del microbiota evidenciando un aumento del 65% a 69% en función al testigo, resultado semejante al de la presente investigación.

4.6. Conservación del arándano en función de sus características fisicoquímicas.

4.6.1. Variación de grados Brix.

La Figura 10 nos muestra la distribución de la media de los valores de °Brix durante el tiempo de almacenamiento. Pudiéndose rescatar que no existe una tendencia marcas de que ninguno de los dos presentes valores mayoreso menores con respecto al otro.

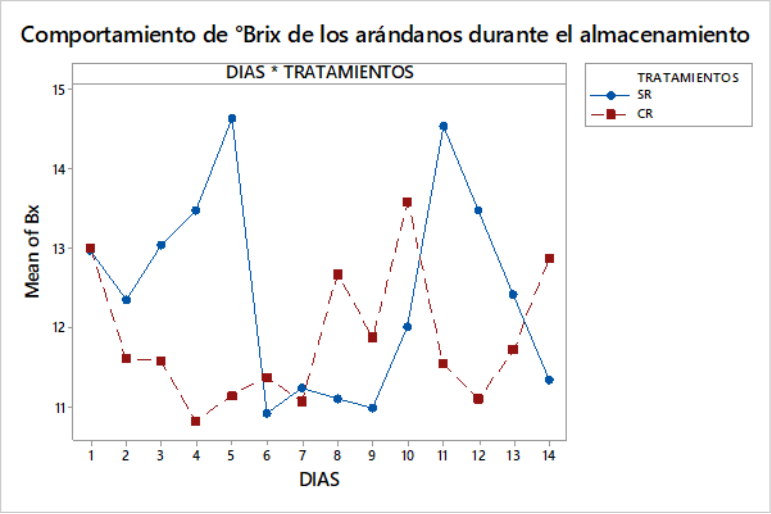


Figura 10. Comportamiento de los °Brix de las muestras de arándanos durante el almacenamiento.

En la Figura 10 podemos observar los valores promedios que tuvieron las medidas de °Brix durante el tiempo de almacenamiento, pudiendo observar que los valores se encuentran entre los valores de 10 y 15 °Brix. Resultado que concuerda con lo propuesto por Buzeta (1997) que concluyó que los rangos de sólidos solubles totales de frutos maduros deben estar entre 10 y 15 °Brix en arándanos frescos. Sin embargo, los resultados que obtuvo Vasquez (2019) para arándano recubierto con aloe vera muestran rangos de 14.67 y 15.67 °Brix, hecho que en cierta parte contrasta lo obtenido en la

presente investigación, ya que los datos obtenidos en mayor parte no se encuentran dentro de este rango. Esto se puede dar debido a que ambos estudios presentan arándanos con diferentes índices de maduración durante la realización de los experimentos.

Cuadro 9. Análisis de varianza (ANOVA) para °Brix de las muestras de arándano

V. ENTRADA	GL	ADJ SS	ADJ MS	F	p- Value
DIAS	13	30.840	2.372	0.79	0.664
TRATAMIENTOS	1	7.802	7.802	2.61	0.111
ERROR	69	206.195	2.988		
FALTA DE AJUSTE	13	60.435	4.649	1.79	0.068
ERROR PURO	56	145.759	2.603		
TOTAL	83	244.8360			

El Cuadro 9 nos muestra el análisis de varianza (ANOVA) para la variable °Brix, los días de almacenamiento y los tratamientos aplicados sobre el arándano. Este Cuadro nos muestra que ni los días de almacenamiento ni aplicados al arándano resultaron tener una influencia significativa en los °Brix del arándano. Resultado que corrobora lo expuesto por Costantini (2018) que no encontró diferencias significativas para los valores de sólidos solubles totales (°Brix) para fresa con y sin recubrimiento a base de nanopartículas de quitosano. Además, Cruañes y Locaso (2011) encontraron que la aplicación de recubrimientos de quitosano biodegradables sobre arándanos no influye de manera significativa en los sólidos solubles totales.

4.6.2. Variación del pH

Tal como se muestra en la gráfica de la Figura 11, los datos de pHdurante el tiempo de almacenamiento para ambos tratamientos no mostraron una tendencia de superioridad o inferioridad con respecto a los valores de las distintas muestras. Estos resultados tienen relación con lo encontrado por Galleta et al. (1990) que encuentran valores de pH para arándanos de entre 3.0 y 3.4.

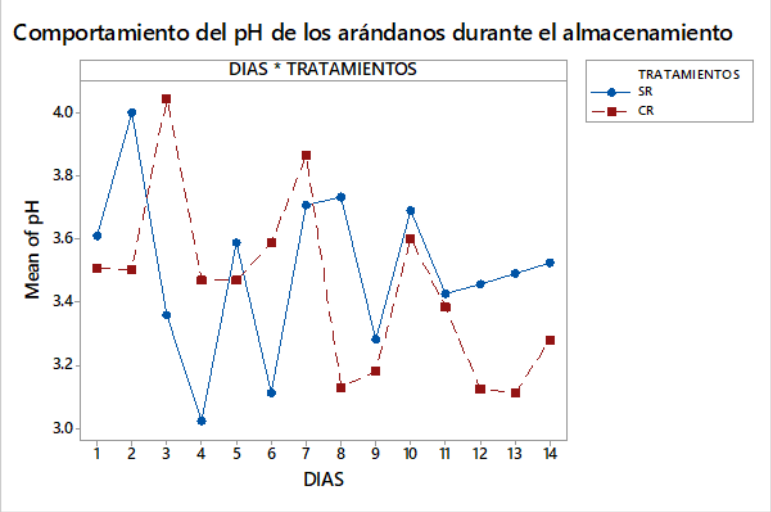


Figura 11. Comportamiento del pH de los arándanos durante el almacenamiento

La Figura 11 nos muestra el comportamiento que tuvo el análisis de pH durante el tiempo que permanecieron almacenadas. Pudiéndose observar que no existe una tendencia marcada de disminución o aumento durante el almacenamiento. Estos resultados se contrastan con la investigación de Restrepo y Aristizábal (2010) que argumentan que el aumento de los valores de pH durante el almacenamiento demuestra el proceso de senescencia del producto, además se menciona que el aumento del pH tiene que ver con los procesos de reblandecimiento, coloración, entre otros vinculados con la maduración.

Cuadro 10. Análisis de varianza (ANOVA) para pH de las muestras de arándanos

V. ENTRADA	GL	ADJ SS	ADJ MS	F	p- Value
DIAS	13	2.7761	0.21352	1.32	0.221
TRATAMIENTOS	1	0.0610	0.061	0.38	0.541
ERROR	69	11.1270	0.16126		
FALTA DE AJUSTE	13	2.7679	0.21292	1.43	0.177
ERROR PURO	56	8.3590	0.14927		
TOTAL	83	13.9640			

El Cuadro 10 nos indica el análisis de varianza (ANOVA) hacia el pH de los grupos de arándanos. Este Cuadro nos revela la ausencia de influencia significativa de las variables estudiadas sobre el pH, ya que los valores de p son 0.05. Este resultado corrobora lo encontrado por Vásquez (2019) que al aplicar “recubrimientos en base de penca sábila con cera de abeja” sobre el arándano sus resultados no mostraron significancia (p-valor=0.6592) sobre los valores de pH obtenidos en el estudio. Igualmente, los resultados de Abanto (2018) encontraron una diferencia mínima entre los valores de pH de arándanos recubiertos con miel de abeja y arándanos recubiertos con quitosano. Estos resultados nos pueden indicar que el pH puede estar siendo influenciado por otras variables como el índice de madurez, ambientes agronómicos y operaciones postcosecha (Vásquez, 2019).

4.6.3. Variación del peso

En la Figura 12 se puede observar que la variable % pérdida de peso disminuyó en función al paso de los días que permanecieron almacenados frente a los arándanos que no tenían tratamiento. Distinguiéndose en comparación de las muestras de arándano recubiertas con recubrimientos comestibles, cuyos resultados son menores.

