

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***DISEÑO Y EVALUACIÓN DE RECUBRIMIENTOS EN BASE A
PROTEÍNAS DE QUÍNOA Y QUITOSANO QUE CONTIENEN
AGENTES NATURALES NANOPARTICULADOS PARA SU
APLICACIÓN EN FRUTILLAS***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Nutrición y Alimentos**

Programa Conjunto

**Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Facultad de Ciencias Agronómicas,
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Facultad de Medicina e Instituto de
Nutrición y Tecnología de Alimentos**

ESTEFANIA MEDINA QUIÑONEZ

Director de Tesis: Dr. Cristián Tapia

**Santiago, Chile
Septiembre, 2017**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

ESTEFANIA LOREDANA MEDINA QUIÑONEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Nutrición y Alimentos el día

Director de Tesis:

Dr. Cristián Tapia V. _____

Co-director de Tesis:

Dra. Lilian Abugoch J. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Abel Guarda _____

Dr. Victor Escalona _____

Dra. Carmen Saenz _____

Dr. Mehrdad Yazdani-Pedram _____

DEDICATORIA

Cómo no dedicar unas palabras en tu memoria, yo que pensaba no dedicar este trabajo a nadie en particular... justamente en el proceso de cerrar este capítulo de mi vida viniste a acompañarme y dejarme grandes enseñanzas; a revalorar lo maravilloso de la vida, el derecho a la libertad y la autonomía de pensamiento y acción como pilares fundamentales de nuestra existencia, con la más firme convicción de que cada uno es dueño de su destino y las posibilidades son ilimitadas.

Ilumina mi camino tío y espérame, que ya nos encontraremos a continuar con esas filosóficas conversaciones, que hoy por hoy llenan en algo el vacío que has dejado en mi corazón con tu repentina partida de este plano.

“Sólo mueren quienes son olvidados”...y cómo nos dejaste material para recordarte todo el tiempo que sea necesario hasta nuestro reencuentro.

Vuela alto tío amigo....el más bacán del mundo ☺

WALDO MARIO MEDINA CUEVAS

8/3/1955 – 18/8/2016

INDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA.....	xii
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. Quitosano.....	2
2.2. Quínoa.....	3
2.3. Recubrimientos comestibles.....	4
2.4. Agentes Naturales Antimicrobianos.....	8
2.5. Frutillas.....	11
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	
3.1. Hipótesis.....	14
3.2. Objetivos.....	14-15
4. CAPÍTULO 1	
ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR GELIFICACIÓN IÓNICA (GI) Y POR ATOMIZACIÓN CRIOGÉNICA EN NITRÓGENO LÍQUIDO (SFD) Y SU CARACTERIZACIÓN	
4.1. Introducción.....	17
4.2. Materiales y métodos	
4.2.1. Materiales.....	20
4.2.2. Fabricación nanopartículas mediante Gelificación Iónica.....	21
4.2.3. Fabricación de nanopartículas mediante Spray Freeze Dispertion (SFD).....	22
4.2.4. Caracterización nanopartículas.....	24
4.2.5. Análisis estadístico.....	27

4.3.	Resultados y Discusión	
4.3.1.	Diámetro hidrodinámico, Índice de polidispersidad y Potencial zeta de nanopartículas.....	28
4.3.2.	Rendimiento en partículas, eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de nanopartículas	32
4.3.3.	Morfología de las nanopartículas.....	34
4.3.4.	Difracción de rayos X de las nanopartículas.....	38
4.3.5.	Actividad antimicrobiana de las nanopartículas.....	41
4.3.6.	Estabilidad de las nanopartículas en el almacenamiento.....	44
4.4.	Conclusiones del capítulo 1.....	46

5. CAPÍTULO 2

INCORPORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS A PELÍCULAS COMESTIBLES, DETERMINACIÓN DE SUS PROPIEDADES MECÁNICAS, DE BARRERA AL VAPOR DE AGUA Y ESTRUCTURALES

5.1.	Introducción.....	49
5.2.	Materiales y métodos	
5.2.1.	Materiales.....	51
5.2.2.	Incorporación de nanopartículas a películas	51
5.2.3.	Caracterización de películas.....	52
5.2.4.	Análisis estadístico.....	54
5.3.	Resultados y Discusión	
5.3.1.	Análisis microscópico de películas.....	55
5.3.2.	Propiedades mecánicas.....	57
5.3.3.	Permeabilidad al vapor de agua	58
5.4.	Conclusiones del capítulo 2.....	65

6. CAPÍTULO 3	
 APLICACIÓN DE LAS MEZCLAS FORMADORAS DE PELÍCULAS EN FRUTILLAS Y EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DURANTE EL ALMACENAMIENTO	
6.1. Introducción.....	67
6.2. Materiales y métodos	
6.2.1. Materiales.....	68
6.2.2. Aplicación del recubrimiento.....	69
6.2.3. Evaluación de la vida útil de las frutillas.....	70
6.2.4. Análisis sensorial.....	72
6.2.5. Análisis estadístico.....	72
6.3. Resultados y Discusión	
6.3.1. Pérdida de peso durante el almacenamiento.....	73
6.3.2. Recuento de hongos y levaduras	75
6.3.3. Decaimiento fúngico.....	77
6.3.4. Variación de la Firmeza.....	79
6.3.5. Variación de sólidos solubles, pH, acidez titulable.....	80
6.3.6. Análisis sensorial.....	82
6.4. Conclusiones del capítulo 3.....	89
7. CONCLUSIONES GENERALES	90
8. REFERENCIAS.....	92

LISTA DE TABLAS

	Contenido	Página(s)
Tabla 1.	Diámetro hidrodinámico, Índice de polidispersidad y Potencial Zeta de nanopartículas de quitosano y quitosano-timol.	28
Tabla 2.	Rendimiento en partículas, eficiencia de encapsulación, y capacidad de carga de nanopartículas de quitosano y quitosano-timol según formulación.	33
Tabla 3.	Tamaño según microscopía electrónica de transmisión y según diámetro hidrodinámico de nanopartículas según formulación.	36
Tabla 4.	Porcentaje de estructura cristalina y amorfa de nanopartículas quitosano-timol.	40
Tabla 5.	Área de inhibición de crecimiento en para <i>Staphilococcus aureus</i> y <i>Salmonella thyphimurium</i> frente a soluciones de nanopartículas de quitosano, quitosano-timol y solución quitosano-timol.	41
Tabla 6.	Porcentaje de inhibición del desarrollo miceliar vegetativo de <i>B. cinerea</i> frente a los tratamientos ensayados.	43
Tabla 7.	Estabilidad en el tiempo (días) para nanopartículas quitosano-timol seleccionadas almacenadas durante 30 días a temperatura ambiente (15°).	45
Tabla 8.	Porcentaje de alargamiento (A %) y esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) para películas de quitosano-proteína de quínoa control, cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones y con adición de aceite al 2,9 %. Acondicionadas a 23 °C-60 % HR.	57

Tabla 9.	Comparación de la PVA de películas obtenidas en este estudio y de otros biopolímeros utilizados comúnmente para la fabricación de películas comestibles.	63
Tabla 10.	Firmeza (N) de las frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD) en los tiempos de almacenamiento analizados.	79
Tabla 11.	Acidez titulable (AT), sólidos solubles (°SS) y relación SS/AT de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD). Almacenadas a 5 °C y 95 % HR	81
Tabla 12.	Grado de calidad asignado a cada muestra a partir de la evaluación sensorial en el día 0, 5 y 12 de almacenamiento de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD).	82

LISTA DE FIGURAS

	Contenido	Páginas
Figura 1.	Esquema de la reacción de gelificación iónica de quitosano y tripolifosfato de sodio.	19
Figura 2.	Esquema proceso de fabricación de nanopartículas mediante gelificación iónica de quitosano y tripolifosfato de sodio.	21
Figura 3.	Esquema proceso de fabricación de nanopartículas mediante congelación por atomización criogénica.	23
Figura 4.	Microscopía electrónica de transmisión (MET) para nanopartículas según formulación.	35
Figura 5.	Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) para nanopartículas quitosano-timol según formulación.	37
Figura 6.	Difractograma de rayos X de nanopartículas quitosano-timol seleccionadas (gelificación iónica-solvente ácido cítrico y SFD-solvente ácido acético)	39
Figura 7.	Microscopia electrónica de barrido (MEB) de películas de quitosano-proteína de quínoa con nanopartículas generadas por gelificación iónica y atomización criogénica, y película control sin nanopartículas.	56
Figura 8.	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) v/s tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa control, control con 2,9 % de aceite y cargadas con nanopartículas quitosano-timol generadas por gelificación iónica al 1 y 5 %. Acondicionadas a 23 °C y 60 % HR.	59

Figura 9.	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa control y cargadas con nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica al 1, 3 y 5 %. Acondicionadas a 23 °C y 60 % HR.	61
Figura 10.	Reducción porcentual de permeabilidad al vapor de agua v/s tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa.	62
Figura 11.	Proceso de inmersión/recubrimiento de las frutillas.	69
Figura 12.	%Pérdida de peso v/s tiempo de almacenamiento (días) de las frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD).	73
Figura 13.	Recuento total de hongos y levaduras de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD).	75

Figura 14.	Fotografías de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD). Almacenadas a 5 °C y 95 % HR	78
Figura 15.	Análisis sensorial descriptivo. Días 0 (A), 5 (B) y 12 (C) de almacenamiento de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD).	85

.

.

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS O NOMENCLATURA

%A	: Porcentaje de alargamiento
°C	: Grados Celsius
μL	: Microlitro
AA	: Ácido Acético
AC	: Ácido Cítrico
ATCC	: American Type Culture Collection
aW	: Actividad de agua
CC	: Capacidad de carga de activo en la nanopartícula
CIM	: Concentración inhibitoria mínima
DLS	: Dispersión dinámica de luz (Dynamic Light Scattering en inglés)
EE	: Eficiencia de encapsulación de activo en la nanopartícula
ETR	: Esfuerzo de tracción a la ruptura
ETR	: Esfuerzo de tracción al corte
FTIR	: Espectroscopía infrarroja transformada de Fourier
GD	: Grado de desacetilación
gL⁻¹	: Gramos en un litro
HR	: Humedad Relativa
Mg	: Miligramos
Min	: Minutos
mL	: Mililitros
mm	: Milímetros
mm²	: Milímetro cuadrado
mm³	: Milímetro cubico
MPa	: Megapascales

Mv : Milivoltios
N : Newton
Nm : Nanómetro
NPs : Nanopartículas
p/p % : Porcentaje peso-peso
p/v : Peso/volumen
p/v % : Porcentaje peso-volumen.
Pdl : Índice de polidispersidad
PDI : Índice de polidispersidad
PM : Peso molecular
PP : Pérdida de peso
ppm : Partes por millón
PQ : Proteína de quínoa
PVA : Permeabilidad al vapor de agua
Q : Quitosano
QT : Quitosano Timol
QTTP : Quitosano Timol Tert-Butanol Pluronic
RP : Rendimiento en partículas
rpm : Revoluciones por minuto
MEB : Microscopía electrónica de transmisión
SFD : Spray Freeze Dispersion
SS : Sólidos solubles
TPP : Tripolifosfato de Sodio
Z-ave : Zeta average (diámetro hidrodinámico promedio de las nanopartículas)
Z-pot : Potencial zeta de nanopartículas.

1. RESUMEN

Las propiedades fisicoquímicas únicas de las nanoestructuras permiten la generación de nuevos materiales, con versatilidad de aplicaciones y rendimientos mejorados. La aplicación de nanotecnología en producción de alimentos incluye el desarrollo de ingredientes nanométricos, de sistemas de administración de compuestos bioactivos y de envasado innovadores. Las nanopartículas (NPs) de carácter orgánico pueden ser elaboradas por el método de gelificación iónica (GI), y por Atomización Criogénica en Nitrógeno Líquido (Spray Freeze Dispersion; SFD) con el propósito de aumentar la carga de de activos hidrofóbicos. El presente trabajo tuvo por objetivo la fabricación y caracterización de NPs Quitosano-Timol, mediante dos métodos; GI y SFD, y su incorporación en películas de Quitosano-Proteína de Quínoa (Q-PQ), de manera de generar un bionanocompósito para ser utilizado como envase primario comestible de frutillas frescas.

Las NPs generadas por GI mostraron una morfología esférica, con tamaño de $293 \pm 36,9$ nm, potencial zeta de $47,8 \pm 2,8$ mV y predominio de estructura amorfa, mientras que las generadas por SFD son irregulares, altamente porosas, con tamaño de $288 \pm 7,17$, un menor potencial zeta de $19,6 \pm 1,43$, también con predominio de estructura amorfa. En relación a la capacidad antimicrobiana se observó en ambos tipos de NPs un mayor efecto inhibitorio sobre *Salmonella typhimurium* (~3 veces mayor al control), mientras que en *Staphylococcus aureus* el mayor efecto inhibitorio lo obtuvo la aplicación de NPs generadas por SFD (~1,8 veces más que el control). Con respecto a la capacidad antifúngica sobre *Botrytis cinerea* ambos tipos de NPs lograron un 100 % de inhibición del desarrollo miceliar del hongo con diluciones de hasta un 10 % para el caso de NPs QT generadas por GI y de 25 % para el caso de NPs QT generadas por SFD. Salvo en una formulación, la incorporación de 1 y 5 % de NPs no afecta las propiedades mecánicas de las películas, y permiten una mejora en los valores de PVA de hasta un 18,5 %. Por último, fue posible desarrollar recubrimientos comestibles biodegradables que permiten una mejora significativa respecto al control en parámetros de vida útil como pérdida de peso y recuento de hongos y levaduras, sin alterar la firmeza ni las características organolépticas de las mismas.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Quitosano

El quitosano (Q) es un polisacárido que se encuentra en estado natural en casi un tercio del total de la pared celular de algunos hongos (Agulló et al., 2003); sin embargo, su principal fuente de obtención es mediante la desacetilación de la quitina (Agulló et al., 2003; Dutta P., Dutta J. & Tripathi & Dubey, 2004; Ravi, 2000; Vakili et al., 2014). La quitina es el polímero natural más abundante luego de la celulosa, con la que guarda similitudes estructurales y, como ella, funciona naturalmente como un polisacárido estructural, encontrándose en los exoesqueletos de crustáceos; y en menor cantidad en la pared celular de levaduras, hongos y bacterias (Ravi, 2000; Vakili et al., 2014). La quitina es un homopolímero formado por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glucopiranososa (GlcNAc, N-acetil glucosamina) unidas por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4). La quitina constituye una gran fuente de contaminación en las zonas costeras (Dutta P., Dutta J. & Tripathi, 2004). La desacetilación completa de la quitina produce un material totalmente soluble en medio ácido conocido como "quitano". Sin embargo, cuando la desacetilación del material de partida es incompleta se obtiene una mezcla de cadenas que contienen residuos de unidades GlcNAc y 2-amino-2-desoxi- β -D-glucopiranososa (GlcN) unidos por enlaces glucosídicos β (1 \rightarrow 4), cuya relación depende de las condiciones de reacción y que genera quitosanos con distintas propiedades estructurales, físicas, químicas y funcionales (Lárez, 2003; Ravi, 2000).

La solubilidad, biodegradabilidad y reactividad de Q depende de la cantidad de grupos amino protonados en la cadena polimérica de la molécula, por lo tanto, de la proporción de unidades acetiladas y desacetiladas de D-glucosamina. Los grupos amino poseen un pKa de 6,2 a 7,0, por lo que se encuentran completamente protonados en ácidos con pKa menor a 6,2 donde la molécula es soluble. El Q es insoluble en agua, disolventes orgánicos y bases acuosas y es soluble en ácidos tales como acético, nítrico, clorhídrico, perclórico y fosfórico (Becherán, 2011; De Alvarenga, 2011).

El peso molecular (PM) de Q es otro parámetro que afecta a su funcionalidad y bioactividad, depende de las fuentes de obtención y los métodos de preparación, obteniendo menores PM por despolimerización tanto enzimática como química. Los quitosanos comerciales tienen un GD superior al 70 % y un PM que oscila entre 100 kDa y 1.200 kDa (Becherán, 2011).

2.2. Quínoa (*Chenopodium quinoa Willd*)

Con respecto a las características generales de la semilla de quínoa se puede mencionar que, en comparación con la mayoría de los cereales, la quínoa posee un mayor valor nutricional; el contenido de proteína de las semillas varía de un 12 a un 23 % (Abugoch, 2009), constituidas principalmente por albúminas y globulinas (44-77 % de la proteína total), y un inexistente o muy bajo contenido de prolaminas (0,5 a 7 %), por lo que es considerada un alimento sin gluten (Jancurová, et ál., 2009). Presenta un balance de aminoácidos esenciales excelente debido a un mayor espectro de aminoácidos que cereales y legumbres, con elevados niveles de lisina (5,1 a 6,4 %) y metionina (0,4-1,0 %) (Abugoch et al., 2008).