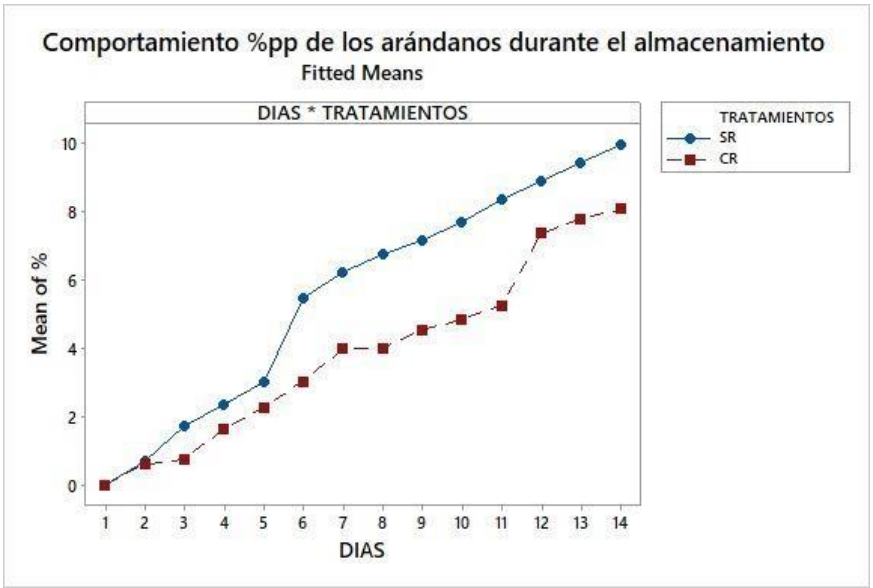


Figura 12. Comportamiento de la %pp de las muestras de arándano

Gómez et al. (2002) argumenta que la merma de peso en el fruto podría darse por el intercambio de gases a lo largo del proceso de respiración y transpiración los que reducen el contenido de agua. Tal como se puede apreciar en la figura 12, el aumento del % de pérdida de peso demuestra que durante el almacenamiento hubo una pérdida de agua debido al intercambio de gases durante la transpiración de la fruta.

Cuadro 11. Análisis de varianza (ANOVA) para % pérdida de peso (%pp) de las muestras de arándanos

V. ENTRADA	GL	ADJ SS	ADJ MS	F	p- Value
DIAS	13	703.49	54.115	12.72	0.000
TRATAMIENTOS	1	60.26	60.261	12.38	0.001
ERROR	69	281.63			
FALTA DE AJUSTE	13	21.05	0.35	0.34	0.980
ERROR PURO	56	260.59			
TOTAL	83	1045.38			

El Cuadro 11 nos muestra el análisis de varianza (ANOVA) de la variable %pp y las variables de entrada días y tratamientos. Obteniendo como resultados que ambas variables de entrada influyen significativamente en la variable de %pp.

Abanto (2018) obtiene en su estudio que los arándanos recubiertos con quitosano presentaron menor peso final que los recubiertos por cera de abeja, es decir, el quitosano solo como recubrimiento no cumple de manera efectiva como barrera permeable para vapor de agua.

Moncayo et al. (2016) reporta que el aditamento de ceras y lípidos optimizan las características de barrera de recubrimientos elaborados con proteínas, logrando la prolongación de la vida de anaquel mediante la reducción de la merma de peso. Según Dhall (2013) en general, recubrimientos a base de polisacáridos presentan barreras de vapor de agua. Sin embargo, Chocano (2009) afirma que el componente goma de tara es altamente hidrófila, lo que conlleva a que retenga gran cantidad de agua. Lo propuestopor los anteriores autores se corrobora con lo encontrado en esta investigación, ya que a pesar de haberse demostrado que la aplicación de recubrimiento si influye significativamente en la pérdida de peso podemos observar en la figura 10 que la diferencia no es amplia. Lo que asiente que ni las nanopartículas de quitosano, quitosano y goma de tara son barreras muy efectivas en la transferencia de vapor de agua.

4.6.4. Variación de la firmeza

Los valores obtenidos para firmeza muestran una ligera mejora de la firmeza en los arándanos recubiertos con los recubrimientos de nanopartículas de quitosano con base en quitosano y goma de tara.

La figura 13 nos muestra las medias de los valores de firmeza obtenidos durante el tiempo de almacenamiento. Pudiéndose observar que los valores de los arándonos recubiertos son mayores que los arándanos sin recubrir. Pero, esta diferencia se mantiene hasta el día 7, luego los valores obtenidos fueron igual o menores a los arándanos sin recubrir. Resultados que se corroboran con la investigación de García et al. (2001) que al añadir glicerol como plastificante en recubrimientos comestibles a base de almidón para su aplicación en frutillas, estas mejoraron sus propiedades de resistencia mecánica.

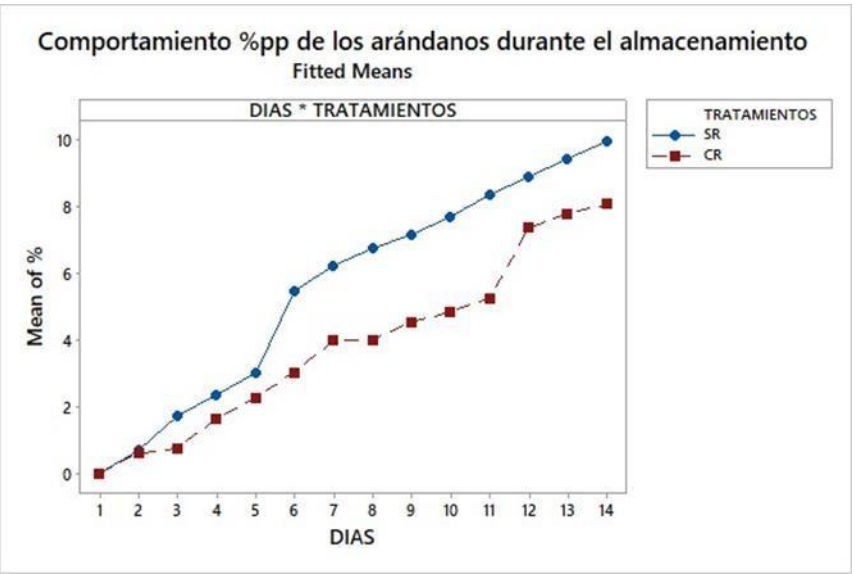


Figura 13: Comportamiento de firmeza de las muestras de arándonos durante el almacenamiento

De acuerdo con Martínez (2010) la aplicación de recubrimientos a base de quitosano da resultados positivos con respecto a la firmeza y control de podredumbres. Hecho que se corrobora con la Figura. 11 en la que se muestra la significancia de los tratamientos sobre la firmeza del arándano durante los días de almacenamiento.

Cuadro 12. Análisis de varianza (ANOVA) para firmeza de las muestras de arándanos

V. ENTRADA	GL	ADJ SS	ADJ MS	F	p- Value
DIAS	13	10759	827.6	1.66	0.089
TRATAMIENTOS	1	2884	2883.9	5.8	0.019
ERROR	69	34315	497.3		
FALTA DE AJUSTE	13	7229	556.1	1.15	0.340
ERROR PURO	56	27086	483.7		
TOTAL	83	47958			

Cabe recalcar que el valor de significancia para la variable días no resultó significativo. Se cree que este resultado se debe a que el tiempo de almacenamiento se realizó en condiciones de refrigeración (4°C) lo que permitió conservar mejor el arándano. Núñez-Barrios et al. (2005) coincide en las conclusiones de su investigación, afirmando que el almacenamiento a temperaturas inferiores a la del medio ambiente, tiene repercusiones en términos de firmeza, pérdida de peso y velocidad de respiración.

4.7. Imágenes Hiperespectrales

Para determinar cuáles son los componentes principales se realizó la prueba PCA y se trabajó en las longitudes de onda de entre 900 y 1700 nm. Este proceso se realizó durante los 12 días de almacenamiento.