Estudios de la estructura molecular de las proteínas de quínoa permiten caracterizar la proteína de almacenamiento 11S, llamada chenopodina, que representa el 37 % del total de proteínas. La globulina 11S es una proteína hexamérica que consiste en seis pares de subunidades polipeptídicas básicas y ácidas, con masas moleculares de 20-25 y 30-40 kDa, respectivamente, cada par conectados por un puente disulfuro. La chenopodina tiene un alto contenido de glutamina, ácido glutámico, ácido aspártico, asparagina, arginina, leucina, serina, y glicina. De acuerdo con la proteína de referencia de la FAO la chenopodina cumple con los requisitos para leucina, isoleucina, fenilalanina y β tirosina. La otra proteína importante (35 % de proteína total) es una proteína 2S (albúmina), que presenta una masa molecular de 9,8 kDa. La composición de aminoácidos de esta proteína es alta en cisteína, arginina e histidina (Brinegar & Goundan, 1993). El PM de las bandas proteicas y sus subunidades se han determinado mediante electroforesis denaturante (PAGE-SDS), en la que se puede observar una banda en los 54,0 kDa aproximadamente, correspondiente a la globulina, 2 bandas asociadas a las

subunidades ácidas y básicas de las globulinas, que se hacen presentes al momento de agregar un agente reductor (2-mercaptoetanol), alrededor de los 30 KDa y los 20 KDa, respectivamente (Brinegar & Goundan, 1993; Valenzuela, Abugoch & Tapia, 2013).

2.3. Recubrimientos comestibles

2.3.1. Generalidades

Las películas comestibles se definen como una delgada capa de material que puede ser consumida y que proporciona una barrera a la humedad, al oxígeno y al movimiento de aromas y solutos desde el alimento. El material puede ser un recubrimiento o una lámina (o película) independiente (Bourtoom, 2008). Los recubrimientos y películas han sido usados por muchas décadas para proteger a los alimentos del ataque microbiológico y para prevenir la pérdida de agua durante el almacenamiento. En los últimos años, los recubrimientos comestibles han recibido una atención considerable debido a sus ventajas con respecto a las películas sintéticas, como su biocompatibilidad (Vásconez et al., 2009). Por ser biodegradables se presentan como una alternativa para reducir la generación de desperdicios (Almenar et al., 2008), ya que, incluso si las películas no se consumen, se degradan más fácilmente que los materiales sintéticos (Bourtoom, 2008).

Pueden ser producidos a partir de distintos materiales con capacidad de formación de película; de manera general, se pueden clasificar en tres categorías: hidrocoloides (como algunas proteínas y polisacáridos), lípidos (como los ácidos grasos, triglicéridos y ceras) y compósitos de naturaleza heterogénea, que consisten en una mezcla de polisacáridos, proteínas y/o lípidos. El objetivo de producir películas de tipo compósitos es mejorar la permeabilidad y las propiedades mecánicas de los ingredientes por separado, en base a lo que requiera la aplicación específica. Estas películas heterogéneas se aplican en forma de emulsión, suspensión, a través de la dispersión de los componentes no miscibles, en capas sucesivas (revestimiento multicapa), o en forma de solución en un solvente común y pueden ser utilizados para el envasado individual de porciones pequeñas de alimentos, en particular de

productos que actualmente no se envasan individualmente, como las frutas (Bourtoom, 2008).

Estudios recientes se han enfocado en optimizar las condiciones bajo las cuales se elaboran las películas para así mejorar sus propiedades mecánicas (deformación, resistencia a la ruptura, adhesividad) y de barrera. Para las aplicaciones tanto de envasado como de recubrimiento, el control de la permeabilidad al agua y a gases (oxígeno y dióxido de carbono) es una característica que tiene mucha influencia en la estabilidad de los alimentos durante el almacenamiento (Viroben et al., 2000). Los polisacáridos (almidón, carragenatos, pectina, Q), son capaces de formar una matriz estructural, algunos de estos también funcionan como plastificantes y en cuanto a la permeabilidad, las películas elaboradas con polisacáridos generalmente presentan buenas barreras a la humedad y propiedades mecánicas moderadas. En general proteínas como colágeno, gelatina, gluten de trigo, aislados proteicos de soya, proteínas de la leche, aislados proteicos de quínoa presentan barreras más débiles que los polisacáridos al vapor de agua, pero, por otro lado, desarrollan muy buenas propiedades de barrera al oxígeno y propiedades mecánicas que son muy favorables para recubrir alimentos (Abugoch et al., 2011, Cunningham et al., 2000; Ferreira et al., 2009, Villamán, 2007).

Las propiedades de barrera recién mencionadas son las principales propiedades funcionales con las que debe cumplir una película o recubrimiento, además, existen otras características funcionales de suma importancia con las que debe cumplir este tipo de envase como: características sensoriales aceptables, estabilidad microbiológica, bioquímica y fisicoquímica adecuadas, inocuidad, que dicho recubrimiento sea un buen medio para la adición de distintos aditivos, y, en lo técnico-económico, que las materias primas sean de bajo costo y que su tecnología de elaboración sea simple (Villamán, 2007).

2.3.2. Recubrimientos Comestibles como Envases Activos Antimicrobianos

La mayoría de las veces, los agentes antimicrobianos se añaden directamente sobre los alimentos, pero su actividad puede ser inhibida por numerosos factores del propio alimento, disminuyendo su eficiencia (Ouattara et al., 2000). En tales casos, el uso de películas o recubrimientos antimicrobianos puede ser más eficiente, ya que puede diseñarse una migración selectiva y gradual desde el envase a la superficie de los alimentos, de tal modo se mantiene una alta concentración en el tiempo (Durango, Soares & Andrade, 2006).

A la fecha se reporta ampliamente la utilización de Q como material base para la elaboración de películas y recubrimientos, en el caso particular de alimentos frescos se ha reportado que la aplicación de Q permite disminuir la frecuencia respiratoria e inhibe el crecimiento microbiano, el trabajo de Durango, Soares & Andrade (2006), muestra el efecto de recubrimientos comestibles en base a almidón y Q sobre el control de microorganismos en zanahorias mínimamente procesadas; los recubrimientos de almidón + 1,5 % de Q mostraron disminuciones de aerobios mesófilos, mohos y levaduras de 1,34; 2,50 y 1,30 ciclos logarítmicos, respectivamente, comparados con el control. La presencia de 1,5 % de Q inhibió el crecimiento de coliformes y bacterias ácido lácticas durante todo el período de almacenamiento.

En el estudio de Valenzuela et al., (2015) se trabajó con recubrimientos basados en Q, proteína de quínoa (PQ) y aceite de maravilla (como agente hidrofóbico), en todos los días de análisis las frutillas recubiertas con Q, Q-PQ y Q-PQ-aceite, presentaron niveles significativamente menores de recuentos de hongos y levaduras. Además, las frutas recubiertas con Q-PQ-aceite permite disminuir en un 60 % la tasa de emisión de CO₂ con respecto al control sin recubrimiento y en el análisis sensorial se pudo comprobar que la aplicación del recubrimiento permite retener la calidad sensorial total de las frutillas.

Para frutillas es importante destacar al hongo fitopatógeno conocido comúnmente como “hongo gris” (*Botrytis cinerea*), uno de los principales microorganismos que

afecta a frutas almacenadas en frío en post cosecha, en ese contexto se puede citar el trabajo de Badawy & Rabea (2009) con tomate, quienes demostraron *in vitro*, que la actividad antifúngica de Q aumenta a medida que su peso molecular disminuye. Además, en estudios *in vivo*, los tratamientos de Q redujeron significativamente la incidencia de *Botrytis cinerea* a concentraciones de 2.000 y 4.000 ppm. Los resultados revelan que altas dosis de Q se relacionan con baja incidencia de hongo gris independiente de las condiciones de almacenamiento y que además de las propiedades antifúngicas, permite un aumento significativo de los compuestos fenólicos totales y una disminución de la actividad de polifenoloxidasas. A partir de estos resultados los autores sugieren que los efectos del Q sobre este hongo pueden estar asociados con propiedades fungicidas directas, y con la estimulación de respuestas de defensa en la fruta. El efecto inhibitorio de Q sobre el pardeamiento enzimático es probablemente una consecuencia de la capacidad de acción de las cargas positivas del polímero directamente sobre la enzima (efecto quelante por su capacidad para eliminar iones metálicos, como cobre y hierro, que se encuentra en los sitios activos de la enzima), sus sustratos o productos (Badawy & Rabea, 2009).

Por último, es importante mencionar que la quitina y Q tienen muy baja toxicidad, la DL50 de Q en ratones de laboratorio es de 16 g/kg de peso corporal, cercana a la del azúcar o sal (Agnihotri, Mallikarjuna & Aminabhavi, 2004).

En el trabajo de Abugoch et al., (2011) se obtuvieron películas de Q-PQ sin la necesidad de añadir un plastificante, además se pudo comprobar que las interacciones entre la PQ y Q se deben principalmente a puentes de hidrógeno y que esta interacción determina diferencias en las propiedades fisicoquímicas si se comparan con las de películas de Q solo; las películas de PQ/Q (1/1 v/v) presentan mayor espesor, muestran una elongación al corte significativamente mayor (indicador del efecto plastificante de la PQ), y son más hidrofílicas que películas de Q, lo que lleva al inconveniente de que presenten elevadas permeabilidades al vapor de agua, este hecho hace necesario desarrollar nuevas alternativas tendientes a controlar esta característica, una estrategia es la incorporación de aceite al sistema para aumentar la hidrofobicidad de la película y así disminuir su permeabilidad, en ese sentido se enmarca el trabajo de Valenzuela, Abugoch & Tapia, (2013), quienes desarrollaron

películas de Q-PQ (1/1 v/v) y aceite, observando una menor permeabilidad al vapor de agua (PVA) de estas películas con respecto a las de Q-PQ sin aceite, esto debido a la presencia de masas hidrofóbicas en la superficie de las películas, sin embargo la incorporación de aceite lleva a una disminución del alargamiento porcentual y permeabilidad al oxígeno, además la aparición de microfaturas en la superficie de las películas con adición de aceite demuestra que éstas son más frágiles que aquellas que no incluyen este material en su formulación.

A partir de lo anterior es necesario desarrollar nuevas estrategias para el control de la PVA de los recubrimientos comestibles para aplicación en frutas; como la nanotecnología, que se presenta como una herramienta novedosa y eficaz para permitir la disminución de la PVA de las películas a través del aumento de la tortuosidad de los caminos por los que se introducen los electrolitos y resto de sustancias que atraviesan la película (de Moura et al., 2009).

2.4. Agentes Naturales Antimicrobianos

Los fungicidas sintéticos utilizados tradicionalmente como los organofosforados y carbamatos proporcionan el principal medio para el control de las pérdidas post-cosecha por hongos en frutas y hortalizas (Tripathi & Dubey, 2004). Dado que ha aumentado la conciencia de los consumidores y la preocupación con respecto al uso de aditivos químicos sintéticos (Holley & Patel, 2005), el objetivo de investigaciones recientes se centra en el desarrollo y la evaluación de diferentes estrategias de control alternativas, como la preservación a través de aditivos naturales (Tripathi & Dubey, 2004).

Los sistemas antimicrobianos naturales pueden clasificarse por su origen animal, vegetal y microbiano. El primero de estos grupos incluye proteínas, enzimas como la lisozima, lipasas y proteasas y polisacáridos como el quitosano. El segundo grupo incluye compuestos fenólicos provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores; ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas, mientras que el tercer grupo incluye compuestos producidos por microorganismos (Beuchat, 2001). Los aceites esenciales (volátiles) presentes en plantas comestibles (y medicinales),

tradicional y ampliamente utilizadas como aromatizantes, pueden extender la vida útil el tiempo de conservación de los alimentos mediante la reducción de la tasa de crecimiento o la viabilidad microbiana (Holley & Patel, 2005).

La ventaja de los aceites esenciales es su bioactividad en la fase volátil, una característica que los hace atractivos como agentes para aplicación mediante atomización en productos almacenados. Se cree que estos aceites esenciales desempeñan un papel de defensa en las plantas desde donde se extraen, contra microorganismos fitopatógenos (Holley & Patel, 2005). El mecanismo de acción propuesto para los aceites esenciales se basa en su hidrofobicidad; lo que les permite la separación de los lípidos de la membrana celular de los microorganismos; desestabilizándola y haciéndola más permeable, con la consiguiente salida de elementos intracelulares (García et al., 2008), con efectos bacteriostáticos y/o bactericidas dependiendo del activo antimicrobiano utilizado, el microorganismo ensayado, la dosis, forma de aplicación, entre otros.

Hammer, Carson & Riley (1999) evaluaron la actividad de 52 extractos y aceites vegetales contra distintos microorganismos, encontrando la concentración mínima inhibitoria más baja para aceite esencial de tomillo (0,03 % v/v) contra *Candida albicans* y *Escherichia coli*. Klaric et al., (2006), describe como uno de los principales componentes del aceite esencial de tomillo al timol, el que mostró una actividad inhibitoria *in vitro* contra los hongos ensayados (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Rhizopus* y *Mucor*) tres veces superior al aceite esencial de tomillo.

Durante el almacenamiento y distribución de frutillas, se reconocen dos hongos como los principales agentes patógenos responsables de pérdidas postcosecha: *Rhizopus stolonifer*, las esporas de este hongo generalmente se encuentran presentes en el aire y se propagan fácilmente, sin embargo este hongo no crecerá a temperaturas inferiores a 5 °C, por lo que el método más simple de control es el manejo de la temperatura (Mitcham, Crisosto & Kader, 2013). *Botrytis cinerea*: hongo que aún sigue creciendo a 0 °C, temperatura cercana a la temperatura recomendada de 0,5 a 4°C para el manejo de almacenamiento de berries frescos (Mitcham, Crisosto &

Kader, 2013), por lo que es necesario controlar su desarrollo para prolongar la vida útil del fruto durante la postcosecha.

En el caso particular de *Botrytis cinerea* se puede citar el trabajo de Chu, et al. (1999), quienes trabajaron en cerezas inoculadas con *B. cinerea* sometidas a fumigación con timol a una concentración de 30 mg L⁻¹, donde después de 10 semanas de almacenamiento se redujo la pudrición en los frutos tratados con timol (35 % de pudrición en frutos no tratados a un 0,5 % en cerezas fumigadas con timol). En base a estos antecedentes es que se seleccionó como segundo agente antimicrobiano a nanoparticular e incorporar en los recubrimientos al timol.

El timol se ha utilizado como medicamento, ingrediente y conservante de alimentos y bebidas. Se registró inicialmente como plaguicida en los EE.UU. en 1964, pero actualmente la FDA (Food and Drug Administration of USA) acepta el timol, el aceite esencial de tomillo y el tomillo (como especia) como aditivo y/o ingredientes para consumo humano (Tripathi & Dubey, 2004). Posee una masa molecular de 150,22 g/mol y una baja solubilidad en agua (0,98 g/l en agua a 25 °C) y una elevada solubilidad en solventes lipídicos (1.000 g/l etanol a 25 °C), su baja toxicidad queda de manifiesta al observar sus altas dosis letales 50 en ratas (LD50 oral 980 mg/kg y dérmica > 2000 mg/kg) lo que le dan el reconocimiento Gras (Generally Recognised As Safe) a nivel internacional (Panreac et al., 2014; Sigma-Aldrich, 2014).

Otro agente natural antimicrobiano a utilizar en esta tesis es Q, el cual presenta actividad antimicrobiana contra diferentes grupos de microorganismos. El mecanismo de acción de Q se debería mayormente a la adhesión directa del polímero sobre el microorganismo; donde los grupos amino cargados positivamente interactúan con las cargas negativas de la membrana celular microbiana, provocando fugas de componentes intracelulares (Appendinia & Hotchkiss, 2002), cambios en la permeabilidad, alteraciones metabólicas, y finalmente la muerte del microorganismo (Durango, Soares & Andrade, 2006). Este efecto depende de la técnica de aplicación, ya que el Q es más disponible en una solución de revestimiento que en una película (Vásconez et al., 2009) y otros factores como

masa molecular del Q utilizado y grado de desacetilación (GD) (Devlieghere, Vermeulen & Debevere, 2004; Rabea et al., 2003).

Se reporta el efecto de Q como recubrimiento en frutillas almacenadas a 13 °C, los frutos se inocularon con suspensiones de esporas de *Botrytis cinerea* o *Rhizopus stolonifer* y posteriormente se recubrieron con soluciones de Q (en dosis de 10 - 15 mg/mL). Después de 14 días de almacenamiento, el deterioro causado por *Botrytis cinerea* o *R. stolonifer* se reduce significativamente por el recubrimiento de Q (El Ghaouth, 1992). En un estudio similar llevado el 2004 por Devlieghere, Vermeulen & Debevere, se observó que la tasa de respiración de frutillas con recubrimiento de Q al 2 % (p/v) fue mayor que las no tratadas. El análisis microbiológico mostró una descontaminación inmediata debido a que en el día 0 la carga microbiológica fue significativamente inferior en las muestras tratadas. Los tratamientos resultaron también en una disminución del recuento total de aerobios psicrotrofos durante el período de almacenamiento, con respecto a la actividad antifúngica, Q se mostró eficaz en la reducción del desarrollo de hongos durante el período de almacenamiento, con valores más bajos en comparación con las frutillas control.

2.5. Frutillas

La frutilla es el fruto comestible de la planta perenne del mismo nombre, perteneciente a la familia de las Rosáceas. El fruto, estructura de importancia comercial de la frutilla, es mal llamado de esta manera, ya que corresponde a un etéreo; un receptáculo floral hipertrofiado carnoso que presenta una gran cantidad de aquenios (frutos secos). Esta característica hace que la frutilla se clasifique como un poliaquenio (ya que alberga muchos frutos o “semillas”). La forma del etéreo es variable con tendencia a la forma cónica redondeada y su coloración varía entre rosa y violeta (Barioglio, 2006).

Desde un punto de vista comercial, no botánico, y nutricional, la frutilla se clasifica dentro de los berries; grupo de frutos de reducido tamaño y ricos en pigmentos antioxidantes de tipo antocianinas, donde también se encuentran el arándano, las frambuesas, la mora, la grosella, entre otros. Dentro de este grupo, la frutilla es la de

mayor importancia en el mercado mundial, con una superficie cercana a las 230 mil ha, y una tendencia al crecimiento constante. En Chile la frutilla es una especie frutal de amplia difusión, porque sus numerosas variedades se adaptan a diversas condiciones agroclimáticas. El área plantada, que se estima entre 800 y mil ha, se encuentra a lo largo de todo el país, pero se localiza mayoritariamente en la Región Metropolitana, con sobre 40% de la superficie total. Entre las variedades destacan Chandler, Pájaro, Selva F1, Fern y, más recientemente, Camarosa y Seascape. En la actualidad Camarosa sería la variedad de mejores condiciones organolépticas y mayor demanda (Ferrada, 2002). El cultivo se caracteriza por su condición de planta bianual y una alta demanda de mano de obra, lo que la hace una interesante alternativa para la pequeña agricultura (Ferrada, 2001). Chile tiene una escasa participación en la producción y en el mercado mundial de frutillas (1%), siendo un producto de alto consumo en los países del hemisferio norte, donde destacan EE.UU., México, España y Polonia, por mencionar algunos de los grandes oferentes. Sin embargo, las condiciones agroclimáticas y su localización en el hemisferio sur, permiten a Chile obtener elevados rendimientos y alta calidad, pudiendo aprovechar ciertos nichos de mercados de fruta fresca y una colocación programada y oportuna de volúmenes crecientes de producto congelado (Pefaur, 2014).

En el año 2013 se produjeron en nuestro país 56.276 toneladas de frutillas, de las cuales el 65 % se destinó al consumo interno (90 % fresco y 10 % congelado) y 35 % fueron a exportación (77 % como congelado, 16 % en fresco y el resto en jugos y conservas) (Pefaur, 2014). La frutilla fresca es la principal forma de comercialización de este fruto y registra una tasa media anual de crecimiento de 3,6 %. A nivel mundial la producción de frutillas ha crecido 13 % en los últimos años, alcanzando 4.516.810 toneladas en el año 2012. El principal productor es Estados Unidos, con 1.366.850 toneladas, de ellas, el 80 % se destinó a mercado fresco (Pefaur, 2014).

Los antecedentes anteriores denotan la importancia de desarrollar tecnología y nuevas estrategias para el manejo en fresco de frutillas que permitan mantener y prolongar su calidad nutricional y organoléptica. El desafío se presenta al ser una de las frutas más perecederas y susceptible de deterioro fúngico y mecánico por lo que el producto fresco tiene una vida útil restrictiva (alrededor de 5 días almacenadas

entre 0 - 4°C) (Mitchell et al., 1996). Al corresponder a un fruto no climatérico debe ser cosechada una vez alcanzada la maduración, además se caracteriza por poseer una elevada tasa respiratoria, éste metabolismo acelerado lleva en ocasiones a deterioro autolítico incluso antes que al decaimiento por microorganismos (Mitchell et al., 1996). La frutilla presenta una epidermis delgada y gran porcentaje de agua, lo cual la hace muy perecible y expuesta al deterioro causado por daño mecánico o microbiológico. Por ello, el manejo de cosecha y postcosecha debe ser cuidadoso, para obtener una fruta de buena calidad. La maduración de los frutos, en muchos casos, se acompaña de ablandamiento, degradación de carbohidratos poliméricos, especialmente de la pectina y celulosa, debilita las paredes celulares y las fuerzas cohesivas que mantienen a las células unidas a las otras, siendo las causas que provocan el ablandamiento. En las primeras etapas de maduración del fruto su textura y consistencia son óptimas; durante la maduración la sustancia adherente de las células, la propectina, va degradándose junto con las sustancias pécticas, lo cual altera la textura y la consistencia del fruto. Además, en la maduración se expresan muchas enzimas relacionadas con la pared celular que modifican la plasticidad de la pared (Pinzón, Fischer & Corredor, 2007).

Se han aplicado recubrimientos comestibles en frutillas, elaborados a partir de componentes poliméricos naturales (Hernández-Muñoz et al., 2008); capaces de aumentar su vida postcosecha, debido a que actúan modificando la atmósfera interna de las frutas, bloqueando parcialmente los estomas y reduciendo la difusión de gases por la respiración. En el caso particular de recubrimientos comestibles de quitosano-proteína de quínoa sobre frutillas la publicación de Valenzuela et al., (2015) reporta un aumento de la vida útil de las frutillas recubiertas con respecto al control, atribuible principalmente al efecto antimicrobiano de quitosano, las frutillas recubiertas mostraron una buena aceptación por parte del panel sensorial, sin embargo dichos recubrimientos presentan elevadas tasas de permeabilidad al vapor de agua y cuando se asocian con aceite para contrarrestar este hecho se vuelven frágiles y quebradizas. Los antecedentes anteriores justifican el desarrollo de la presente tesis, como forma de mejorar las propiedades mecánicas y de permeabilidad de los recubrimientos comestibles de quitosano-proteína de quínoa a través de la incorporación de nanopartículas en su formulación.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

Se propone la incorporación de nanopartículas de agentes antimicrobianos naturales a recubrimientos fabricados en base a proteínas de quínoa y quitosano, a partir de lo que se postula:

1º La incorporación de nanopartículas a la mezcla filmógena permite disminuir la permeabilidad al vapor de agua de los recubrimientos, sin alterar las propiedades mecánicas de los mismos.

2º La aplicación de los recubrimientos con adición de nanopartículas sobre frutillas, permite mejorar su vida útil, manteniendo las propiedades organolépticas de los frutos.

3.2. OBJETIVOS

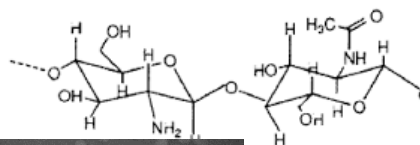
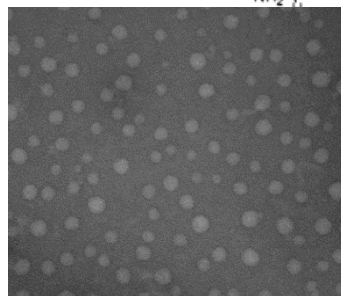
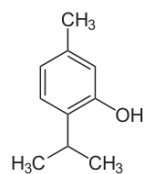
3.2.1. OBJETIVO GENERAL

Diseñar y evaluar recubrimientos comestibles en base a quitosano y proteínas de quínoa cargadas con antimicrobianos naturales nanoparticulados.

Evaluar la aplicación de los recubrimientos sobre frutillas como método para mejorar parámetros de su vida útil.

3.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Objetivos capítulo 1 : Determinar las condiciones de elaboración de nanopartículas por gelificación iónica (GI) y por atomización criogénica en nitrógeno líquido (SFD) y su caracterización.
- Objetivos capítulo 2 : Determinar las condiciones de incorporación de nanopartículas a películas comestibles, determinación de sus propiedades mecánicas, de barrera y estructurales.
- Objetivos capítulo 3 : Aplicar recubrimientos comestibles cargados con nanopartículas en frutillas frescas y evaluación sensorial y de parámetros de vida útil en refrigeración.



CAPÍTULO 1 CONDICIONES DE ELABORACIÓN DE NANOPARTÍCULAS POR GELIFICACIÓN IÓNICA Y CONGELACIÓN POR ATOMIZACIÓN EN NITRÓGENO LÍQUIDO Y SU CARACTERIZACIÓN

4.1 Introducción

La nanotecnología se define como el conocimiento, control y reestructuración de la materia a escala nanométrica para la generación de materiales con propiedades y funcionalidad novedosa (Sanchez & Sobolev, 2010). Por su parte, las nanopartículas se definen como partículas sólidas de tamaño en el rango de 10 -1000 nm (Hung & Lee, 2007). La justificación del gran desarrollo de esta ciencia en los últimos años radica en que a nanoescala las fuerzas e interacciones intra e intermoleculares, definen las interacciones que ocurren en el comportamiento del material a nivel macroscópico (Sanchez & Sobolev, 2010). Debido a esto, la nanotecnología abre nuevas potencialidades para los materiales con alternativas novedosas, que además presentan propiedades mecánicas, térmicas y eléctricas únicas. Por otro lado, los avances en la caracterización instrumental de la materia a nanoescala permite en la actualidad obtener información sin precedentes sobre los materiales que permiten conocer de antemano las propiedades, el comportamiento y la durabilidad de materiales nanoestructurados (Sanchez & Sobolev, 2010).

La generación de nanocompuestos involucra dos caminos principales: 1) El método descendente (“top down”) , que consiste en la reducción de tamaño de estructuras de mayor tamaño a la escala nanométrica, y 2) El método ascendente (“bottom-up”) o “manufactura molecular” donde los materiales son diseñados desde su componentes atómicos y moleculares a través de un proceso de ensamblado (Sanchez & Sobolev, 2010).

Las nanopartículas a base de quitosano se forman de acuerdo a la aproximación de tipo ‘bottom-up’ como resultado de procesos de auto-asociación o entrecruzamiento en virtud de los cuales las cadenas poliméricas se ordenan en estructuras nanoscópicas ya sea por interacciones inter o intramoleculares de tipo covalente o no covalente. En estas nanopartículas o nanoesferas de Q el activo puede ser atrapado o ligado a la matriz polimérica sólida (o semi-sólida) (Goycoolea, Remuñán-López & Alonso, 2009).

Con respecto a los métodos de fabricación, las nanopartículas se han preparado frecuentemente a partir de tres técnicas: (1) la dispersión de polímeros preformados,

(2) la polimerización de monómeros, y (3) la gelificación iónica o coacervación de los polímeros hidrofílicos (Agnihotri, Mallikarjuna & Aminabhavi, 2004). Sin embargo, otros métodos tales como la tecnología de fluidos supercríticos o el sistema de atomización criogénica (SFD; spray freeze dispersion) también se han descrito en la literatura (Cheow et al., 2011; Gamboa et al., 2015).

Una de las estrategias de fabricación de nanopartículas quitosano-tripolifosfato (QTPP) mediante coacervación compleja es la descrita inicialmente por Calvo et al., (1997); mediante este procedimiento se obtienen nanopartículas de un diámetro variable, dependiendo de la concentración del polímero y la relación de QTPP. La reacción se esquematiza en la Figura 1; las nanopartículas se forman por la interacción de los grupos amino libres cargados positivamente de Q con los grupos fosfato del TPP cargados negativamente:

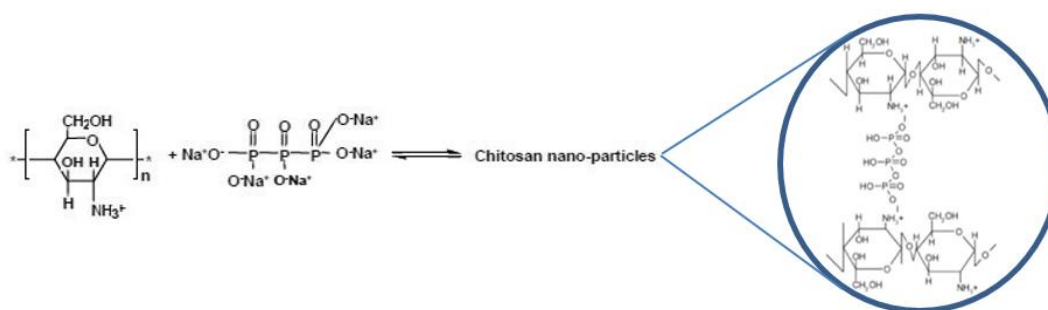


Figura 1. Esquema de la reacción de gelificación iónica de quitosano y tripolifosfato de sodio.

Otro método para generar las nanopartículas que se abordará en este trabajo es el método de congelación por atomización en nitrógeno líquido o SFD por sus siglas en inglés (“spray freeze dispersion”), que se define como un método de atomización criogénico, en el que una solución acuosa, orgánica, cosolvente-orgánica-acuosa, emulsión acuosa-orgánica, o una suspensión que contiene un principio activo es atomizada directamente en un líquido criogénico (nitrógeno líquido) con el objetivo de producir un nanomaterial congelado, las ventajas de este método resultan de la intensa atomización y la rápida tasa de congelación, siendo una técnica que se caracteriza por aumentar la solubilidad de productos de naturaleza oleosa (Hu, Johnston & Williams, 2003).

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Materiales:

Quitosano de bajo peso molecular (LMW), SIGMA-ALDRICH (USA), código C-3646, cuya fuente es caparazón de cangrejo con un GD de 78,3 % y un peso molecular viscosimétrico de 269 kDa.

Timol, SIGMA-ALDRICH, T0501.

Pluronic F-127, SIGMA-ALDRICH, P2443.

Tert-butanol, MERK, Index-No: 605-005-00-1.

Tripolifosfato de sodio (TPP), (85 %), No: 238503.

Nitrógeno líquido provisto por la empresa Clean Ice S.A.

Soluciones de trabajo:

- Solución tripolifosfato de sodio: Para la preparación de 100 mL de solución de TPP 0,1 % p/v se agregaron 100 mg de TPP a 100 mL de agua destilada y se agitó hasta disolver completamente el soluto.
- Solución de Q 0,3 % p/v en ácido cítrico (AC) (Sol. Q): Se preparó 1L de una solución de ácido cítrico 0,1 M. Posteriormente, se agregó 3 g de quitosano de bajo peso molecular, de modo de obtener una concentración de 3 mg/mL. Se dejó con agitación magnética (Hot plate Stirrer LABTECH, Model LMS-1003) 16 horas a temperatura ambiente.
- Solución Q al 0,3 % p/v en AC y T al 0,1 % p/v en agua destilada (Sol. QT): Se preparó 1L de solución de timol a una concentración de 1 mg/mL en agua destilada. Se dejó con agitación magnética toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución de timol obtenida se usó como solvente sobre el cual se siguieron los pasos descritos en la metodología anterior.
- Solución Cosolvente (Sol. QTTP): Para la preparación de 100 mL de solución cosolvente compuesta por solución quitosano 0,3 % p/v en AC/tert-butanol (en relación v/v 9:1) cargada con timol y pluronic F-127, ambos a concentración de 0,5 mg/mL. En primer lugar se añadió 50 mg de pluronic F-127 a 90 mL de la solución de Q 0,3 % p/v en AC descrita previamente. Luego se mezcló con

agitación magnética a temperatura ambiente, durante 20 min. Posteriormente se preparó una solución de timol a concentración de 5 mg/mL, en 10 mL de tert-butanol, para llevarla a concentración final mediante la mezcla con la solución de quitosano y pluronic preparada (en relación v/v quitosano/tert-butanol 9:1), bajo agitación magnética, a temperatura ambiente y por un periodo de 30 minutos.

- Solución Cosolvente QTTP en ácido acético (AA): Para la preparación de 100 mL de solución cosolvente quitosano 0,3 % en ácido acético 1 %/tert-butanol (en relación v/v 9:1) cargada con timol y pluronic F-127, ambos a concentración de 0,5 mg/mL, en primer lugar se añadió 50 mg de pluronic F-127 a 90 mL de la solución de quitosano 0,3 % p/v en AA 1 %. Luego se mezcló con agitación magnética a temperatura ambiente, durante 20 min. Posteriormente se preparó una solución de timol a concentración de 5 mg/mL, en 10 mL de tert-butanol, para llevarla a concentración final mediante la mezcla con la solución de quitosano y pluronic preparada (en relación v/v quitosano/tert-butanol 9:1), bajo agitación magnética, a temperatura ambiente y por un periodo de 30 minutos.

4.2.2 Fabricación de nanopartículas mediante gelificación iónica

Las nanopartículas se prepararon mediante gelificación iónica (GI) de Q con TPP basado en el método de Calvo et al., (1997) con modificaciones. El proceso se esquematiza en la Figura 2; 100 mL de la solución de Q o QT (solvente ácido cítrico) se gotea hacia 50 mL de la solución de TPP 0,1 % bajo agitación constante, por medio de una bomba de infusión (modelo KDS200, KD Scientific©) usando 2 jeringas de 50 mL, con aguja de 25 Gauge (diámetro externo: 0,51 mm; diámetro interno: 0,26 mm) a un flujo de 1,8 mL/min. La dispersión obtenida se centrifugó a 21.000 x g a 14°C por 30 min (centrifuga HermLe modelo Z32K). La concentración de polímero en solución, la relación en masa Q/TPP y el tiempo de centrifugación utilizados se determinaron a partir de ensayos preliminares (resultados no mostrados); buscando obtener nanopartículas de bajo tamaño (menor a 500 nm); con bajo índice de polidispersidad (Pdl) (menor a 0,6) y potencial zeta positivo.