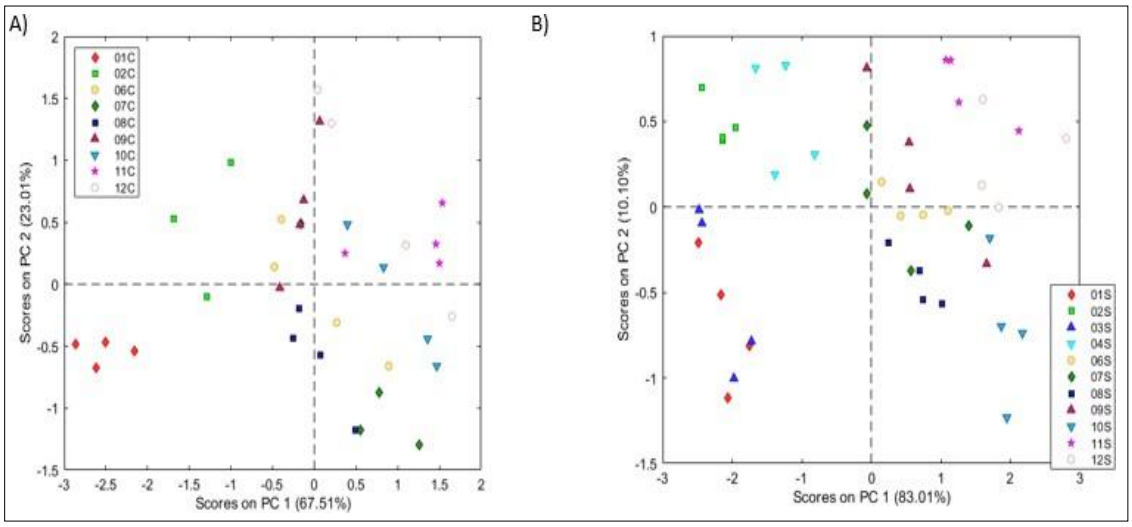


Figura 14: Análisis de componentes principales (PCA): (A) Análisis de discriminación de PC arándanos sin recubrimiento, (B) Análisis de discriminación de PC arándanos con recubrimiento

Según Lorente et al. (2012) “el método PCA es un método de aprendizaje sin supervisión y se utiliza a menudo para la selección de características, reducción de la dimensión de datos y resolver la multicolinealidad”. Además, menciona que el análisis discriminante es una técnica estadística a partir de dos clases a más y crea una función que separa con mayor precisión a los elementos de conjunto. Lo propuesto por los autores anteriormente se puede observar en la Figura 12(A) donde se ve una diferenciación o agrupamiento de las muestras pertenecientes a las primeras dos muestras, más adelante la distribución no permite diferencias agrupaciones entre las muestras. Mientras que en la Figura 12(B) no se puede diferenciar agrupación entre los componentes principales en ninguna de las muestras. Se considera que esto se debe a la similitud entre los

parámetros y componentes de las muestras, hecho que impide poder discriminar o agruparlas; recalcando así, que las muestras con recubrimiento presentaron más similitudes y menos discriminación entre los componentes de las muestras, lo que nos indica que el recubrimiento disminuyó el cambio de los componentes principales de una muestra a otra.

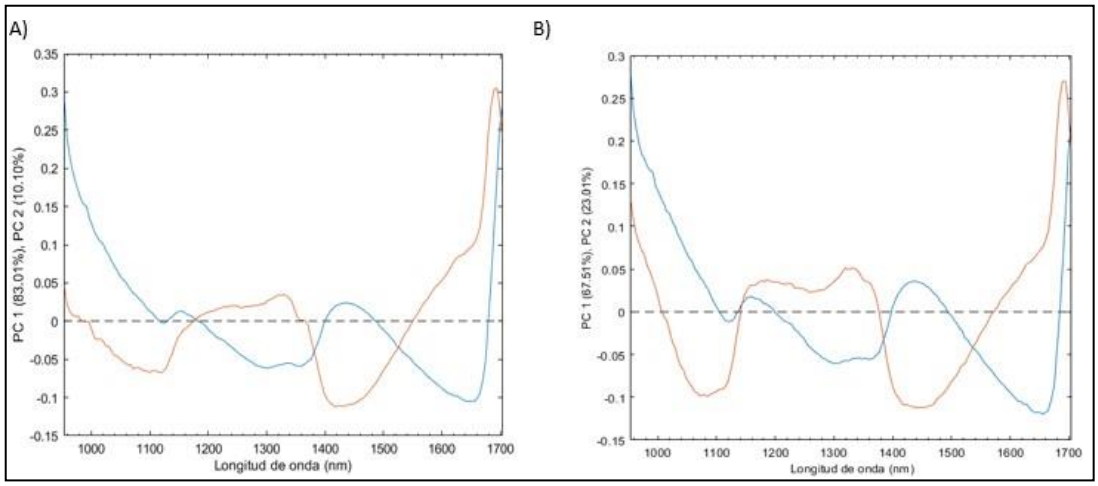


Figura 15. Análisis de componentes principales (PCA): (A) Longitud de onda para muestras de arándanos sin recubrimiento, (B) Longitud de onda para muestras de arándano con recubrimiento

Para poder interpretar las Figuras 13(A) y 13(B) nos basamos en lo propuesto por Travers (2013) el menciona que este procedimiento convierte una matriz de datos de variables correlacionadas entre sí en un nuevo grupo de variables independientes que influyen en una variable concluyente llamadas Componentes principales (PC´s). Los PC´s están regulados de forma en que el primer PC pertenece a la varianza con mayor participación, el segundo PC´s pertenece a la segunda varianza con mayor participación y así sucesivamente.

Tal como podemos observar en la Figura 13(A) ambos componentes principales muestran picos alrededor de las longitudes de onda 960, 1070, 1100, 1160, 1280, 1350, 1420, 1460 y 1670 nm. Lo que nos muestra según Leiva-Valenzuela y Lu

(2013) presencia de grupos –OH atribuidos a la presencia de agua cuando la gráfica muestra picos entre 970 a 980 nm. Este resultado es respaldado por el estudio de Sinelli (2008) para arándanos donde relaciona los picos en la región 967 nm con –OH de agua. Además, esta figura nos muestra los dos componentes principales del arándano, que según Pérez-Marín et al. (2009) los picos de alrededor de las regiones de 970 y 1400 nm pertenecen a bandas de absorción de agua y las regiones de 945 y 1300 nm corresponde a la degradación de azúcares. Por lo que podemos argumentar que los dos componentes principales encontrados en la Figura 13(A) y 13(B) representan al agua y los sólidos solubles totales como componentes principales. Logrando destacarse una menor proporciones de agua en la superficie de las muestras de arándanos con recubrimientos. Esto se debe a que como se pudo ver anteriormente el recubrimiento permite disminuir la pérdida de peso por transpiración del fruto.

Además, según Forero (2017) el comportamiento inverso de los picos en las regiones mencionadas por el autor se relaciona también con la variación del contenido de agua (se amenora durante el almacenamiento) y el contenido de sólidos solubles de la fruta que tiende a aumentar durante el almacenamiento.

V. CONCLUSIONES

1. Se logró elaborar los recubrimientos de quitosano/goma de tara (*Caesalpinia spinosa)* en concentraciones de 75% 50% y 25% de solución de nanopartículas de quitosano al 1%), las nanopartículas de quitosano se elaboraron mediante el proceso de gelificación iónica.

2. El tamaño del diámetro de las nanopartículas de quitosano aumenta con respecto al tiempo a causa del poder higroscópico del quitosano, además de la naturaleza del equipo Dynamic Light Scattering (DLS) el cual mide el radio de la higroscopia de la nanopartícula, adicionando la falta de un estabilizante.

3. La formulación número 2 (con 75% de solución de nanopartículas de quitosano, 15% de solución de quitosano y 10% de solución de goma de tara) tuvo mayor potencial antimicrobiano que las demás formulaciones teniendo un 73% de retardo en el crecimiento fúngico con respecto al testigo.

4. Se encontró evidencia significativa con respecto a la mejor conservación del arándano (*Vaccinium myrtillus*) en función al porcentaje de pérdida de peso, y firmeza**.** En las muestras recubiertas de la formulación número 2**,** el recubrimiento logró retardar en un 28.62% la pérdida de peso por transpiración del fruto con respecto al testigo, mientras que el recubrimiento logró disminuir un 11.63% la pérdida de firmeza con respecto al testigo.

5. Se determinó mediante la aplicación de imágenes hiperespectrales que en los arándanos recubiertos disminuyeron el cambio de los componentes principales de una muestra a otra. Destacando menores proporciones de agua en la superficie de las muestras de arándanos con recubrimientos por los picos de alrededor de las regiones de 970 y 1400 nm. correspondientes a bandas de

absorción de agua y menores cambios en las regiones de 945 y 1300 nm. relacionadas a degradación de azúcares.