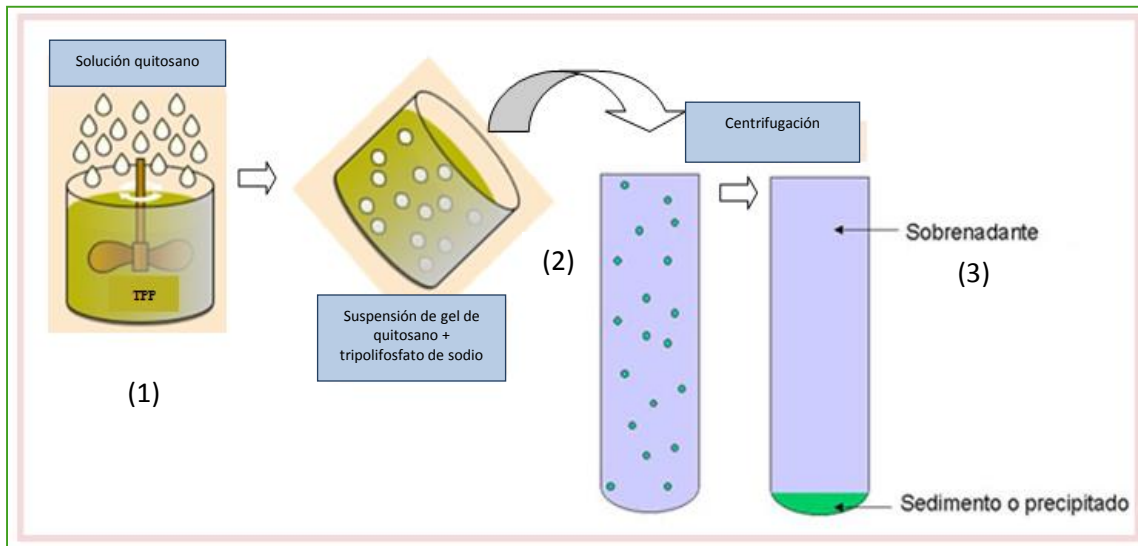


Figura 2. Esquema proceso de fabricación de nanopartículas mediante gelificación iónica de quitosano con tripolifosfato. 1) Goteo de la solución de quitosano (o quitosano-timol) sobre la solución de tripolifosfato de sodio. 2) Separación de la población de nanopartículas de la de micropartículas y/o agregados de mayor tamaño mediante centrifugación 3) Recuperación de nanopartículas desde el sobrenadante.

4.2.3 Fabricación de nanopartículas mediante congelación por atomización en nitrógeno líquido

La metodología fue adaptada desde trabajos previamente reportados (Engstrom et al., 2007 a y b; Gamboa et al., 2015); y se esquematiza en la Figura 3; para ello 30 mL de solución de Q, QT (solvente ácido cítrico) o solución cosolvente QTTP (solvente ácido cítrico o acético) se apartan en un vaso precipitado de 100 mL, alimentando a la bomba HPLC (Waters, modelo 510), la cual se conectó a una manguera PEEK achatada en un extremo para producir la aspersion de la solución. Dicha atomización se produjo sobre la superficie del N₂ líquido, a una distancia de alrededor de 7 cm, bajo agitación magnética, a una velocidad de flujo y presión constante (7,0 mL/min a 3000 psi). Una vez que se pulverizó toda la solución, se extrajo el sólido congelado obtenido en una placa de Petri de polietileno de baja densidad de 13,5 cm de diámetro para su liofilización.

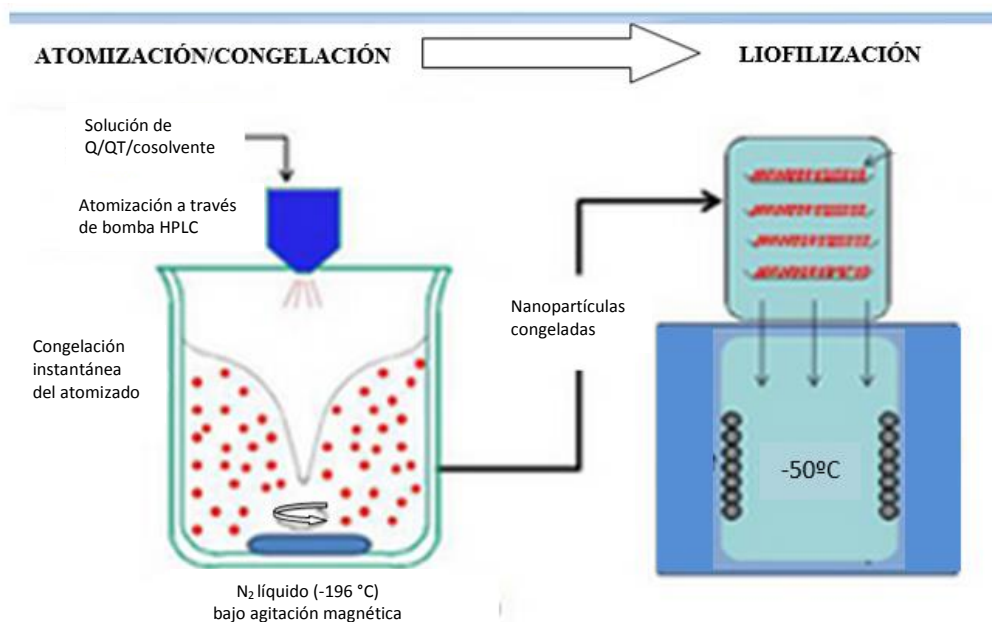


Figura 3. Esquema proceso de fabricación de nanopartículas mediante atomización criogénica en N₂ líquido

El producto liofilizado se sometió a procedimientos de purificación con el objetivo de separar micropartículas y/o agregados de las NPs, para ello el material liofilizado se sometió a molienda en mortero de porcelana, y se sometió a uno o más de los siguientes tratamientos: 1) tamizaje mediante tamiz de malla 400-38 μm , 2) se prepararon suspensiones con NPs en agua destilada (1 mg/mL) y se sometieron a doble microfiltración por membrana de 1,2 y 0,45 micrones, 3) se prepararon suspensiones con NPs en agua destilada (1 mg/mL) y se llevaron a agitación (Shaker Polyscience Dual Action, 042901) durante 30 minutos un a temperatura 25 °C y 180 rpm, 4) se prepararon suspensiones de NPs (1 mg/mL) y fueron sometidas a ultrasonido por 30 minutos, con una amplitud de onda de 80 %, con pulsaciones cada 30 segundos, una temperatura máxima de 51 °C y sonda de diámetro 12,7 mm (Ghosh et al., 2013).

4.2.4 Caracterización de las nanopartículas

Determinación de diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad y potencial zeta de las nanopartículas

Las NPs se caracterizaron en términos de tamaño promedio (Z-average), Índice de Polidispersidad (Pdl) y potencial zeta (Z-pot), a través de difracción de luz dinámica en un Zetasizer (modelo NanoS4700, Malvern Instruments©), para ello se tomaron muestras de suspensión acuosa de NPs y se depositan en una cubeta capilar plegada de poliestireno (modelo s90), los análisis en este equipo se llevaron a cabo bajo condiciones estándares (dispersante: agua, T^o: 25°C, laser 633 nm).

Para el caso de NPs obtenidas mediante gelificación ionotrópica la medición se realizó con muestras de sobrenadante fresco, en el caso de NPs obtenidas mediante SFD, se prepararon suspensiones de NPs en agua destilada a una concentración de 1mg/mL, las que se agitaron (Shaker Polyscience Dual Action, 042901) durante un día a temperatura ambiente y posteriormente se sometieron a sonicación (Sonicador Power Sonilyos; a máxima potencia y temperatura ambiente por una hora).

Determinaciones de rendimiento (RP %, EE %, CC %)

El rendimiento en partículas (RP %) se determinó en base a balance de masas en peso seco, para ello se determinó el contenido de humedad residual de las muestras liofilizadas¹ de NPs en balanza térmica y se realizó el cálculo en base a la siguiente fórmula:

$$RP \% = \frac{\text{masa (mg) nanopartículas obtenidos}}{\text{masa teórica (mg) inicial}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

¹ Liofilización de las muestras: proceso llevado a cabo durante 24 horas; a -51°C y 6,7 Pa de presión. Posterior a ello la muestra se acondiciona mediante molturación en mortero manual y tamizaje por medio de malla n°400.

Para la determinación de la eficiencia de encapsulación (EE %) y capacidad de carga (CC %) (Wattanasatcha et al., 2012) se cuantificó el contenido de timol en el medio de diálisis² a través de espectrofotometría UV a 273 nm, para ello se elaboró una curva de calibración de timol/agua de 0 a 100 ppm y se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$EE \% = \frac{mg \text{ de timol cargado en las nanopartículas}}{mg \text{ inicial de timol agregada}} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

$$CC \% = \frac{mg \text{ de timol cargado en las nanopartículas}}{mg \text{ inicial de nanopartículas}} \times 100 \quad \text{Eq. (3)}$$

Morfología de las nanopartículas

Para la observación mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) suspensiones de NPs se colocaron sobre una grilla de cobre y se observaron en el microscopio de transmisión (Tecnai 12 Bio Twin, Philips, USA), mientras que la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se llevó a cabo con muestras de NPs tratadas con ácido fosfotúngstico al 2 % (p/v) puestas sobre redes de cobre (SPI Supplies, Inc. West Chester, PA, EE.UU.), y secadas durante una noche para posteriormente llevar a la observación el microscopio de barrido (TM tabletop microscope; Software: TM3000, Hitachi, USA) (Castro, Taboada & Mosquera, 2012).

Actividad antimicrobiana de las nanopartículas

Determinación de la zona de inhibición del crecimiento: Se determinó la actividad antimicrobiana de las NPs QT fabricadas por SFD y GI mediante ensayo de difusión basado en el método estándar descrito en la literatura (Sambrook et al., 1989; Bauer et al., 1966) para determinar las zonas de inhibición del desarrollo en mm sobre *S. aureus*, y *S. thyphimurium*. Se utilizó una dosis de 10 µL, sobre un cultivo de 10⁶

² Proceso de Diálisis de las muestras: suspensiones acuosas de NPs se dializan contra agua destilada durante 24 horas a través de membrana de diálisis marca Sigma-Aldrich con tamaño de corte molecular de 12000 Da, alícuotas de 2 mL de sobrenadante se extraen a intervalos constantes de tiempo reponiendo en cada ocasión los mismos volúmenes de agua extraída.

UFC/mL de las cepas mencionadas en un medio Müller Hinton (Merck®). Se usó un disco de diámetro de 6,0 mm, con un espesor de 0,65 mm.

Inhibición del micelio de *Botrytis cinerea*: Se evaluó la actividad antifúngica de dispersiones NPs QT fabricadas por SFD y GI mediante la inhibición del desarrollo radial en placa del micelio del hongo, descrito por Yildirim et al., (2007). Para ello, se tomó de forma estéril con un sacabocado una porción de micelio desde una cepa previamente cultivada durante 5 días a 25 °C, la cual fue depositada en el centro de una placa de agar papa dextrosa mezclada con diluciones de NPs hasta obtener en el agar concentraciones de NPs de 10 % v/v, 25 % v/v y 50 % v/v. Estas placas fueron incubadas durante 6 días a 25 °C, siendo evaluada cada 24 h. La actividad antifúngica fue determinada a través del área de propagación del micelio de las placas que contenían NPs y fueron comparadas con placas de agar que contenían solución QT sin nanopartícula, dispersión de NPs de Q en las mismas diluciones y un cultivo del hongo sembrado en placa sin tratamiento cuya propagación por la superficie de la placa (8,5 cm²), equivalente al 100 % de desarrollo, lo que fue utilizado como parámetro de comparación de crecimiento.

Estabilidad del diámetro hidrodinámico y potencial zeta de las nanopartículas

Se evaluó la estabilidad del valor de diámetro hidrodinámico y del valor de potencial zeta de 2 soluciones de NPs que corresponden a: 1) muestra de 20 mL de sobrenadante obtenido por gelificación iónica, y 2) muestra de 20 mL de dilución 1 mg/mL de NPs liofilizadas obtenidas por SFD. Dichas muestras se almacenaron en frascos de vidrio durante 30 días a 15 °C. El día de análisis las soluciones de NPs se homogenizaron mediante agitación magnética por 5 minutos y posteriormente se tomaron alícuotas de 1 mL de cada muestra para determinación de diámetro hidrodinámico y potencial zeta en equipo Zetasizer (modelo NanoS4700, Malvern Instruments®, USA).

Difracción de rayos X de las nanopartículas

Las muestras se analizaron desde $2\theta = 1,7$ a 80° en un difractómetro (Siemens D-5000, USA), usando una radiación de $\text{CuK}\alpha$ (λ 1.54 Å; 0.02°). El equipo se operó a 30 kV y 16 mA. La cristalinidad se determinó con un programa asociado al equipo (Balú, 2012).

4.2.5. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Como estadígrafos se utilizaron promedio y desviación estándar para realizar el análisis de datos. Se utilizó ANOVA de una y dos vías según fuese necesario, el método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para determinar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el programa StathGraphics Centurion XV (versión 2006).

4.3 Resultados

Estudios preliminares en la fabricación de NPs por los dos métodos de fabricación ensayados (Savé, 2011, Nobeta, 2014), llevaron a la generación de 4 formulaciones que fueron estudiadas comparativamente (presentadas en la Tabla 1). La selección de dichas formulaciones se basó en los siguientes criterios de selección: tamaño hidrodinámico inferior a 1.000 nm, índice de polidispersidad menor a 0,7 y potencial Z positivo (Müller et al., 2001). En el caso del método GI se determinó como condiciones constantes de fabricación una relación Q/TPP de 6:1, tiempo de centrifugación de 30 min a $21.000 \times g$ y recolección de NPs desde el sobrenadante (Savé, 2011 y estudios preliminares de este trabajo no mostrados). Por otro lado, para el caso de la fabricación de NPs por SFD se determinó la utilización de un sistema co-solvente que incluyó tert-butanol y pluronic, en ácido cítrico y/o acético, seguido de un proceso de ultrasonido de alta intensidad.

4.3.1 Diámetro hidrodinámico, índice de polidispersidad y potencial Zeta de nanopartículas de quitosano y quitosano-timol obtenidas por gelificación ionotrópica y congelación atomización en nitrógeno líquido

Los resultados obtenidos de Z-average, Pdl y potencial Z (Pot. ξ) de las nanopartículas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Diámetro hidrodinámico, Índice de polidispersidad y Potencial Zeta de nanopartículas de quitosano y quitosano-timol

N°	Tipo NP	Z-average (nm)	Pdl	Pot. Zeta (mV)
		media \pm DE	media \pm DE	media \pm DE
1	NPs-Q-GI	174,8 ^a \pm 21,4	0,36 \pm 0,09	34,5 ^a \pm 6,4
2	NPs-QT-GI	293,1 ^b \pm 36,9	0,49 \pm 0,03	47,8 ^b \pm 2,8
3	NPs-Q-SDF	326,3 ^b \pm 127,5	0,59 \pm 0,07	31,4 ^a \pm 6,6
4	NPs-QT-SDF	683,8 ^c \pm 88,5	0,56 \pm 0,05	33,8 ^a \pm 0,7

a, b, c : Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Z-average : Diámetro hidrodinámico

Pdl : Índice de polidispersidad

Nm : Nanómetros

mV : Milivoltios

DE : Desviación estándar

Se pudo observar que los valores de Z average oscilaron entre 178,8 a 683,8 nm. En ambos métodos las NPs de Q sin timol presentaron valores significativamente menores ($p < 0,05$). Los valores obtenidos fueron $174,8 \pm 21,4$ nm para NPs de Q sin timol generadas por GI y $293,1 \pm 36,9$ nm para NPs de QT generadas por la misma técnica; por su parte las NPs generadas por SFD presentaron valores de $326,3 \pm 127,5$ nm para NPs Q sin timol y $683,8 \pm 88,5$ nm para NPs de QT. Las NPs obtenidas por medio de GI presentaron diámetros hidrodinámicos significativamente menores ($p < 0,05$) que las obtenidas por el método de SFD.

Los diámetros hidrodinámicos de NPs obtenidas en esta tesis concuerdan con lo publicado en la literatura, ya que para NPs generadas por gelificación iónica de Q y TPP se reportan tamaños promedio entre 170–745 (Calvo, et al., 1997; Fan, et al., 2012; Goycoolea, Remuñán-López & Alonso, 2009; Keawchaoon & Yoksan, 2011; Zhang et al., 2004).

El tamaño de las NPs generadas está dentro de lo esperado dada la masa molecular (MM) del Q utilizado (Q de baja MM = 269 kDa), debido a que las moléculas de Q de baja MM forman cadenas cortas de polímero que pueden penetrar fácilmente al interior de los asociados Q-TPP para generar partículas más densas y pequeñas (Zhang et al., 2004). También se puede hacer mención a la relación Q:TPP utilizada (en este caso se utilizó una relación 6:1), ya que a una proporción mayor de TPP se asocia a suspensiones de NPs más turbias por aglomeración de las mismas (Rampino et al., 2013; Gokce et al., 2014; Woranuch & Yoksan, 2013), dado que el exceso de polianiones de TPP en la mezcla generan un entrecruzamiento entre NPs con el consecuente aumento del tamaño promedio.