6. Se concluye, que los arándanos (*Vaccinium myrtillus)* recubiertos con nanopartículas de quitosano, quitosano y goma de tara (*Caesalpinia spinosa*), experimentaron una mejor conservación en los parámetros de pérdida de peso y firmeza durante los primeros 5 días de almacenamiento a 5 °C.

VI. RECOMENDACIONES

1. Analizar la toxicidad de las nanopartículas, y su influencia en productos de consumo humano directo**.**

2. Estudiar el grado de mejora en las propiedades mecánicas (dureza)**,** que puede aportar el recubrimiento del arándano, con nanopartículas de quitosano.

3. Estudiar el uso de un estabilizador en la producción de nanopartículas de quitosano**,** debido a su propiedad hidrofílica de acumular agua a su alrededor y alrededor de la nanopartícula**,** que se formó mediante la gelificación iónica.

4. Examinar la utilización de una mayor concentración de quitosano en la solución de quitosano preparada, para verificar el retardo o la inhibición de las nanopartículas sobre los hongos.

5. Examinar la fragilidad de los recubrimientos de fracturarse o romperse al momento de desmoldar, para evitar el deterioro que permita medir de forma adecuada las propiedades mecánicas del recubrimiento.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abanto, M. (2018). Aplicación de dos recubrimientos comestibles a base de quitosano y cera de abeja, para determinar el mejor efecto de la prolongación de la vida útil del arándano (Vaccinium Corymbosum L.). Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca-Perú. Obtenido de http://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/2937.

Ali, A., Zahid, N., Manickam, S., Siddiqui, Y., Alderson, P. G., & Maqbool, M. (2013). Effectiveness of submicron chitosan dispersions in controlling anthracnose and maintaining quality of dragon fruit. Postharvest Biology and Technology, 86, 147-153. doi:10.1016/j.postharvbio.2013.06.027.

Badawy, M. E. I., & Rabea, E. I. (2009). Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. Postharvest Biology and Technology, 51(1), 110-117. doi:10.1016/j.postharvbio.2008.05.018

Bautista-Baños, S., Hernández-Lauzardo, A., Velázquez del Valle, M., Bosquez-Molina, E., & Sánchez Domínguez, D. (2005). Quitosano: una alternativa natural para reducir microorganismos postcosecha y mantener la vida de anaquel de productos hortofrutícola. Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 7, 1-6. Obtenido de https://www.redalyc.org/pdf/813/81370102.pdf

Bautista-Baños, S., Hernández-Lopez, M., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. (2003). Effects of chitosan and plant extracs on growth of Colletotichum gloeosporiodes, anthracnose levels and quality of papaya fruit. Crop Protection, 22, 1087-1092. Obtenido de https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219403001170.

Bautista-Baños, S., Romanazzi, G., & Jiménez-Aparicio, A. (Eds.). (2016). Chitosan in the preservation of agricultural commodities. Academic Press.

Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R. I., Correa-Pacheco, Z., & Corona-Rangel, M. L. (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and

vegetables in postharvest-a review. Revista Chapingo. Serie horticultura, 23(2), 103-122.

Bento, R., Pagán, E., Berdejo, D., de Carvalho, R. J., García-Embid, S., Maggi, F., ... & Pagán, R. (2020). Chitosan nanoemulsions of cold-pressed orange essential oil to preserve fruit juices. International Journal of Food Microbiology, 331, 108786.

Berúmen-Varela, G., Coronado-Partida, L. D., Ochoa-Jiménez, V. A., Chacón-López, M. A., & Gutiérrez-Martínez, P. (2015). Efecto del quitosano en la inducción de resistencia contra Colletotrichum sp. en mango (Mangifera indica L.) cv. Tommy Atkins. Investigación y Ciencia, 23(66), 16-21. Retrieved from http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=67446014003

Bósquez, e. (2007). Elaboración de recubrimientos comestibles formulados con goma de mezquite y cera de candelilla para reducir la cinética de deterioro en fresco del limón persa (Citrus latifolio Tanaka). Universidad Autónoma Metropolitana, México.

Buzeta, A. (1997). Berries para el 2000. Chile: Fundación Chile.

Calderón, N. (2015). Obtención y caracterización de nanoparticulas de quitosano por el método de gelación iónica. Universidad Nacional de San Agustin, Arequipa - Perú. Obtenido de http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/2896/MTcapene050.pdf ?sequence=1&isAllowed=y

Canelas DA, Herlihy KP, DeSimone JM (2009) Top-down particle fabrication: control of size and shape for diagnostic imaging and drug delivery. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol 1:391–404. https://doi.org/10.1002/wnan.40

Caro-León, F. J., López-Martínez, L. M., Lizardi-Mendoza, J., Argüelles-Monal, W., Goycoolea-Valencia, F. M., Carvajal-Millán, E., & López-Franco, Y. L. (2019). Métodos de preparación de nanopartículas de quitosano: una revisión. Biotecnia, 21(3), 13-25.

Castro, A. (2014). Formulación, sintesis, optimización y caracterización de dos tipos de nanosistemas de encapsulamiento basados en quitosano. Universidad de la República, Uruguay. Obtenido de

https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/6410/1/uy24-17038.pdf

Cevallos-Barturén, N. M., & Medina-Ormachea, D. S. (2019). Estudio de la viabilidad técnico-ambiental de la elaboración de un adsorbente avanzado a base de goma de tara para la remoción de arsénico en efluentes mineros.

Chocano. (2009). Recopilación Tecnológica de agentes de textura y sus aplicaciones. Obtenido de https://www.blueberrieschile.cl/subidas/2017/12/requerimient os-de-polinizacion-de-algunas-variedades.pdf

Cisneros-Zevallos, L., & Krochta, J. (2003). Dependence of Coating Thickness on Viscosity of Coating Solution Applied to Fruits and Vegetables by Dipping Method. Journal of Food Science, 68(2), 503-510. doi: doi:10.111/j.1365-2621. 2003.tb05702.x

Cornejo, M. D. (2016). Biorremediación de relaves mineros con un consorcio microbiano nativo caracterizado molecularmente y productor de enzimas degradadoras de cianuro y derivados. Tumbes: Universidad Nacional de Tumbes.

Correa-Pacheco, Z. N., García-Paniagua, K. D., Bautista-Baños, S., & Corona-Rangel, M. L. (2019). Efecto de nanorecubrimientos de quitosano-aceite esencial de tomillo sobre la calidad postcosecha en frutos de jitomate. Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology, 37(1).

Costantini, R., Ventura, R., Hernández, M., & Bautizta, S. B. (2018). Potencial antifúngico de nanopartículas de quitosano y extracto de arándano sobre Colletorichum fragarie en fresa. Revista Iberoamericana de Tecnología de Postcosecha, 19(1). Obtenido de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81355612004

Cruañes, M., & Locaso, D. (2011). Quitosano: antimicrobiano biodegradable en postcosecha de arándanos (Vaccinium myrtillus L.). Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 12(1), 57-63. Obtenido de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=81318808009

Defillippi B., R. P. (2013). Manual de arándano - Manejo de cosecha y poscosecha en arándano. Obtenido de http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39094.pdf

De Oliveira, E. N., el Gueddari, N. E., Moershbacher, B. M., & Franco, T. T. (2012a). Growth rate inhibition of phytopathogenic fungi by characterized chitosans. Brazilian Journal of Microbiology, 43(2), 800-809. doi: 10.1590/S1517-83822012000200046

De Oliveira, E. N., de Melo, S. I., & Teixeira, F. T. (2012b). Changes in hyphal morphology due to chitosan treatment in some fungal species. Brazilian Archives of Biology and Technology, 55(5), 637-646. doi: 10.1590/ S1516-89132012000500001

Dhall, R. (2013). Advances in Edible coating for Fresh Fruits and Vegetables: A Review. Critical Reviews in Food Science and Nutririon, 53(5), 435-450. doi: doi.10.1080/10408398.2010.541568

Dutta, P. K. (2009). Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. Food Chemistry. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.11.047

Food and Agriculture Organization (2015). Food loss and waste facts. http://www.fao.org/savefood/recursos/infografia/es/

Food and Agriculture Organization (2017). Pérdida y Desperdicio de Alimentos en América Latina y El Caribe: Alianzas e institucionalidad para construir mejores políticas. Boletín 4.. http:// www.fao.org/3/a-i7248s.pdf

Forero, N. (2017). Evaluación de parámetros de calidad físicos y químicos en agraz (Vaccinium meridionale Swartz) con el uso de espectroscopía de infrarrojo cercano – NIR. Universidad Nacional de colombia, Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola. Obtenido de https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/62984

Galleta, G., Ballinger, R., R., M., & L., K. (1990). Relationships between fruit acidity and soluble solids levels of highbush blueberry clones and fruit keeping quality. Journal Amer. S. Hort. Sci, 96(6), 758-762.