Keawchaoon & Yoksan (2011), describen NPs QTPP cargadas con Carvacrol, isómero de timol, cuyo diámetro hidrodinámico para NPs de Q sin activo es de $518,5 \pm 17,1$ nm, a partir de la utilización de Q de 760 kDa MM y una relación Q/TPP de 2,4. En el mismo estudio, las NPs con carvacrol se sintetizaron a partir de la generación de una microemulsión Q, Carvacrol y tween 60, que posteriormente se llevó a gelificación con TPP, a una dosis de incorporación de carvacrol:Q de 0,25:1, las NPs generadas presentaron un diámetro hidrodinámico promedio de 532,5 nm; en esta

tesis las NPs QT obtenidas a partir de GI presentan un resultado significativamente menor ($p < 0,05$) de 293,1 nm. Se deduce que el menor tamaño obtenido se debe principalmente a la menor proporción de TPP utilizada.

Kim et al., (2013) describieron el diámetro hidrodinámico de NPs de QTPP en ácido cítrico de 228,4 nm, valores similares a los encontrados en este estudio. Ellos estudiaron adicionalmente la influencia de las propiedades del solvente de Q en el tamaño de partícula, comparando el uso de soluciones de Q en ácido cítrico y ácido acético, sin encontrar diferencias significativas en el tamaño. En este punto se decidió determinar el efecto del solvente sobre SFD, considerando que estas NPs son liofilizadas al final de su preparación, y de acuerdo a las propiedades del punto de sublimación de ambos solventes se podrían esperar cambios sustanciales en su tamaño (dado que en el proceso de liofilización el solvente ácido acético sublima y el solvente ácido cítrico permanece en la muestra). Por ello, se realizó un experimento adicional obteniendo NPs por SFD de QT con ácido acético como solvente de Q. El valor de Z-average encontrado para NPs obtenidas por SFD para QT con ácido acético fue $288,0 \pm 7,17$ nm, y éste valor comparado con el SFD de QT con ácido cítrico como solvente (683,8 nm) fue 2,4 veces menor, lo cual demuestra que especialmente para este método el solvente utilizado es determinante sobre el tamaño de partícula.

Por lo tanto, se pudo establecer que para la técnica de SFD la generación de NPs de Q utilizando ácido acético como solvente permite obtener tamaños menores que las generadas con ácido cítrico, lo que se podría atribuir a los múltiples grupos citratos presentes en la solución de ácido cítrico que actuarían generando enlaces intermoleculares con los grupos aminos del Q resultando un aumento del tamaño de partículas, y más aún, como fue explicado previamente, la liofilización de la muestra implica que en el caso del solvente ácido cítrico, que no sublima y permanece en las NPs, se favorezca el desarrollo de agregados.

En relación al Pdl de las NPs, en ambos métodos, se pudo observar valores entre 0,36 a 0,59 (Tabla 1), los que son menores a 0,7, valor recomendado por Müller et al., (2001), quienes reportan que a valores de Pdl superiores a 0,7 se encuentra una

importante heterogenicidad de tamaños de las NPs y un alto grado de aglomeración de las mismas.

Los resultados con respecto a la variable potencial zeta de las NPs generadas se observan en la Tabla 1; en primer lugar destacar que todas las formulaciones presentan un valor positivo, característica importante debido a que refleja grupos amino libres cargados positivamente en la superficie de la NP, que quedarán disponibles posteriormente para su asociación con otras moléculas en función de ejercer el efecto deseado (Zhang et al., 2004). Por otro lado, la magnitud del potencial zeta es un indicador de la estabilidad coloidal del sistema; si todas las partículas en suspensión tienen un valor zeta elevado, positivo o negativo, tenderán a repelerse entre sí evitando aglomeración de las mismas (Malvern Instruments, 2005). Partículas con potenciales sobre 60 mV muestran excelente estabilidad, bajo 20 mV es muy limitada y bajo 5 mV presentan una pronunciada agregación (Müller et al., 2001). Los potenciales zeta obtenidos para NPs de Q y QT obtenidas por GI fueron de 34,5±6,4 y 47,8±2,8 mV, respectivamente, mientras que para NPs de Q y QT obtenidas por SFD los valores fueron 31,4±6,6 y 33,8 ±0,7 mV, respectivamente. Rampino et al., (2013), reportan la generación de NPs QTPP con potencial zeta de 25 mV a partir de una relación m/m Q: TPP 5:1 usando Q de bajo peso molecular (150 kDa) en buffer acetato 0,3 M a pH 4.5. El mayor potencial zeta obtenido en nuestro caso se atribuye a la menor proporción de TPP utilizada.

La formulación SFD que utilizó ácido acético como solvente de Q, presentó un potencial zeta significativamente menor ($p < 0,05$) a las formulaciones que utilizan ácido cítrico, con un valor de 19,6 mV promedio, estos resultados concuerdan con lo reportado por Gamboa et al., (2015), cuyas NPs de Q disueltas en ácido acético cargadas con inulina en un sistema cosolvente hexano-pluronic y fabricadas por SFD presentan un potencial zeta promedio de 19,7 mV.

4.3.2 Rendimiento, eficiencia de encapsulación, y capacidad de carga de nanopartículas según tipo de formulación

El rendimiento en partículas (RP %), eficiencia de encapsulación (EE %) y capacidad de carga (CC %) de las formulaciones estudiadas se muestran en la Tabla 2. Los RP % obtenidos oscilaron entre 52 a 90 %, encontrándose un RP % significativamente mayor ($p < 0,05$) en las formulaciones que utilizaron ácido cítrico: con valores de 83,5 % para NPs Q-GI; 71,7 % para NPs Q-SDF; 90,2 para NPs QT-GI y 89,7 para NPs QT-SDF, por su parte la formulación de NPs QT-SFDa (con ácido acético como solvente) presentó un RP % de un $52,5 \pm 1,1$ %. Las diferencias encontradas en el RP % pueden ser explicadas debido a que el ácido cítrico permanece en las NPs obtenidas y llega a significar cerca de un 80 % de la masa total de NPs.

Tabla 2. Rendimiento en partículas eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de nanopartículas de quitosano y quitosano-timol según formulación

N°	Tipo NP	RP %	EE %	CC %
1	NPs-Q-GI	59,94 ^b ±0,92	N/A	N/A
2	NPs-QT-GI	79,52 ^d ±6,09	61,7 ^b ±1,71	2,9 ^c ±0,08
3	NPs-Q-SDF	71,7 ^c ±1,5	N/A	N/A
4	NPs-QT-SDF	89,7 ^d ±1,2	49,8 ^a ±2,2	1,7 ^a ±0,1
5	NPs-QT-SFDa	52,5 ^a ± 1,10	91,2 ^c ± 0,17	6,7 ^b ± 0,01

RP %: porcentaje de rendimiento en partículas

EE %: porcentaje de eficiencia de encapsulación

CC %: porcentaje de capacidad de carga

^{a,b,c,d} : Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

N/A : no aplica.

En la literatura, se ha reportado que el RP % y la distribución en tamaño entre precipitado y sobrenadante de NPs de Q obtenidas por GI, depende de la relación Q:TPP (Antoniou et al., 2015; Calvo et al., 1997). Antoniou et al., (2015) reportó en NPs de QTPP (en igual relación Q:TPP que en este estudio, de 6:1) en solvente ácido acético, un RP % de 40-50 % y la distribución y tamaño de las NPs fue similar entre el precipitado y el sobrenadante.

El rendimiento en partículas de NPs de Q generadas por SFD utilizando ácido cítrico como solvente fue de un 71,7 %, mientras que para NPs de Q generadas por SFD utilizando ácido acético como solvente fue de 52,5 %, estos datos son menores a lo reportado por Gamboa et al., (2015), quienes sintetizaron NPs de Q disueltas en ácido acético cargadas con inulina en un sistema cosolvente hexano-pluronic, y obtuvieron un RP % promedio de 80,8 %, diferencia que puede atribuirse a la distinta composición del sistema cosolvente utilizado.

Con respecto a la EE % y CC % de las NPs QT, se puede observar en la Tabla 2 que la formulación 4; correspondiente a NPs-QT-SDF, presenta los valores más bajos con una EE % de $49,8 \% \pm 2,2 \%$ y una CC % de $1,7 \% \pm 0,1 \%$, le sigue la formulación 2; correspondiente a NPs-QT-GI, con una EE % de $61,7 \% \pm 1,71 \%$ y una CC % de $2,9 \% \pm 0,08 \%$, mientras que los mejores resultados de carga de activos se obtuvieron con la formulación 5; NPs-QT-SFDa, única que incluye la utilización de ácido acético como solvente de Q, con valores de EE % de $91,2 \% \pm 0,17 \%$ y de CC % de $6,7 \% \pm 0,01 \%$. El aumento en la EE % y la CC % observado en las NPs QT obtenidas mediante SFD al reemplazar el solvente de Q de ácido cítrico por ácido acético, se puede atribuir, como fue expuesto anteriormente, a que durante el proceso de SFD, sublima el ácido acético, lo que no ocurre con el ácido cítrico, por ello existiría una menor competición por el activo (Hosseinzadeh et al., 2012).

En las NPs obtenidas mediante GI la EE es mayor a lo reportado en la literatura para formulaciones similares; Woranuch & Yoksan (2013) reportan la encapsulación de eugenol en NPs de Q (máxima carga obtenida: EE=20,1 % con la adición de 1 mg de activo/mg de Q) y Keawchaon & Yoksan (2011) llevaron a cabo la encapsulación de carvacrol (máxima carga obtenida: EE= 31 % con la adición de 1 mg de activo/mg de Q). La mayor EE de las NPs desarrolladas en el presente trabajo mediante GI se puede atribuir a dos factores: en primer lugar, en los otros estudios, el proceso de GI se realiza con una mayor cantidad de TPP que, como ya se ha explicado, puede llevar a la generación de cruzamientos interpartículas y aglomerados de NPs que incorporen una menor proporción de activo en el interior. Por otro lado, los reportes señalados se basan en la generación de una microemulsión Q-activo, lo que puede

haber facilitado que una proporción importante de micelas del activo de mayor tamaño no se incorporen al sistema y se pierdan durante el proceso de centrifugación.

4.3.3 Morfología de las nanopartículas

Se evaluó la morfología y el tamaño de las NPs generadas por las 5 formulaciones a través de microscopía electrónica de transmisión (MET) (Figura 4), además se realizó un análisis microscópico tridimensional a través de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) (Figura 5) a las 3 formulaciones de NPs cargadas con timol (NPs-QT-GI, NPs-QT-SDF y NPs-QT-SFDa).

Las imágenes generadas a partir del análisis de MET se aprecian en la Figura 4. Se observó que las NPs generadas por ambos métodos presentaron una morfología esférica, sin embargo las NPs generadas por SFD con ácido cítrico como solvente presentaron un alto grado de aglomeración, mientras que el método SFD que utiliza ácido acético como solvente y el método GI permite obtener un producto con menor aglomeración.

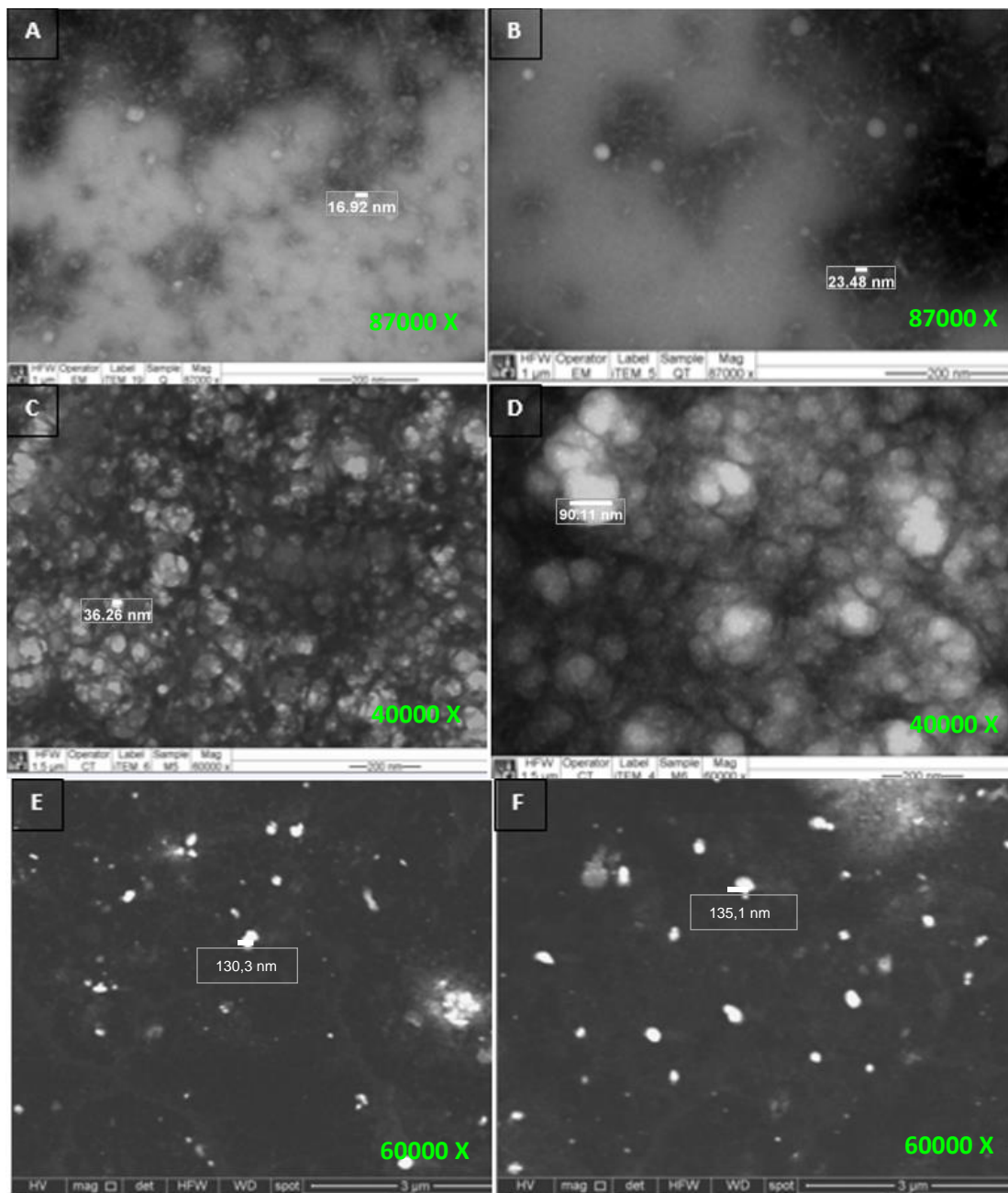


Figura 4. Microscopía electrónica de transmisión (MET) para nanopartículas según formulación: por gelificación iónica (A: de quitosano-cítrico / B: de quitosano-timol-cítrico) y por atomización criogénica (C: quitosano-cítrico / D: quitosano-timol-cítrico / E: quitosano-acético / F: quitosano-timol-acético)

Para el caso de NPs generadas por gelificación iónica, se han reportado resultados similares de tamaño determinado por MET (Aktas et al., 2005; Calvo et al., 1997; Fernandez-Urrusuno et al., 1999; Savé, 2011; Keawchaon & Yoksan, 2011), en dichos estudios también se ha observado una gran diferencia en la aproximación al tamaño de las NPs según la técnica de análisis que se utilice (MET v/s DLS), como se observa en la Tabla 3 en el caso de la utilización de MET la aproximación al tamaño de las NPs arroja valores significativamente menores ($p < 0,05$), de hasta ~9 veces, este hecho podría explicarse debido a que en la MET se realiza una observación de las muestras deshidratadas e inmovilizadas en un su soporte sólido, bajo un alto vacío y que, por otro lado; el DLS mide la difusión de partículas en una dispersión que da cuenta del diámetro hidrodinámico de NPs en suspensión, es decir, la relación entre el movimiento de las partículas en base a su tamaño (Akbari, Pirhadi & Zandrahimi, 2011; Ito et al., 2004). Por otro lado, es esperable que en la medición a través de DLS las NPs presentan un mayor tamaño al estar en un medio acuoso debido a su capacidad de hinchamiento (Aktas et al., 2005).

Tabla 3. Tamaño según microscopía electrónica de transmisión (MET) y según diámetro hidrodinámico (Z-average) de nanopartículas según formulación

N°	Tipo NP	Tamaño MET (nm)	Z-ave (nm)
1	NPs-Q-GI	20,81 ^a +4,9	174,8
2	NPs-QT-GI	40,15 ^b +17,7	293,1
3	NPs-Q-SDF	150,6 ^c +19,7	326,3
4	NPs-QT-SDF	174,1 ^c +28,9	683,8
5	NPs-QT-SFDa	132,9 ^c +30,9	288

^{a,b,c} : Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Los resultados de la microscopía de barrido de las 3 formulaciones de NPs cargadas con activo timol se aprecian en la Figura 5; para el sistema de generación de NPs mediante SFD (Figura 5 A y B) se aprecia que la utilización de ácido acético como solvente permite obtener partículas de forma similar que cuando se utiliza ácido cítrico como solvente, pero de menores dimensiones, en ambos casos la estructuras de NPs generadas muestran una morfología amorfa, rugosa, fracturada y altamente

porosa; típica de las NPs producidas mediante SFD (Hu, Johnston & Williams, 2003). Para el caso de las NPs generadas por GI (Figura 5 C) se observa que poseen una estructura con alto grado de aglomeración, sólida, cúbica o rectangular, con una superficie irregular. Bilensoy et al., (2009) ha descrito que las NPs de Q se encojen y pierden su forma como consecuencia del bombardeo de electrones durante el análisis. El alto grado de porosidad observado para las muestras de NPs QT obtenidas mediante SFD se atribuye a la formación de canales formados al momento de la sublimación del solvente presente en la nanogota congelada (Hu, 2003).