Garcia, M. (2008). Películas y cubiertas de quitosano en la conservación de vegetales. Ciencia y Tecnoloigía de Alimentos, 2(16), 71-76. Obtenido de

https://www.oceandocs.org/bitstream/handle/1834/4843/Rese%f1a%20Mario%20A..pdf?sequence=1

Garcia, M., Martino, M., & Zaritzky, N. (2001). Composite starch-based coatings applied to strawberries (Fragaria ananussa). Nahrung/Food, 45(4), 267-272.

Gómez, M.; Lajolo, F.; y Cordenunsi, B. 2002. Evolution of soluble sugars during ripening of papaya fruit and its relation to sweet taste. J. Food Sci. 67(1):442 - 447.

Hartig, S. (2007). Multifunctional nanoparticle polyelectrolyte Complexes. Pharmaceutical Research, 24, 2353-2369. Obtenido de https://link.springer.com/article/10.1007/s11095-007-9459-1

Hunter, R. (2013). Zeta potential in colloid Science: Principles and Applications. Obtenido de https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=9I3-BAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Zeta+Potential+in+Colloid+Science&ots=EWX1P6TsYt&sig=Z3Y_CawLYvQr2yRshAny5_N3YS0#v=onepage&q=Zeta%20Potential%20in%20Colloid%20Science&f=false

J.J., W., Zeng, Z., Xiao, R., Xie, T., & Zhou G.L., Z. X. (2011). Recent advances of chitosan nanoparticles as drug carries. Int J Nanomedicine, 6, 765-774.

Jang, K., & Lee, H. (2008). Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. Journal of Agr. and Food chemestry, 6(56). Obtenido de https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf073385e.

Juanito Montes, O. A. (2018). Plan de negocio para la producción y exportación de arándano cultivado en la zona del norte chico de Lima para el mercado de China.

Jung, J. H., Kim, S. W., Lamsal, K., Kim, Y. S., Park, H. J., & Lee, Y. S. (2011). Effect of chitosan coated fungicide against Colletotrichum gloeosporioides and powdery mildew. Journal of Agricultural Life and Environmental Sciences, 23(2), 14-22.

Kester, J., & Fennema, O. (1986). Edible films and coatings: A review. Food Technology(40), 407-459. Obtenido de http://agris.fao.org/agr is-search/search.do?recordID=US8836195.

Lafuente Rosales, V. (2015). Aplicación de las técnicas de Espectroscopia Vis/NIR y de imágenes de retrodifusión de luz láser a la evaluación del estado de madurez de melocotón, manzana y cereza.

Lamarra, J., Giannuzzi, L., Rivero, S., & Pinotti, A. (2017). Assembly of chitosan support matrix with gallic acid-functionalized nanoparticles. Materials Science and Engineering: C, 79, 848-859.

Lamarra, J., Lecot, J., Rivero, J., & Pinott, A. (2017). Ensamblado de matrices de quitosano con nanoprtículas funcionalizadas con ácido gálico. Centro de invesigación y desarrollo en criotenología de alimentos (CIDCA), UNLP, La Plata.

Lazo Aguirre, W. A. (2019). Espectroscopia con infrarrojo y técnicas de Machine learning y Deep learning para la detección y clasificación de frutas para la agroindustria. Caso: arándanos-Empresa Talsa-2018.

Ledezma-Delgadillo, A. C.-G.-M.-F.-L. (2016). Revista Mexicana de Ingeniería Química [en linea]. Recuperado el 02 de 09 de 2020, de Redalyc.org: https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62046829010

Leiva-Valenzuela, G., & Lu, R. &. (2013). Prediction of firmness and solible solids content of blueberries using hyperespectral reflectance imaging. Journal of Food Engineering, 115(1), 91-98. Obtenido de http://linkinghub.elseiver.com/retrieve/pii/S1466856414000319.

Li, H., & Yu, T. (2000). 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. doi:10.1002/1097-0010(20010115)81:2<269::AID-JSFA806>3.0.CO;2-F

Liu, J., Tian, S., Meng, X., & Xu, Y. (2007). Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. Postharvest Biology and Technology, 44(3), 300-306. doi: 10.1016/j.postharvbio.2006.12.019

Lizardi-Mendoza, J., Monal, W. M. A., & Valencia, F. M. G. (2016). Chemical characteristics and functional properties of chitosan. In Chitosan in the preservation of agricultural commodities (pp. 3-31). Academic Press.

Lorente, D., Aleixos, N., Gómez-Sanchis, J., Cubero, S., García-Navarrete, O., & Blasco, J. (2012). Recent advances and applications of hyperspectral imaging for fruit and vegetable quatity assessment. Food and Bioprocess Technology, 5(4), 1121-1142. doi:https://doi.org/10.1007/s11947-011-0725-

López-Mora, L. I., Gutiérrez-Martínez, P., Bautista-Baños, S., Jiménez-García, L. F., & Zavaleta-Mancera, H. A. (2013). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosanoen Alternaria alternata y en la calidad del mango 'Tommy Atkins' durante el almacenamiento. Revista Chapingo Serie horticultura, 19(3), 315-331. doi: 10.5154/r.rchsh.2012.07.038

Luchsinger, L. (Julio de 2017). Redagrícola. Recuperado el 25 de setiembre de 2020, de Los puntos críticos de la cadena de frío en arándanos: https://www.redagricola.com/pe/los-puntos-criticos-la-cadena-frio-arandanos/

MAckenzie, J. (2007). Pollination requirements of three highbush blueberry (vaccinium corymborum L.) cultivars. J. Amer. soc. Hort. Sci, 6(122), 891-896. Obtenido de https://www.blueberrieschile.cl/subidas/2017/12/requerimientos-de-polinizacion-de-algunas-variedades.pdf

Martinez. (2010). Chitosan composite films: Thermal, estructural, mechanical and antifungical propieties. doi:doi.10.1016/j.carbpol.2010.04.069

Matos, C. A. (2020). Revisión de literatura: Biopelículas a base de quitosano como potencial aplicación en empaque de alimentos.

Medina, M. S. (2017). Actividad antimicrobiana de recubrimientos de Quitosano y Ɛ-polisina en moras inoculadas con Escherichia coli, Salmonella enterica y Botrytis cinerea (Bachelor's thesis, Universidad Técnica de Ambato. Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos. Carrera de Ingeniería Bioquímica).

Mi, F. (2013). Tripollyphosphate cross-linked micromolecular composites for the growth of shape-on size- controlled apetites.

Ministerio de agricultura y riego (2016). El arándano en el Perú y en el mundo, Producción, Comercio y Perspectivas. Lima. Perú.

Moncayo, D., Buitrago, G., & Algecira, N. (2016). Películas comestibles a base de un biopolímero tipo dextrana. Agronomía colombiana, 34(1), 107-109.

Muñoz Lescano, K. C. T. (2017). Efecto de un recubrimiento comestible a base de goma de Tara (Caesalpinia spinosa) sobre las características Fisicoquímicas y Microbiológica en trozos de pechuga de pollo almacenadas en refrigeración.