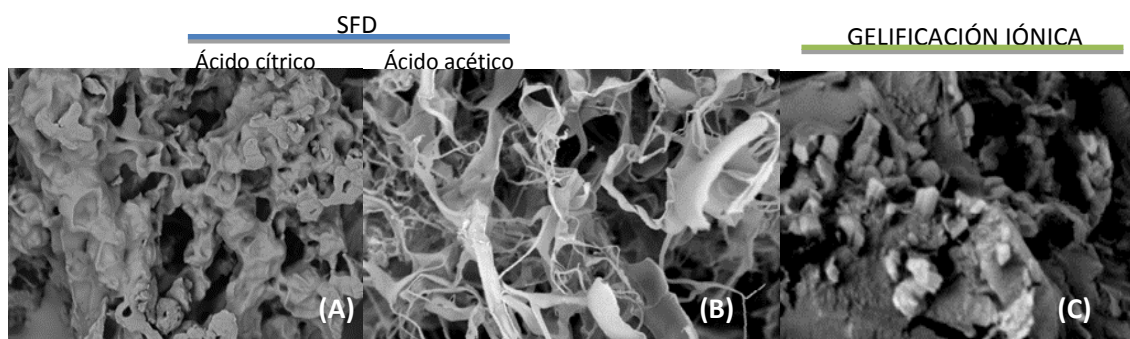


Figura 5. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) para nanopartículas quitosano-timol según formulación: A) SFD-solvente ácido cítrico (8 KX) / B) SFD-solvente ácido acético (8 KX) / C) Gelificación iónica-solvente ácido cítrico (12 KX)

Los resultados de diámetro hidrodinámico y carga de activo (EE % y CC %), descritos previamente indican que las NPs con los diámetros hidrodinámicos más bajos y las mayores cargas de activos, corresponden a las obtenidas mediante GI, utilizando ácido cítrico como solvente y a la formulación SFDa que utiliza ácido acético como solvente de Q, por ello estas NPs se seleccionaron para continuar con análisis posteriores de caracterización cristalográfica a través de difracción de rayos X y de la actividad antimicrobiana, así mismo dichas NPs son las seleccionadas para incorporar a las películas de Q-proteína de quínoa (PQ) y evaluación de sus propiedades mecánicas y de barrera que se abordarán en el Capítulo 2.

4.3.4 Difracción de rayos X de las nanopartículas quitosano-timol seleccionadas

En la Figura 6 son presentados los difractogramas de las NPs de QT seleccionadas (NP-QT-GI; Fig. 6B y NPs-QT-SFDa; Fig. 6D) con sus respectivos controles (correspondientes a las mezclas físicas de los ingredientes de cada formulación; Fig. 6A y 6C). Se puede apreciar que las NPs QT generadas por GI y SFDa presentan un acortamiento de los principales picks del difractograma, hecho que da cuenta de la disminución del grado de cristalinidad de la muestra con respecto a su control (Ali, Rajendran & Joshi, 2011; Hosseini et al., 2013; Qi et al., 2004). Además, en las muestras de NPs el pick a los 2θ en 20° se vuelve más amplio; es conocido en difracción de rayos X que las dimensiones de los picks se relacionan con el tamaño del cristalito y aquellos picks más amplios se atribuyen a cristales imperfectos; en este caso los picks más amplios observados en las muestras de NPs son indicativos de que ambos procesos llevan a una destrucción de la estructura cristalina del Q (Ji et al., 2011). Tanto en las muestras de NPs como en sus controles se observa un pick a los 2θ en el rango de entre 20° , el cual es característico para Q (Ali, Rajendran & Joshi, 2011; Hosseini et al., 2013; Ji et al., 2011, Qi et al., 2004). Además, en la muestra de NPs-QT-GI (6B) y en su control (6A) aparece un pick a los 2θ $29,3^\circ$ correspondiente a los picks del ácido cítrico, los cuales son intensos a los 28° y que no aparecen en la muestra SFDa (6D) ni en su control de muestra física (6C), este patrón se ha descrito previamente para películas de Q preparadas en ácido cítrico 0,1 M (Valenzuela, Abugoch & Tapia, 2013).

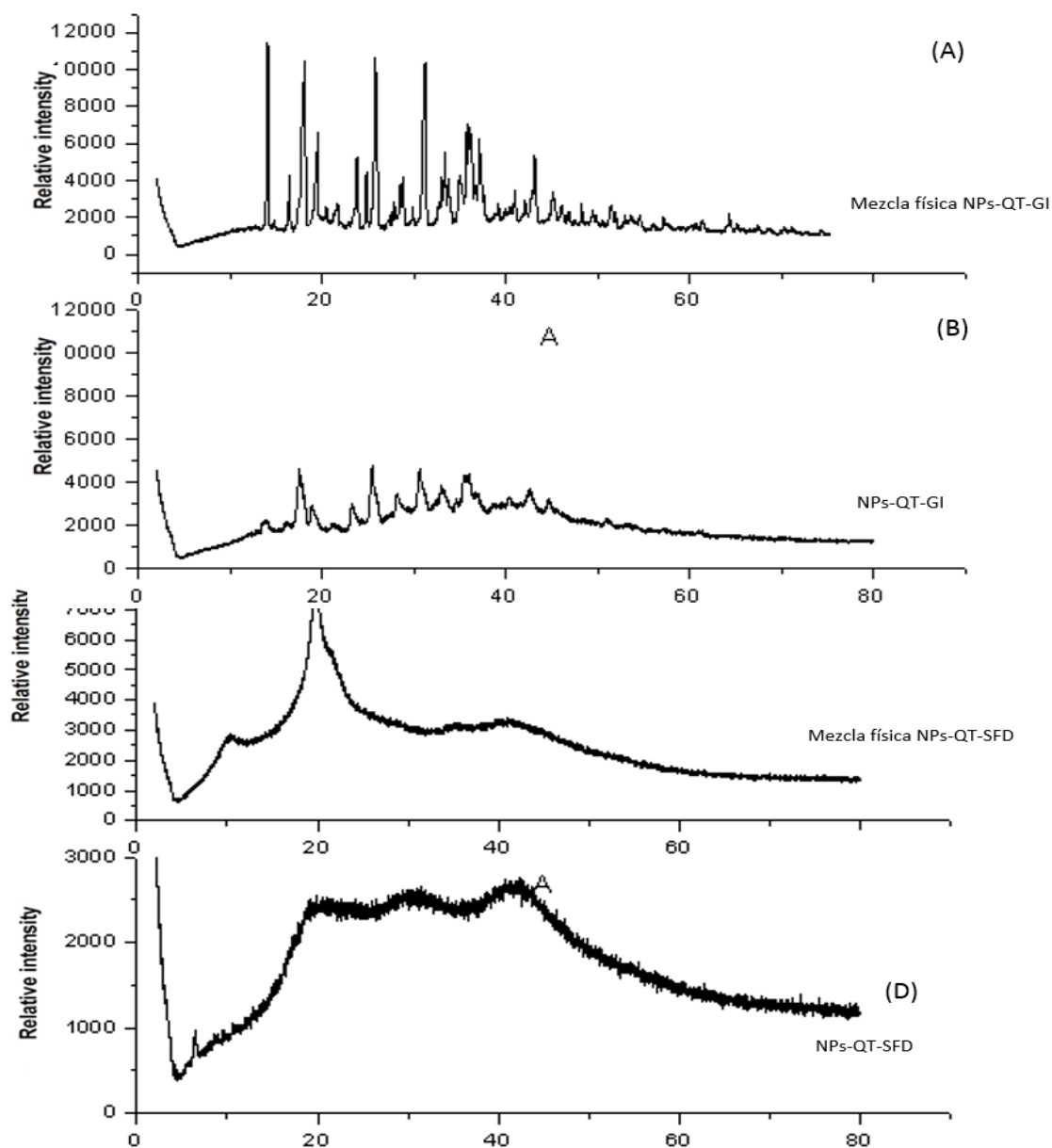


Figura 6. Difractograma de rayos $\overset{\text{A}}{\text{X}}$ de nanopartículas quitosano-timol seleccionadas (gelificación iónica-solvente ácido cítrico y SFD-solvente ácido acético)

Se determinaron los porcentajes de amorfo y cristalino mediante área bajo la curva del patrón de difracción de rayos X de las NPs-QT-GI, las NPs-QT-SFDa y sus respectivos controles (muestras físicas). Como se observa en la Tabla 4 se produce una disminución del porcentaje de cristalinidad en las NPs en comparación con las muestras físicas; las muestras de NPs se encuentran en un estado

predominantemente amorfo, lo que es importante de destacar debido a que los materiales con esta característica muestran una mayor reactividad y bioactividad (Guo et al., 2012). Además, una disminución en la cristalinidad se relaciona con una mejora en las propiedades de absorción, debido a un mayor acceso a la estructura interna de la molécula (Robinson, 2008).

Tabla 4. Porcentaje de estructura cristalina y amorfa de nanopartículas quitosano-timol, determinado mediante área bajo la curva del patrón de difracción de rayos X

Muestra	% Cristalino	% Amorfo
Mezcla física NPs-QT-GI	51,1	48,9
NPs-QT-GI	21,2	78,8
Mezcla física NPs-QT-SFDa	16,2	83,8
NPs-QT-SFDa	8,1	91,9

El mayor grado de estructura amorfa de las NPs con respecto a sus materiales constituyentes sin nanoparticular está descrito por otros autores; el caso particular de NPs generadas por GI la disminución en la cristalinidad estaría influenciado por el acomplejamiento de Q con otras moléculas; se cree que las moléculas de TPP se entrecruzan en la cadena de Q, generando un reordenamiento de la molécula y nuevos espacios en la misma distribuidos aleatoriamente (Robinson, 2008). Respecto a la técnica de congelación por atomización en N₂ líquido el acortamiento o desaparición de los picks característicos presentes en la mezcla física denotan el predominio de estructura amorfa y concuerda con lo reportado por Gamboa et al., (2015) para NPs de Q disuelto a ácido acético en un sistema cosolvente inulina-hexano-pluronic.

4.3.5 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas quitosano-timol seleccionadas

Método de difusión en agar contra bacterias G (+) y G (-).

Se ensayó la capacidad antimicrobiana (AM) *in vitro* de las NPs quitosano-timol seleccionadas, para ello se determinó el área de inhibición de crecimiento tras la inoculación de soluciones de NPs sobre 2 cultivos bacterianos. Las especies bacterianas fueron seleccionados por ser patógenos responsables de patologías de alta prevalencia en humanos, y corresponden a un gram positivo; *Staphylococcus aureus* y a un gram negativo; *Salmonella enterica serovar thyphimurium*. Se utilizó como control de los experimentos la aplicación de solución mezcla de QT sin nanoparticular y NPs generadas por la misma técnica pero sin activo timol adicionado (NPs Q-GI y NPs Q-SFD). Los resultados se observan en la Tabla 5.

Tabla 5. Área de inhibición de crecimiento en mm para *Staphylococcus aureus* y *Salmonella thyphimurium* frente a soluciones de nanopartículas de quitosano, quitosano-timol y solución quitosano-timol.

Tratamiento	Activos	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Salmonella thyphimurium</i>	
		Media±DE	%*	Media±DE	%*
Solución QT	QT	0,78 ^a ±0,22	0	0,59 ^a ±0,21	0
NP-QT-GI	QT	1,64 ^b ±0,62	110	2,39 ^b ±0,54	301
NP-Q-GI	Q	0,79 ^a ±0,38	1	1,13 ^{ab} ±1,15	89
NP-QT-SFD	QT	2,19 ^b ±0,68	180	2,41 ^b ±0,72	303
NP-Q-SFD	Q	1,24 ^{ab} ±0,55	59	0,59 ^a ±0,53	1

%*= porcentaje de área de inhibición del crecimiento tomando como base (0 %) la inhibición alcanzada por el tratamiento control (solución quitosano-timol son nanoparticular).

a,b,c : Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Las formulaciones de NPs que contienen T presentan una actividad significativamente mayor para la inhibición del desarrollo de *S. aureus* y *S. thyphimurium* que el tratamiento control con solución de QT sin nanoparticular. Por otra parte, se puede apreciar que las NPs de Q sin timol generan un efecto antibacteriano equivalente al que se logra con la aplicación de la solución QT control.

En general, se observó una menor sensibilidad (menores halos de inhibición) a los tratamientos por parte de *S. aureus* en comparación *S. typhimurium*. Esto puede atribuirse a que las bacterias G+, en este caso *S. aureus*, presentan una gruesa pared de peptidoglicano que disminuye la interacción del activo con la membrana celular bacteriana, ya que la adhesión efectiva del activo en la superficie bacteriana es requerida para lograr el efecto biocida (Kim et al., 2013). En el caso de *S. typhimurium*, al ser Gram negativa, está provista de una membrana externa compuesta principalmente por lipopolisacáridos, lipoproteínas, fosfolípidos (Koebnik, Locher & Van Gelder, 2000) y porinas que facilitan el ingreso de los activos al interior de la célula (Nikaido, 2003), lo cual incrementa la susceptibilidad de estas bacterias a las NPs-QT. Estos resultados concuerdan con lo explicado en detalle en el trabajo de Caro et al., (2016), que comparó la efectividad de las NPs de QT generadas por GI, contra la solución stock QT utilizada para generar las NPs; y donde se observó que las NPs evidencian un potente efecto antimicrobiano contra todos los organismos ensayados, además se determinó que la asociación de Q y T genera un efecto sinérgico sobre la actividad AM, ya que la CIM (concentración inhibitoria mínima) experimental fue significativamente menor a la CIM esperada (calculada en base a las CIM de cada activo por separado) de hasta ~4,5 veces dependiendo de la bacteria ensayada, lo que demuestra la potenciación de ambos activos en el control del desarrollo de microorganismos. Este efecto sinérgico se atribuye a que Q y T tienen distintos mecanismos de control de los microorganismos. Hosseinnejad y Jafari (2016) resumieron los mecanismos relacionados a la actividad AM del quitosano: 1) Las moléculas cargadas positivamente interfieren con los residuos cargados negativamente en la superficie bacteriana, dando lugar a alteraciones en la permeabilidad celular. 2) La interacción de los productos de hidrólisis difundida con el ADN microbiano, que conduce a la inhibición de la síntesis de ARNm y proteínas. 3) Inhibición del crecimiento microbiano por quelación de nutrientes y metales esenciales. 4) En la superficie de la célula, el quitosano puede formar una membrana polimérica que evita que los nutrientes entren en la célula o actúe como una barrera de oxígeno que puede inhibir el crecimiento de bacterias aeróbicas. Por su parte, el efecto antimicrobiano de T se debe a su naturaleza lipofílica; actuando a nivel de los lípidos de la membrana y de los complejos enzimáticos de membrana de los

microorganismos; lo que se traduce en alteración de permeabilidad y/o inhibición de la cadena respiratoria celular (Marei et al., 2012).

Inhibición del desarrollo del micelio de *Botrytis cinerea*

Se ensayó la capacidad antifúngica de las NPs quitosano-timol seleccionadas, enfrentadas a la forma vegetativa de *Botrytis cinerea*, por ser uno de los principales microorganismos alterantes que afectan a frutillas durante su almacenamiento. Se evaluó la inhibición del desarrollo del micelio de este hongo, adicionando concentraciones diluidas al medio de cultivo de la dispersión de NPs QT, las diluciones ensayadas fueron 10 %, 25 % y 50 % (v/v) y fue comparado contra las soluciones de QT sin nanoparticular, y dispersiones de NPs de Q sin activo en las mismas diluciones. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Porcentaje de inhibición del desarrollo miceliar vegetativo de *B. cinerea* frente a los tratamientos ensayados en función de las dosis de activos utilizadas en cada caso

Treatment	Concentration T (mg mL ⁻¹)	ConcentrationQ (mg mL ⁻¹)	% Mycelia growth Media ± DE
Blend QT10	0,07	0,20	35 ^c ± 4
Blend QT25	0,17	0,50	31 ^{bc} ± 6
Blend QT50	0,33	1,00	0 ^a
NPQ10	0,00	0,18	74 ^e ± 1
NPQ25	0,00	0,45	50 ^d ± 0
NPQ50	0,00	0,90	26 ^b ± 5
NPQT10	0,06	0,18	0 ^a
NPQT25	0,15	0,45	0 ^a
NPQT50	0,30	0,90	0 ^a

Cuando el medio de cultivo carecía de las soluciones o dispersiones a ensayar (control de viabilidad), se observó que el hongo se propagó por toda la superficie de la placa (8 cm²), equivalente al 100 % de desarrollo, lo que fue utilizado como parámetro de comparación de crecimiento. Se observó que la dispersión de NPs de Q con T generadas por gelificación iónica presentan un 100 % de efectividad en la inhibición de la forma vegetativa de *B. cinerea* en todas las diluciones ensayadas,

mientras que la solución de QT sin nanoparticular presenta dicha capacidad inhibitoria sólo con la concentración más alta (dilución al 50 %), otros tratamientos capaces de lograr un 100 % de inhibición del desarrollo micelial de *B. cinerea* fueron los de NPs de Q con T generadas por SFD a un 50 % y 25 % de dilución, ya que la dilución al 10 % de estas NPs presentó un 40 % de inhibición con respecto al control de viabilidad.