Navarro, Y.M., Soukup, K., Jandová, V., Gómez, M.M., Solis, J.L., Cruz, J.F., Siche, R., Šolcová, O., Cruz, G.J.F. (2019) Starch/chitosan/glycerol films produced from low-value biomass: Effect of starch source and weight ratio on film properties(Conference Paper). Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes-Peru. Obtenido de: https://www.scopus.com/record/display.uri?eid=2-s2.0 85064396062&origin=inward&txGid=4ce0d093e2191763becfec65a02a7815#

Núñez-Barrios, A., NeSmith, S., Sánchez, E., Prussia, S., & Soto, J. (2005). Influencia de métodos de cosecha y temperaturas de almacenamiento en la calidad del arándano (Vaccinium ashei R.). Revista Fitotecnia Mexicana, 28(4), 385-388. Obtenido de http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61028411

Park, S. I., Stan, S. D., Daeschel, M. A., & Zhao, Y. (2005). Antifungal coatings on fresh strawberries (Fragaria × ananassa) to control mold growth during cold storage. Journal of Food Science, 70(4), 202-207. doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb07189.x

Pavón, D. (2015). Uso potencial de la goma de tara (Caesalpinia spinosa) para el desarrollo de nuevas películas y recubrimientos comestibles compuestos. Escuela Politécnica Nacional, Facultad de Ingeniería Quiímica y Agroindustria, Quito. Obtenido de https://bibdigital.epn.edu.ec/handle/15000/10482

Pérez-MArín, D., Sanchez, M., PAz, P., Soriano, M., Guerrero, J., & Garrido-VAro, A. (2009). Non-destructive determination of quality parameters in nectarines during on-tree ripening and postharvest storage. Postharvest Biology and Technology, 52(2), 180-188. doi:https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.10.005

Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., CastilloOrtega, M. M., & Shirai, K. (2003). Effect of chitosan and temperature on spore germination of Aspergillus niger. Macromolecular Bioscience, 3(10), 582-586. doi: 10.1002/mabi.200350024

Plastics Europe. (2019). Los plásticos ahorran alimentos y recursos. Obtenido de PlasticsEurope: https://www.plasticseurope.org/es/ab out-plastics/packaging/plastics-save-food-and-resources

Ramos-García, M., Bosquez-Molina, E., Hernández-Romano, J., Zavala-Padilla, G., Térres-Rojas, E., Alia-Tejacal, I., Barrera-Necha, L., Hernández-López, M., & BautistaBaños, S. (2012). Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control Rhizopus stolonifer and Escherichia coli DH5α in fresh tomatoes. Crop Protection, 38, 1-6. doi: 10.1016/j. cropro.2012.02.016

Restrepo, J., & Aristizábal, T. (2010). Conservación de fresa (Fragaria xananassa Dudi cv Camarosa) mediante la aplicación de recubrimientos comestibles de gel mucilaginoso de penca sábila (Aloe barbadenis Miller) y cera de Carnaúba. Viate, REvista de la Facultad de Química Farmacéutica ISSN0121-4004/ISSNe 2145-2660, 17(3), 252-263. Obtenido de http://www.scielo.org.co/pdf/vitae/v17n3/v17n3a03.pdf.

Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. Progress in polymer science, 31(7), 603-632.

Rodrigues, S., da Costa, A. M. R., & Grenha, A. (2012). Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. Carbohydrate polymers, 89(1), 282-289.

Romanazzi, G., Nigro, F., & Ippolito, A., (2001). Chitosan in the control of postharvest decay of some Mediterranean fruits. In: Muzarelli, R. A. A. (Ed.), Chitin Enzymology (pp. 141-146). Italy: Atec.

Sánchez-Domínguez, D., Ríos, M. Y., Castillo-Ocampo, P., Zavala-Padilla, G., Ramos-García, M., & BautistaBaños, S. (2011). Cytological and biochemical changes induced by chitosan in the pathosystem Alternaria alternata–tomato. Pesticide biochemistry and physiology, 99(3), 250-255. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.01.003

Silva, R. T., Mantilaka, M. M. M. G. P. G., Ratnayake, S. P., Amaratunga, G. A. J., & de Silva, K. N. (2017). Nano-MgO reinforced chitosan nanocomposites for high performance packaging applications with improved mechanical, thermal and barrier properties. Carbohydrate polymers, 157, 739-747.

Sinelli, N. e. (2008). Evaluation of quality and nutraceutical content in blueberries (Vaccinium corymbosum) by near and mid infrared spectroscopy. Postharvest Biology and Technology, 50, 31-36. doi:https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.013

Sotelo-Boyás, M. E., Bautista-Baños, S., Correa-Pacheco, Z. N., Jiménez-Aparicio, A., & Sivakumar, D. (2016). Biological activity of chitosan nanoparticles against pathogenic fungi and bacteria. In Chitosan in the preservation of agricultural commodities (pp. 339-349). Academic Press.

Sotelo, M., Valverde, G., Plascencia, M., Correa, Z., Jiménez, A., Solorza, J., . . . Bautista, S. (2015). Characterization of Chitosan Nanoparticles added with Essencial Oils. In vitro effect o Pectobacterium Carotovorum. Revista Mexicana de Ingeniería Química, 14(3), 589-599. Obtenido de https://www.redalyc.org/pdf/620/62043088003.pdf

Travers, S. (2013). Dry matter and fruit quality: manipulation in the field and evaluation with NIR spectroscopy (Tesis doctoral). Universidad de Aarhus. Obtenido de http://pure.au.dk/portal/files/56894564/Dry_matter_and_fruit_quality_manipulation_in_the_field_and_evaluation_Sylvia_Travers_Thesis_August_2013_compressed_opt.pdf

Vasquez, V. (2019). Efecto de recubrimientos comestibles a base de penca sábila (Aloe vera) con cera de abeja en la concentración de arándanos (Vaccinium corymbosum L.). Universidad Nacional de Cajamarca, Cajamarca-Perú. Obtenido de http://repositorio.unc.edu.pe/handle/UNC/3544

White, T. J. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics.

Xie, D. F., Martino, V. P., Sangwan, P., Way, C., Cash, G. A., Pollet, E., & Avérous, L. (2013). Elaboration and properties of plasticised chitosan-based exfoliated nano-biocomposites. Polymer, 54(14), 3654-3662.

Younes I, Rinaudo M. Chitin and Chitosan Preparation from Marine Sources. Structure, Properties and Applications. Marine Drugs. 2015; 13(3):1133-1174. https://doi.org/10.3390/md13031133

Zevallos, C. M. (2017). Formulación y aplicación de un recubrimiento a base de quitosano y gel de sábila (Aloe vera) para el tratammiento postcosecha de limón sutil. Tesis, Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Tumbes.

Zhang, E., Xing, R., Liu, S., Qin, Y., Li, K., & Li, P. (2019). Advances in chitosan-based nanoparticles for oncotherapy. Carbohydrate polymers, 222, 115004.

Zhou, H. Y., Jiang, L. J., Cao, P. P., Li, J. B., & Chen, X. G. (2015). Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. Carbohydrate polymers, 117, 524-536.

VIII. ANEXOS

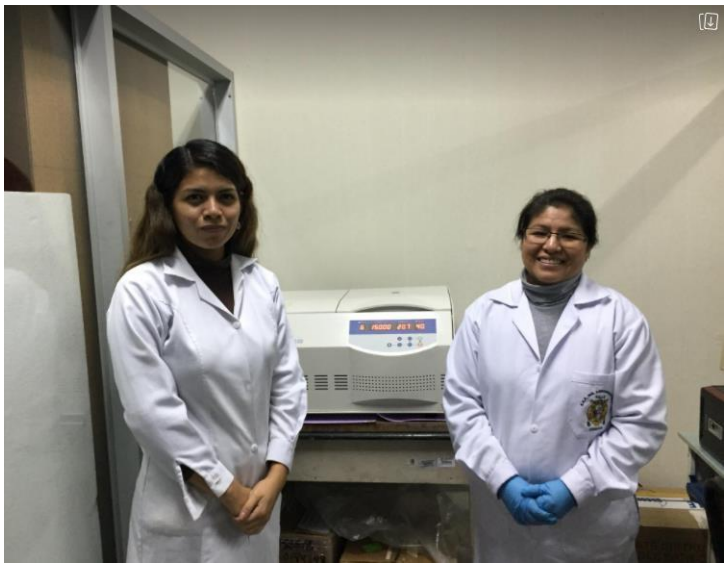
ANEXO 1. Componentes del recubrimiento biodegradables de quitosano/goma de tara con nanopartículas de quitosano

ANEXO 2. Elaboración de nanopartículas de quitosano por gelación iónica.

a) Preparación de solución TPP al 0.1%

b) Preparación del TPP al 0.1% y Quitosano al 0.2% para la gelación iónica.

c) Ultracentrifugación para la obtención de nanopartículas de quitosano en el laboratorio de la Universidad Mayor de San Marcos.