Los tratamientos con dispersión de NPs de Q sin activo (generadas por ambos métodos) al 10 % de concentración mostraron los menores efectos inhibitorios. Al aumentar la concentración de NPs de Q sin activo timol (generadas por ambos métodos) a un 25 % se presenta un efecto inhibitorio equivalente, siendo ambos tratamientos capaces de inhibir en un 50 % el desarrollo con respecto al control de viabilidad. Cuando las NPs de Q sin activo timol se aplicaron a un 50% de concentración se observó un porcentaje de inhibición de un 64 % para NPs Q generadas por GI y un 73 % para NPs de Q generadas por SFDa.

A partir de lo anterior se deduce que la asociación de activos (Q y T) en forma de nanopartículas permite generar un efecto inhibitorio significativamente mayor a la solución de QT sin nanoparticular. Estos resultados concuerdan con la el efecto sinérgico entre Q y T reportado por Calvo et al., (2015), para NPs de Q y T generadas por GI.

4.3.6 Estabilidad del diámetro hidrodinámico y potencial zeta de las nanopartículas quitosano-timol seleccionadas durante el almacenamiento durante 30 días a temperatura ambiente (15 °C)

Se evaluó la estabilidad en relación al diámetro hidrodinámico (Z-average) y potencial zeta de soluciones de las NPs QT seleccionadas (NPs-QT-GI y las NPs-QT-SFDa), durante 30 días de almacenamiento a temperatura ambiente, los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Estabilidad en el tiempo (días) para nanopartículas quitosano-timol seleccionadas almacenadas durante 30 días a temperatura ambiente (15°).

Días	Z-ave (nm)		Pot. Zeta (mV)	
	NPs-QT-GI	NPs-QT-SFDa	NPs-QT-GI	NPs-QT-SFDa
0	293,1 ^a ±36,9	288 ^a ±7,2	47,8 ^b ±2,8	19,6 ^a ±1,4
30	266 ^a ±12,0	286 ^a ±1,2	45,3 ^b ±2,2	19,6 ^a ±0,8

a,b : Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

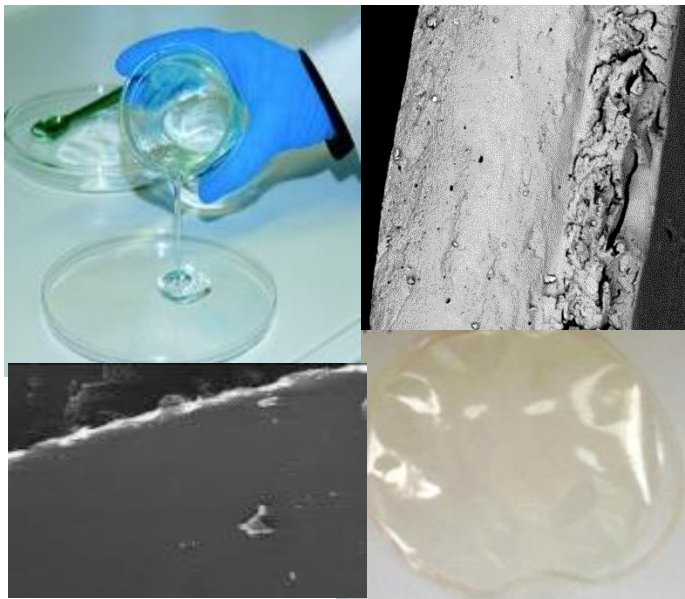
Se pudo observar que para ambas formulaciones de NPs hasta el día 30 no se produjeron modificaciones significativas del diámetro hidrodinámico ni del potencial zeta, además durante todo el período de ensayo las NPs-QT-GI y las NPs-QT-SFDa presentaron un PDI de 0,42 o menos (datos no mostrados), por lo que se encuentran dentro del rango de estabilidad y funcionalidad para NPs que debe ser inferior al valor de 0,7 (Müller et al., 2001), y que ya fue discutido previamente. En base a este resultado se deduce que las NPs pueden ser almacenadas en solución durante por lo menos 30 días a temperatura ambiente (15 °C).

Los resultados obtenidos en este capítulo permitieron seleccionar a las NPs-QT-GI y las NPs-QT-SFDa para continuar estudios posteriores en relación a su incorporación a las películas comestibles Q-PQ, la decisión se sustenta en que estas formulaciones presentan diámetros hidrodinámicos menores a 300 nm, estables 30 días de almacenamiento en solución, además presentan potenciales zeta positivos (NPs QT-GI = 47,8 mV y NPs QT-SFDa = 19,6 mV) y las mayores cargas de activo (CC % NPs QT-GI = 2.9 % y CC % NPs QT-SFDa = 6.7 %). Por último, ambas formulaciones de NPs presentan adecuada actividad antimicrobiana.

4.4 Conclusiones del Capítulo 1

- Mediante la técnica de gelificación iónica se logró fabricar nanopartículas de quitosano-timol con tamaños bajo los 300 nm y potenciales zeta de 50 mV, con morfología esférica y predominio de estructura amorfa.
- Mediante la técnica de congelación por atomización en nitrógeno líquido se logró fabricar nanopartículas de quitosano-timol con tamaños bajo los 300 nm y potenciales Z de 20 mV, con morfología irregular, altamente porosas y predominio de estructura amorfa.
- El proceso de generación de nanopartículas quitosano-timol genera una disminución de la estructura cristalina, con un 78,8 % de estructura amorfa para las nanopartículas obtenidas por gelificación iónica y 91,9 % de estructura amorfa para nanopartículas obtenidas mediante atomización criogénica en N₂ líquido.
- La mayor carga de activo se logró en las nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica en N₂ líquido utilizando ácido acético como solvente de quitosano, con valores de EE % de $49,8 \pm 2,2$ y de CC % de $1,7 \pm 0,1$
- Las formulaciones de nanopartículas quitosano-timol presentan una actividad antimicrobiana contra *S. typhimurium*, *S. aureus* y *B. cinerea* significativamente mayor que la solución quitosano-timol sin nanoparticular.
- En base a los resultados de diámetro hidrodinámico, potencial zeta y carga de activo, las nanopartículas que se seleccionaron para ser incorporadas en las películas comestibles quitosano-proteína de quínoa son las de quitosano-timol sintetizadas mediante gelificación iónica y ácido cítrico como solvente de quitosano y las obtenidas mediante congelación por

atomización en nitrógeno líquido con ácido acético como solvente de quitosano.



CAPÍTULO 2
CONDICIONES DE INCORPORACIÓN DE LAS NANOPARTÍCULAS
QUITOSANO-TIMOL SELECCIONADAS A LAS PELÍCULAS COMESTIBLES,
DETERMINACIÓN DE SUS PROPIEDADES MECÁNICAS, DE BARRERA Y
ESTRUCTURALES

5.1. Introducción

Las películas comestibles con aplicación en frutas requieren un grado de hidrofobicidad para evitar la pérdida de humedad durante el almacenamiento y así aumentar su vida útil postcosecha. De acuerdo a los reportes de Abugoch et al., (2011) y Valenzuela, Abugoch & Tapia (2013) se ha evidenciado que películas elaboradas a partir de mezclas entre proteínas de quínoa (PQ) y quitosano (Q), están estructuralmente estabilizadas por puentes de hidrógeno, lo cual las hace hidrofílicas. Por ello, este tipo de películas presentan limitadas propiedades de barrera al vapor de agua, si se les compara con materiales fabricados a partir de derivados del petróleo (como polietileno de baja densidad o polipropileno) que presentan valores de PVA muy inferiores en comparación a las películas biopoliméricas (Han et al., 2004).

Existen reportes que señalan que es posible disminuir la PVA de este tipo de películas hasta un 30 % cuando es adicionando aceite de girasol alto oleico en una concentración de hasta 4,9 % (p/v) a la mezcla. Sin embargo, la adición de aceite disminuye drásticamente la resistencia mecánica (ETR) entre un 90-95 %, mientras que la elasticidad (A %) disminuye hasta un 80 % (Valenzuela, Abugoch & Tapia, 2013).

Lo anterior justifica la incorporación de NPs a las películas quitosano-proteína de quínoa (Q-PQ), ya que su adición permitiría mejorar las propiedades de barrera al vapor de agua en películas hidrofílicas, sin afectar las propiedades mecánicas (Abdollahi et al., 2013; de Moura et al., 2009).

En el trabajo de Casariego, (2009) se prepararon mezclas de quitosano y NPs de arcilla. Las propiedades de barrera al vapor de agua de las películas fueron significativamente mejoradas mediante la incorporación de NPs de arcilla en su composición, la solubilidad en agua disminuyó a medida que la arcilla aumentó su concentración (para una concentración de quitosano constante). La resistencia a la tracción al corte aumentó significativamente con el aumento de quitosano y de arcilla, mientras que los valores de elongación se redujeron ligeramente para valores altos de

Q. Además, existe el reporte de Caro et al., (2016) que señala que tras la incorporación, de NPs QT obtenidas por GI, mediante inyección térmica a películas de Q-PQ, las NPs se ubican en un plano superficial de la película, dichas películas con NPs generan una mejora en las propiedades de barrera y una actividad antimicrobiana mayor frente a las películas control sin NPs. En esta tesis se propone la incorporación de las NPs mediante su adición directa a la mezcla filmógena, la que además contiene una proporción mayor de PQ para generar un recubrimiento más flexible y que se adapte mejor a la fruta.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Materiales

Quitosano de medio peso molecular (MMW), SIGMA-ALDRICH (USA) 448877-250G, con un GD de 75-85 % y un peso molecular viscosimétrico de 854 kDa

Harina de quínoa proveniente de la VI Región (Chile), Cooperativa Las Nieves Paredones.

NPs QT generadas por medio de Gelificación iónica utilizando ácido cítrico como solvente de Q y generadas por congelación por atomización en N₂ líquido utilizando ácido acético como solvente de Q.

5.2.2. Incorporación de nanopartículas seleccionadas a películas de quitosano y quitosano/proteína de quínoa

Películas quitosano-proteína de quínoa (Q-PQ)

Se preparó una solución de Q de peso molecular medio (marca SIGMA, cuya fuente es caparazón de cangrejo con un 85 % mínimo de desacetilación y un peso molecular viscosimétrico de 4,08 x 10⁵ Da, código C3646) en ácido cítrico 0,1 M a una concentración p/v final de 2 % de Q; para la incorporación de NPs un volumen determinado de sobrenadante acuoso de NPs obtenidas mediante el procedimiento gelificación iónica, se agregó como parte del solvente de manera que la carga de NPs fuera de 1 y 5 % en relación a la masa de Q. El mismo procedimiento se realizó para la incorporación de NPs generadas mediante técnica SFD con porcentajes de incorporación de NPs de 1, 3 y 5 % en relación a la masa de Q en la mezcla filmógena. Previamente se preparó extracto de PQ (a pH 11) según método descrito por Valenzuela, Abugoch & Tapia, (2013). 100 g de solución de Q 2 % (con y sin NPs) se incorporó lentamente y bajo agitación constante en el vórtex del extracto de PQ (100 g); posteriormente la mezcla se ajustó a pH 3 con HCL 1M y se agitó durante 1 hora. Para la eliminación de las burbujas generadas la mezcla se sometió a ultrasonido (Powersonic, Digital Ultrasonic Bath with basket (5 litre) - UB-405) a máxima potencia durante 30 minutos.

Las películas se obtuvieron por moldeado en placas de poliestireno y posterior secado a 20°C en estufa con ventilación forzada. Las películas formadas fueron retiradas de las placas y acondicionadas a 22 ± 1 °C y 60 ± 2 % de HR durante 2 días antes de hacer las determinaciones correspondientes.

Películas quitosano-proteína de quínoa-aceite (Q-PQa)

Se adicionó un 2,9 % de aceite en relación al peso del extracto de PQ y 0,2 % de tween 80 (Sigma Ultra, código P 8074) en relación a la masa de aceite; para ello se agregó el tween al extracto de PQ y se agitó hasta disolver completamente; posteriormente se agregó la cantidad de aceite determinada y se homogenizó en ultraturrax (ika T25 digital Ultraturrax) durante 5 min 13.000 rpm. Luego, esta fase PQ-aceite se utilizó para formar mezcla filmógena con Q siguiendo la metodología descrita previamente.

5.2.3. Caracterización de películas

Análisis microscópico de recubrimientos

Muestras de películas se trataron con ácido fosfotúngstico al 2 % (p/v) y se colocan sobre redes de cobre (SPI Supplies, Inc. West Chester, PA, EE.UU.), y secaron durante una noche para posteriormente llevar a microscopía de barrido (MEB) (HITACH TM tabletop microscope; Software: TM3000) (Castro, Taboada & Mosquera, 2012).

Propiedades mecánicas

Se evaluó el alargamiento porcentual (A %) y el esfuerzo de tracción en el corte (ETR) en $\text{N}\cdot\text{mm}^{-2}$, de acuerdo con la Norma Oficial Chilena NCh1151.Of1976, equivalente a la norma internacional ISO R1184-1970, con algunas modificaciones. Se utilizaron al menos 4 películas de cada material con dimensiones de 10 mm de ancho y 50 mm de largo, los cuales se sometieron a mediciones en la máquina

universal de ensayo de materiales (Lloyd material testing TA1, Metek test & calibration instrument, serial 500No515), con una celda de 5 kN. Las películas fueron puestos entre dos mordazas (TG22 Eccentric roller grip 1KN) separadas por una distancia de 4 cm, de tal forma que las mordazas quedaran firmes y uniformes.

Luego las películas fueron traccionados por la mordaza superior a una velocidad de 20 mm/min. Se registró la curva carga v/s alargamiento hasta el punto de ruptura en el punto medio de la celda. Los datos requeridos para el cálculo de %A y ETR fueron proporcionados por el software de control del analizador de textura al momento de producirse el corte de la película.

Se calcularon el A % y el ETR de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

Alargamiento, en %:

$$A\% = \frac{D_f - D_i}{D_i} * 100 \quad \text{Eq. (4)}$$

Donde:

A % = alargamiento porcentual.

D_f = Distancia de alargamiento hasta la ruptura, en mm.

D_i = Distancia inicial entre las líneas de referencia, en mm.

Esfuerzo de tracción en la ruptura, en Nmm^{-2} :

$$ETR = N / \text{mm}^2 \quad \text{Eq. (5)}$$

Donde:

ETR = Esfuerzo de tracción en la ruptura, en Nmm^{-2} .

N = Carga máxima en la ruptura de la película, en N.

mm^2 = Área transversal inicial de la película, en mm^2

Propiedades de barrera al vapor de agua

Este ensayo se realizó según el método de la copa húmeda de acuerdo con la Norma Chilena Oficial NCh2098.Of (2000), equivalente a las normas ASTM D1653-93 y DIN 5261. Cada 24 h y por un periodo de 21 días se registró el cambio de peso de las copas utilizando una balanza (Chyo, modelo mj-300, Japón). Se calculó la permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas según la siguiente ecuación:

$$PVA = \frac{\Delta m}{tA\Delta P} \times \varepsilon \quad \text{Eq. (6)}$$

Donde:

PVA = permeabilidad al vapor de agua en g.mm/kPa.dia.m².

Δm = cambio de masa en el tiempo en g.

t = tiempo en días.

A = área de la película en m².

ΔP = diferencia de presión parcial de vapor (2.808 kPa a 23 °C y 739 kPa a 2 °C).

ε = espesor de las películas en mm.

5.2.4. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Como estadígrafos se utilizaron promedio y desviación estándar para realizar el análisis de datos. Se utilizó ANOVA de una y dos vías según fuese necesario, el método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para determinar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el programa StathGraphics Centurion XV (versión 2006).

5.3. Resultados y Discusión

Chang et al., (2010) reportaron que la adición de más de un 6 % de NPs de Q generadas por GI con TPP a películas de almidón, tienden a aumentar los valores de PVA, y que una adición mayor a un 8 % de NPs resultan en la agregación de las

mismas, que se traduce en alteración de las propiedades mecánicas y de barrera de las películas. Sin embargo, a menores niveles de incorporación, las NPs pueden dispersarse mejor en la matriz de la película y provocar el efecto de tortuosidad o impedimento mecánico al paso de las moléculas de agua a través de la película, generando el efecto de reducción de la PVA esperado. Por lo anterior, al experimentar con las películas Q-PQ, se decidió la incorporación de un máximo de 5 % de las NPs QT seleccionadas, correspondientes a las NPs de quitosano y timol generadas por GI utilizando ácido cítrico como solvente (NPs QT-GI) y a las NPs de quitosano-timol generadas por SFD utilizando ácido acético como solvente (NPS QT-SFD). Los resultados de los ensayos realizados a las películas de Q-PQ con NPs de QT incorporadas, se muestran a continuación.