ANEXO 3. Caracterización de las nanopartículas de quitosano.

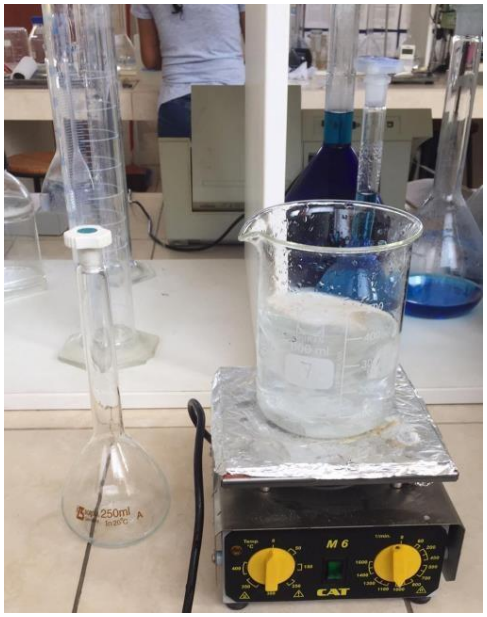
a) Análisis del tamaño de nanopartículas por DLS.

b) Análisis del tamaño de nanopartículas por XDR.

ANEXO 4. Elaboración de soluciones componentes del recubrimiento biodegradables de quitosano/goma de tara con nanopartículas de quitosano

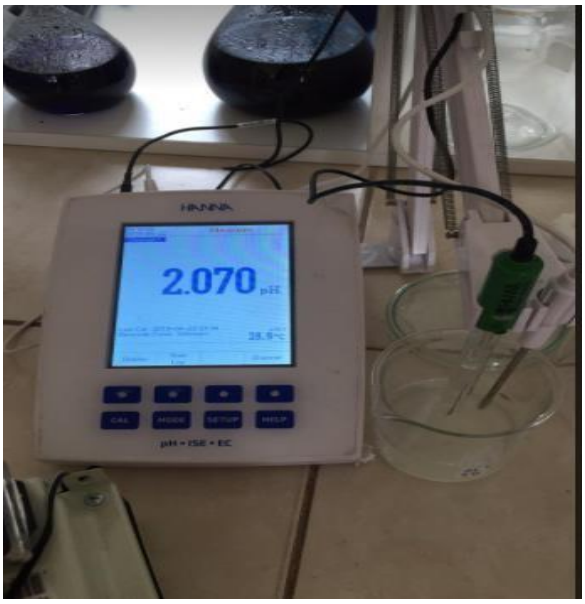
a) Preparación de la goma de Tara al 1%

b) Elaboración de solución de ácido cítrico al 1.5%



c) Preparación de quitosano al 1%

d) Medición del pH de la solución de quitosano al 1%



e) Acrílicos para la aplicación del método de casting.

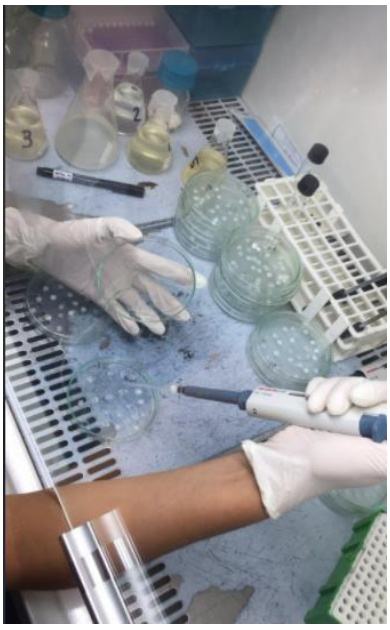
ANEXO 5. Análisis microbiológico del arándano con recubrimiento biodegradables de quitosano/goma de tara con nanopartículas de quitosano

a) Conservación de los hongos.

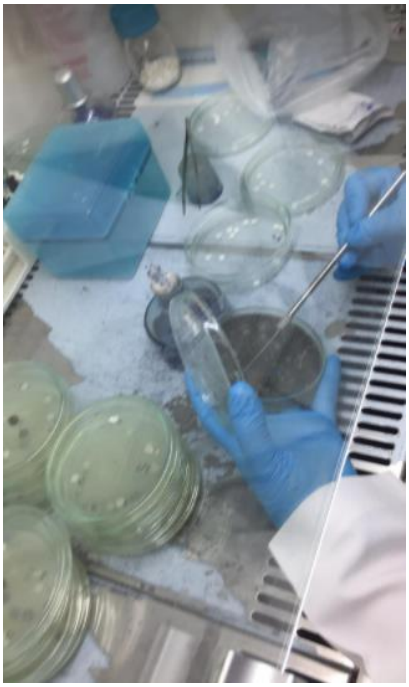
b) Sembrado de hongos de arándanos en agar en PDA.

c) Medición de la distancia entre redondelas con cada una de las formulaciones.

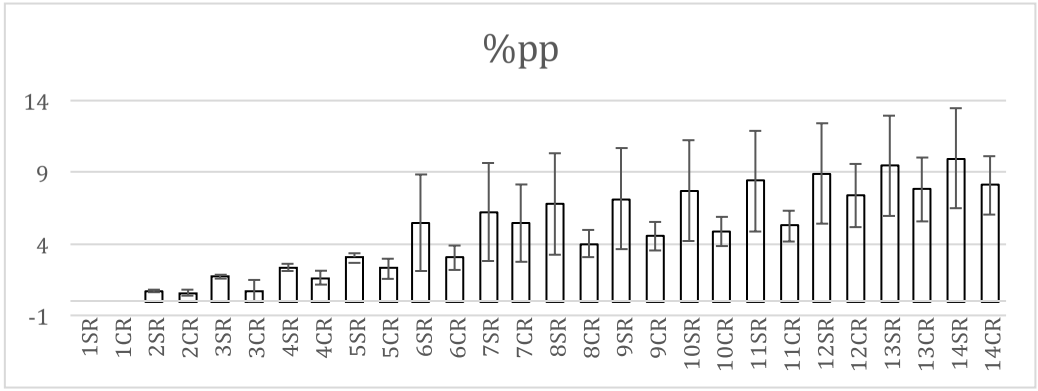
d) Vertido de 5 uml. de formulación en cada redondela.

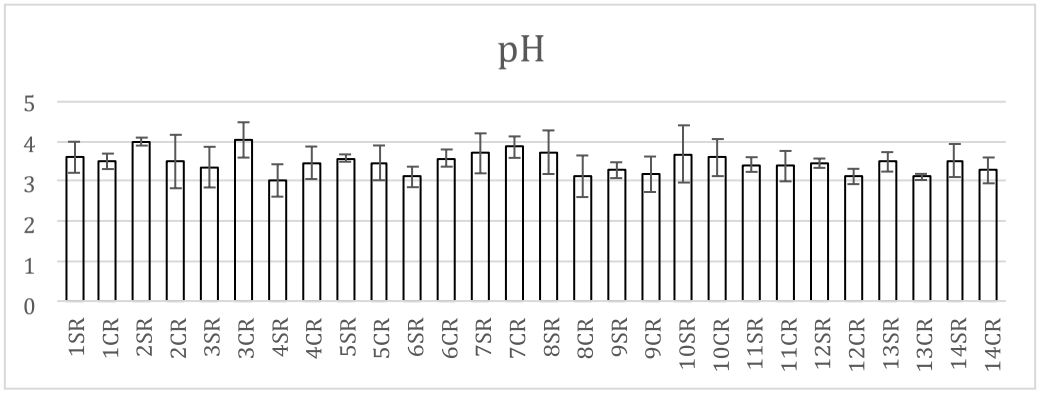


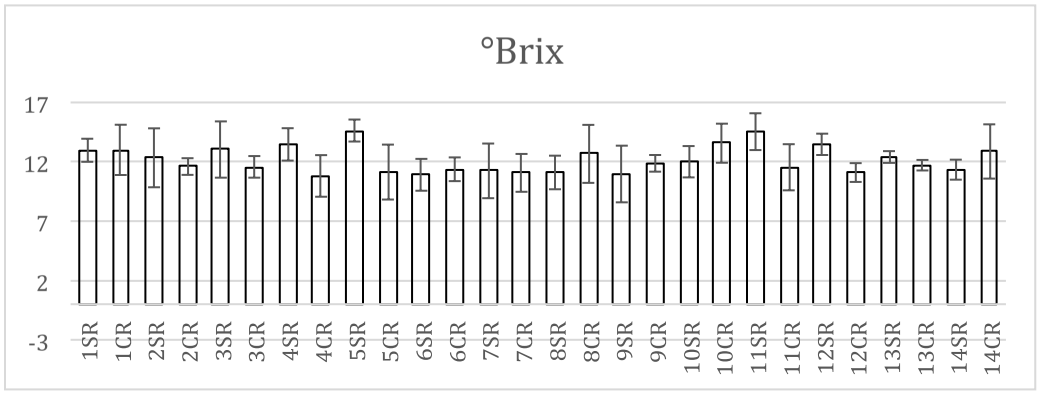
e) Sembrado de los hongos en las placas con cada una de las formulaciones en las redondelas.

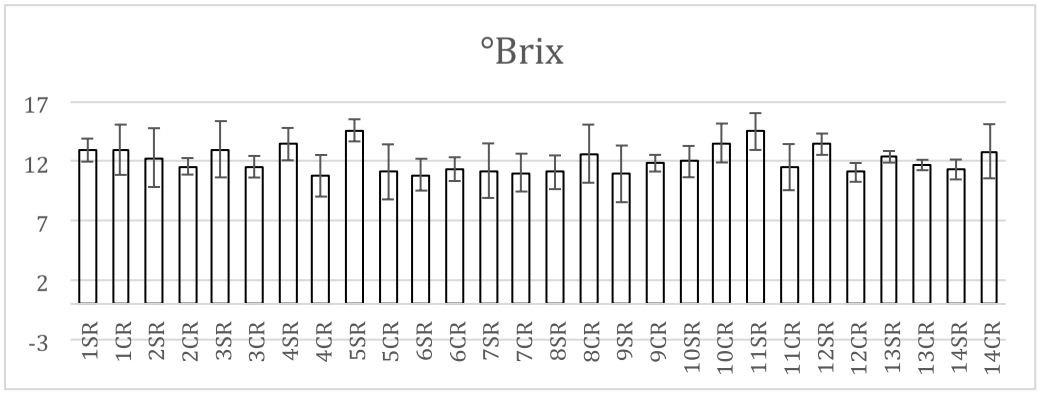


ANEXO 6. Gráfico de barras e intervalos de las muestras de arándano con y sin recubrimiento, durante el almacenamiento.









ANEXO 7. Prueba Tukey para parámetros fisicoquímicos de las muestras de arándanos con y sin recubrimiento, durante su almacenamiento.

i. Prueba Tukey para %pp

TRATAMIENTOS	N	MEAN	Grouping
SR	42	5.55973	A
CR	42	3.96881	B

ii. Prueba Tukey para pH

TRATAMIENTOS	N	MEAN	Grouping
SR	42	3.49987	A
CR	42	3.44598	A

iii. Prueba Tukey para °Brix

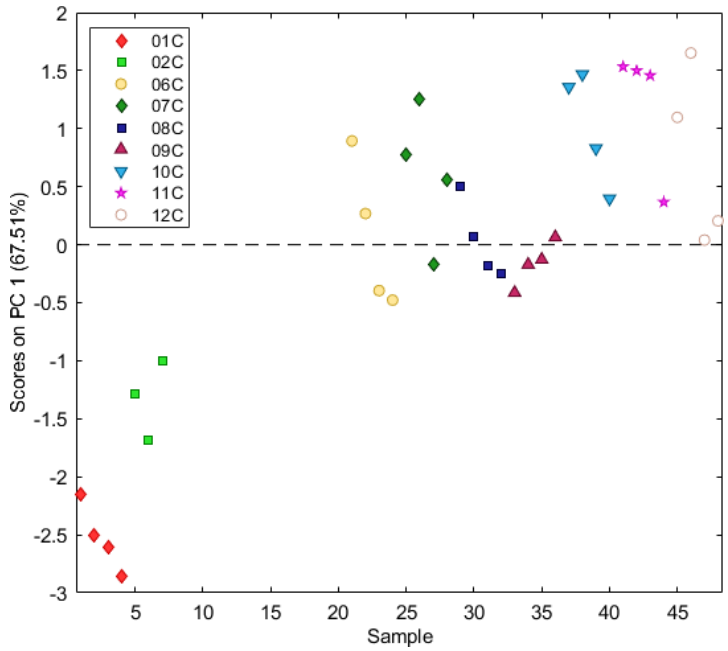
TRATAMIENTOS	N	MEAN	Grouping
SR	42	12.4548	A
CR	42	11.8452	A

iv. Prueba Tukey para Firmeza

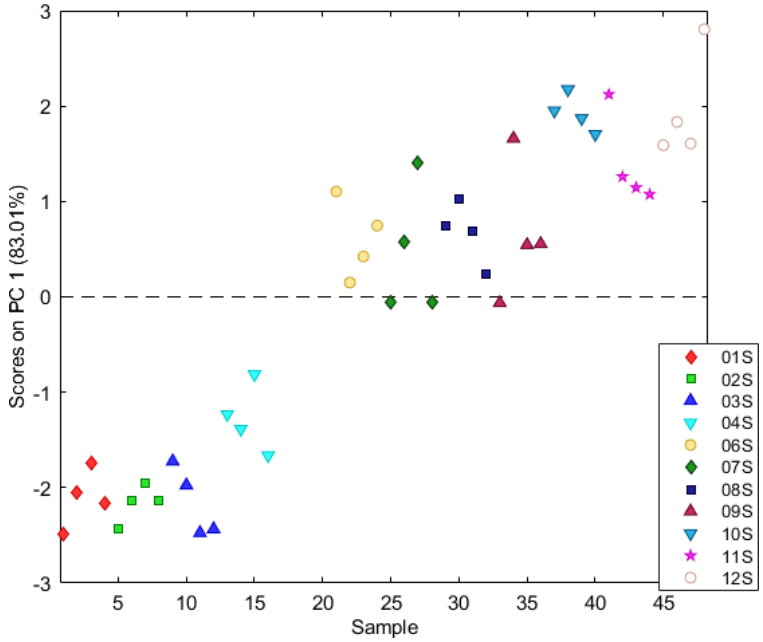
TRATAMIENTOS	N	MEAN	Grouping
SR	42	100.781	A
CR	42	89.063	B

ANEXO 8. Prueba PCA para muestras discriminatorias: (a) Muestras sin recubrimientos, (b) Muestras con recubrimiento

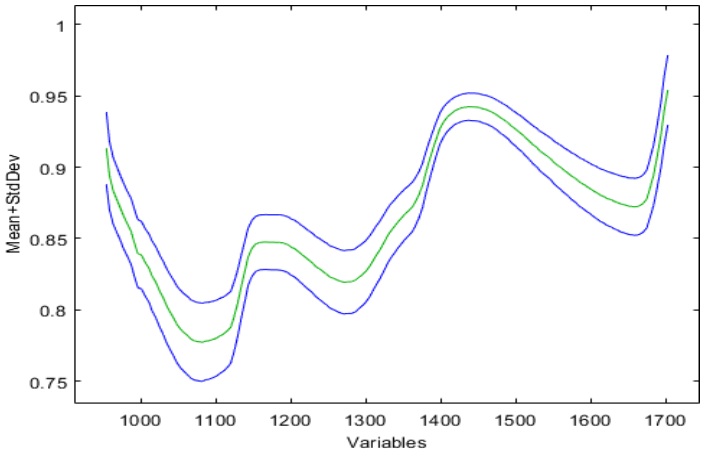
a)



b)



ANEXO 9. Media y rango de desviación estándar de las longitudes de onda del componente principal de las muestras de arándanos.



ANEXO 10. Medida de Ph de las muestras de arándanos con recubrimiento y su testigo.