Análisis microscópico de recubrimientos

En la Figura 7 se observan imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB) de cortes transversales de películas de Q-PQ sin NPs y con adición de 5 % de NPs generadas por GI y SFD. Se pudo observar la incorporación efectiva de las NPs a lo largo del espesor de las películas de Q-PQ, tras agregar un 5 % de NPs generadas por ambos métodos. Se observó que las películas de Q-PQ sin NPs (A) mostraron una microestructura superficial heterogénea, microfracturada y porosa, resultados similares han sido reportados para películas de Q-proteína de suero (Kurek, Galus & Debeaufort, 2014), donde se atribuye la naturaleza heterogénea de este tipo de películas al proceso de secado.

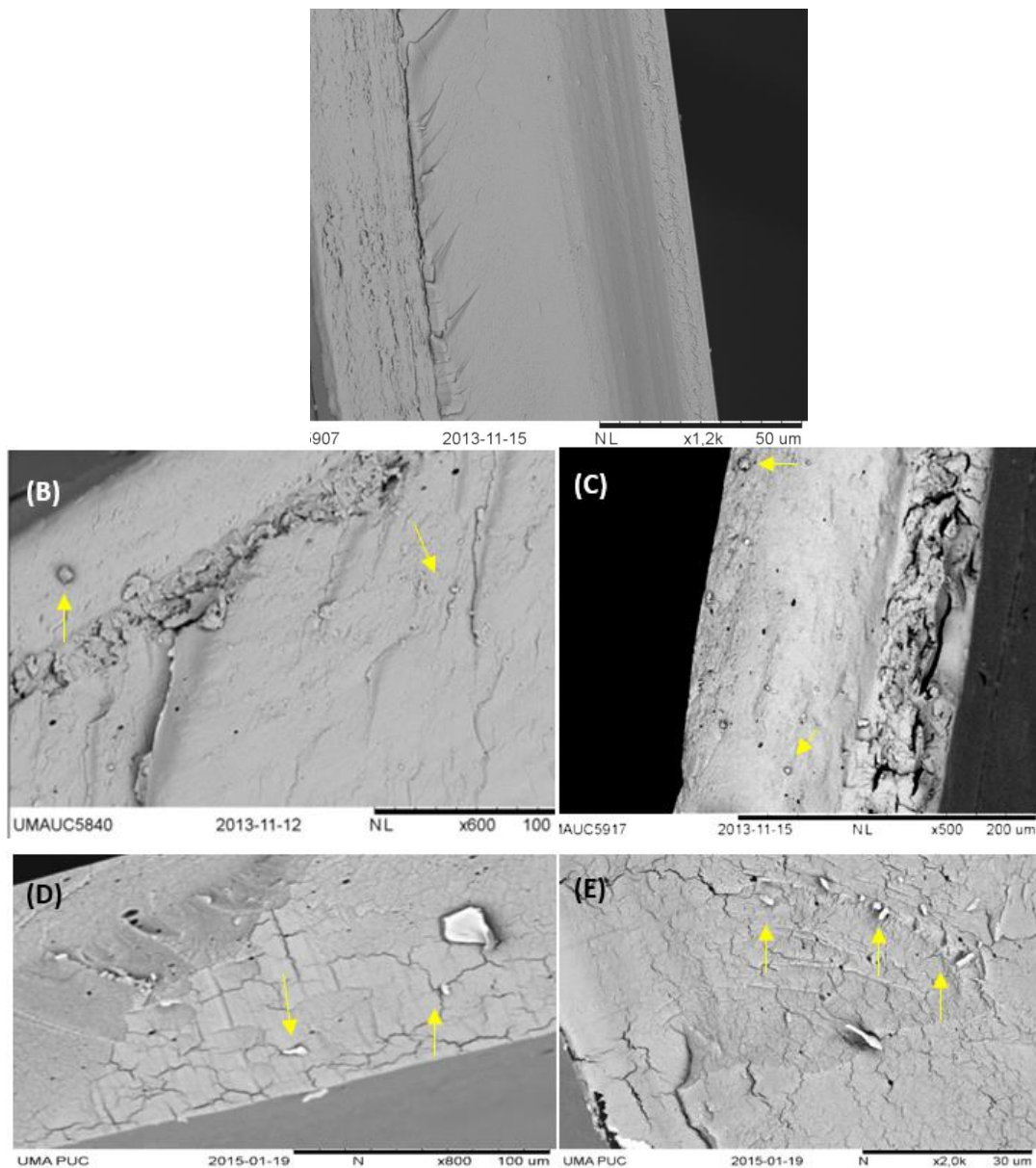


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de películas de quitosano-proteína de quínoa (Q-PQ): A) película Q-PQ sin nanopartículas, B) y C) película Q-PQ + 5 % de nanopartículas de quitosano con timol generadas por gelificación iónica; D) y E) película Q-PQ + 5 % NPs quitosano con timol generadas por atomización criogénica.

Las flechas (↙↘) indican la localización de NPs en la película.

Los resultados observados concuerdan con lo reportado por Caro et al., (2016), para películas de Q-PQ con incorporación de NPs QT generadas por GI, pero dada su técnica de incorporación de NPs a las películas, mediante inyección térmica sobre la película, en su caso las NPs se localizaron en planos más superficiales, mientras

que en el presente trabajo se puede observar una ubicación más homogénea de las NPs a lo largo del espesor de la película, concordante con lo reportado por Shi et al., (2013), quienes incorporaron NPs de celulosa en películas de celulosa.

5.3.1. Propiedades mecánicas

Se evaluó el porcentaje de alargamiento (A %) y el esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) en películas Q-PQ (película control), Q-PQ cargadas con NPs a diferentes concentraciones y Q-PQ con adición de aceite al 2,9 % (Valenzuela, Abugoch & Tapia, 2013). Los resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Porcentaje de alargamiento (A %) y esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) para películas de quitosano-proteína de quínoa control, cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones y con adición de aceite al 2,9 %. Acondicionadas a 23 °C-60 % HR.

Películas	A %	ETR (N.mm ⁻²)
	Media ± DE	Media ± DE
Control	42,7 ^c ± 14,8	7,3 ^b ± 1,5
SFD 1 %	41,9 ^c ± 14,3	6,1 ^b ± 1,0
SFD 5 %	45,3 ^c ± 14,4	7,3 ^b ± 1,1
GI 1 %	40,2 ^c ± 9,2	6,3 ^b ± 1,4
GI 5 %	33,2 ^b ± 11,3	7,8 ^c ± 2,2
ACEITE 2,9 %	26,0 ^a ± 9,5	3,6 ^a ± 1,0

a,b,c : Letras distintas indican diferencias significativas (p < 0,05)

Se pudo observar cambios significativos del A % y ETR con la incorporación de 5 % de NPs generadas por GI, con valores de 33,2 % de A % y 7,8 Nmm⁻² de ETR, mientras que el control sin NPs presenta valores de 42,7 % de A % y 7,3 N.mm⁻² de ETR, sin embargo, esta modificación puede ser interpretada como un refuerzo a la matriz, ya que es necesario un mayor esfuerzo de tracción para romper el compuesto. Las otras formulaciones con NPs se presentan como alternativas que no afectan el comportamiento mecánico de las películas, con valores de 40,2 % de A % y 6,3 Nmm⁻² de ETR para películas con adición de 1 % de NPs generadas por GI; 41,9 % de A % y 6,1 Nmm⁻² de ETR para películas con adición de 1 % de NPs generadas por SFD y 45,3 de A % y 7,3 Nmm⁻² de ETR para películas con adición de 5 % de NPs

generadas por SFD. Además, se pudo comprobar que la adición de aceite como agente hidrofóbico genera una caída significativa de los parámetros mecánicos de las películas con valores 26 % de A % y 3,6 Nmm⁻².

Se deduce que la incorporación de 5 % de NPs QT fabricadas por GI a las películas afectan el %A de los mismos por constituir un porcentaje mayor del polímero que los vuelve más rígidos y más resistentes pero menos elásticos, estos resultados concuerdan con lo reportado en la literatura para películas biopoliméricas con incorporación de NPs (Kjm et al., 2006; Savé, 2011; Valenzuela, Abugoch & Tapia, 2013). En esta tesis, las películas están constituidas por un complejo polielectrolito estabilizado por puentes de hidrogeno entre los grupos aminos ionizados del Q y los grupos radicales de los aminoácidos de la PQ (Abugoch et al., 2011), se especula que a cargas de 5 % la adición de NPs QT generadas por GI interferirían en la estabilidad de la interacción PQ-Q disminuyendo el %A. Este hecho no fue observado con la adición de NPs fabricadas mediante SFD, donde no hubo diferencias significativas en las propiedades mecánicas entre la incorporación de 1 y 5 % de NPs. Estas NPs no afectan significativamente el %A ni el ETR debido a que, como se pudo observar a través de MEB, su estructura porosa las haría más flexibles y adaptables a la película. Estos resultados permiten afirmar como correcta parte de la hipótesis de trabajo que habla de la posibilidad de mejorar las propiedades de permeabilidad al vapor de agua de las películas de Q-PQ a partir de la incorporación de NPs, sin afectar tan drásticamente el comportamiento mecánico de este tipo de recubrimientos, como se produce cuando se incluye aceite, ya que las películas se vuelvan quebradizas y frágiles (Vargas et al., 2009; Jiménez et al., 2012; Valenzuela, Abugoch & Tapia, 2013).

5.3.2. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) de películas de quitosano-proteína de quínoa con incorporación de NPs y controles

PVA para películas de quitosano-proteína de quínoa cargadas con 1 y 5 % de nanopartículas generadas por GI y controles

En la Figura 8 se muestran los resultados de PVA de películas de Q-PQ con la incorporación de 1 y 5 % de NPs generadas por GI, de películas de Q-PQ sin NPs (control) y películas Q-PQ-aceite (control con aceite).

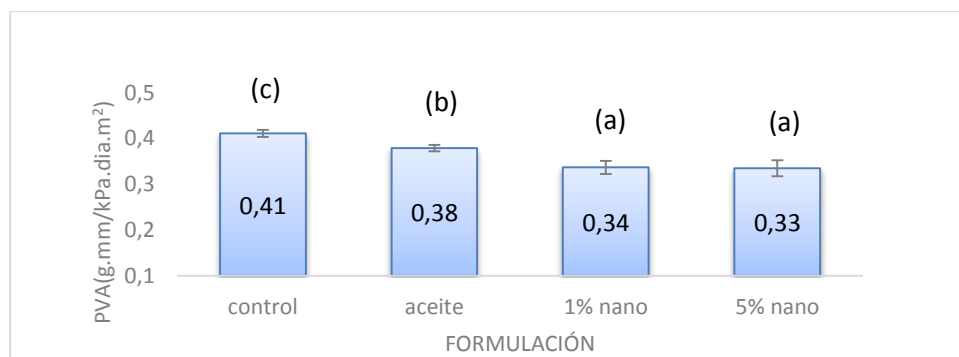


Figura 8. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) v/s tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa control, control con 2,9 % de aceite y cargadas con nanopartículas quitosano-timol generadas por gelificación iónica al 1 y 5 %. Acondicionadas a 23 °C y 60 % HR. a,b,c : Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Se observa que la PVA es significativamente menor al control con adición de 1 y 5 % de NPs, sin diferencias significativas entre estas dos formulaciones; con valores de PVA (g.mm/kPa.dia.m²) de 0,34 para películas Q-PQ con 1 % de NPs QT generadas por GI y de 0,33 g.mm/kPa.dia.m² para películas Q-PQ con 5 % de NPs QT generadas por GI, mientras que la película control sin NPs presentó un valor de PVA de 0,41 g.mm/kPa.dia.m² y la película control con aceite presentó un valor de 0,38 g.mm/kPa.dia.m². La disminución de la PVA generada tras la incorporación de NPs a las películas es atribuible al efecto de “tortuosidad”; es decir, al impedimento mecánico que constituyen las NPs al paso de agua a través de los canales de difusión que posee la película, mediante éste concepto las moléculas de agua tendrían que atravesar los canales con las NPs intercaladas en la matriz polimérica en vez de atravesar directamente. De esta forma, el camino tortuoso generado por la incorporación de NPs incrementaría la longitud promedio de difusión del vapor de agua (Abdollahi et al., 2013; de Moura et al., 2009; Duncan, 2011). Por otro lado, al incorporar NPs a las películas se podría cambiar la estructura del compuesto en las regiones interfaciales (Duncan, 2011). Esto podría darse debido a la formación de puentes de hidrógeno entre las NPs, la interface de Q y los radicales polares de los aminoácidos que conforman la estructura de las proteínas de quínoa. Es así como las

hebras del polímero en contacto con las NPs podrían quedar parcialmente inmovilizadas y de esta forma se disminuiría el volumen libre de agujeros, su densidad y tamaño, dificultándose el paso de las moléculas de vapor a través del nanocomposito (Duncan, 2011). La disminución del valor de PVA debido a la incorporación de NPs es congruente con lo señalado por diversos autores. Así, Savé (2011) quien trabajó con películas de Q-PQ, logró disminuir la PVA a un máximo de un 9 % al cargar las películas a un 1 % de NPs de quitosano-tripolifosfato producidas mediante la técnica de GI. Por su parte, Caro et al., (2016) reportaron una disminución de la PVA de un 13,3 % en comparación a la película control sin NPs, al agregar NPs QT generadas por GI a películas Q de alto peso molecular y PQ, mediante impresión por inyección térmica en una de las caras de la película, las diferencias observadas en su caso se atribuyen a que trabajó con una formulación constituida por un 90 % de Q de alto peso molecular y 10 % de PQ, logrando una película con el doble de espesor (en promedio 0,203 mm) que la utilizada en esta tesis, dado que la finalidad de su estudio era la de fabricar un envase primario bioactivo y en esta tesis un recubrimiento comestible.

A la luz de los resultados expuestos previamente, la incorporación de NPs de QT elaboradas por GI a las películas de Q-PQ se presenta como una estrategia viable de reducción de la PVA, más recomendada que la adición de aceite, debido a que el efecto de reducción de la PVA es mayor y la alteración de las propiedades mecánicas (que se genera sólo tras la adición de 5 % de NPs) es significativamente menor a la generada por la adición de aceite.

PVA para películas de quitosano-proteína de quínoa cargadas con 1, 3 y 5 % de nanopartículas generadas por atomización criogénica y control

En este ensayo no se consideró película de Q-PQ con aceite como control, ya que se comprobó en el experimento anterior que la incorporación de aceite afecta drásticamente las propiedades mecánicas deseadas para un recubrimiento comestible de frutas frescas, por lo que se decidió ensayar en su lugar una concentración intermedia de incorporación de NPs del 3 %. Los resultados de PVA de

la incorporación de NPs QT generadas por SFD al 1, 3 y 5 % además de su control sin NPs se muestran en la Figura 9.

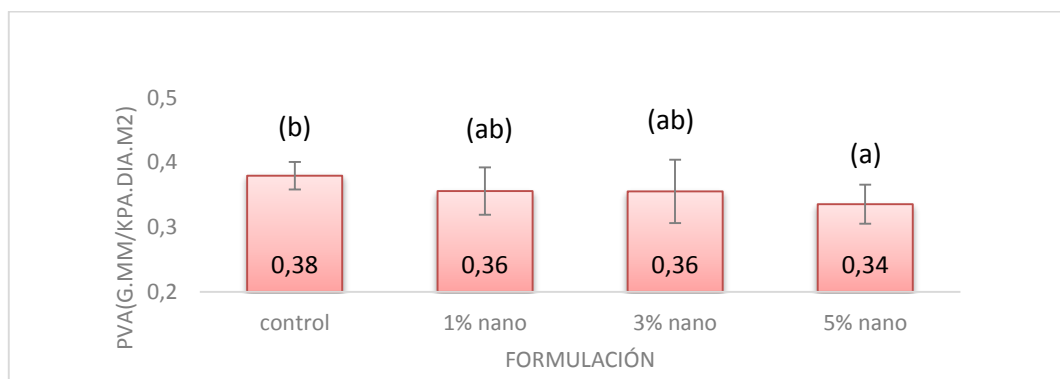


Figura 9. Permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa control y cargadas con nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica al 1, 3 y 5 %. Acondicionadas a 23 °C y 60 % HR. a,b : Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Se puede apreciar que las películas cargadas con NPs QT-SFD al 1 y 3 % no presentan diferencias significativas respecto al control, presentando valores de PVA (g.mm/kPa.día.m^2) de 0,36 para películas con incorporación de 1 y 3 % de NPs y 0,38 para películas control sin NPs. Entre las películas cargadas con NPs generadas por SFD no se observan diferencias significativas, sin embargo la carga de 5 % presenta un PVA de 0,34 g.mm/kPa.día.m^2 valor significativamente menor al control (~12 % menos). En este caso se piensa la disminución de PVA también se atribuiría a la formación de un camino tortuoso para la difusión del vapor de agua explicado previamente (Abdollahi et al., 2013; de Moura et al., 2009; Duncan et al., 2011), pero este efecto sólo es alcanzado con la incorporación de un 5 % de NPs QT generadas por SFD.

Para una mejor esquematización del efecto en la reducción de la PVA logrado por la incorporación de NPs QT generadas por GI y SFD, se realizó una comparación de los resultados expresados en términos de reducción porcentual de la PVA con respecto a la película control sin NPs, la que fue tomada como parámetro base (PVA 100 %), ésta comparación se observa en la Figura 10.

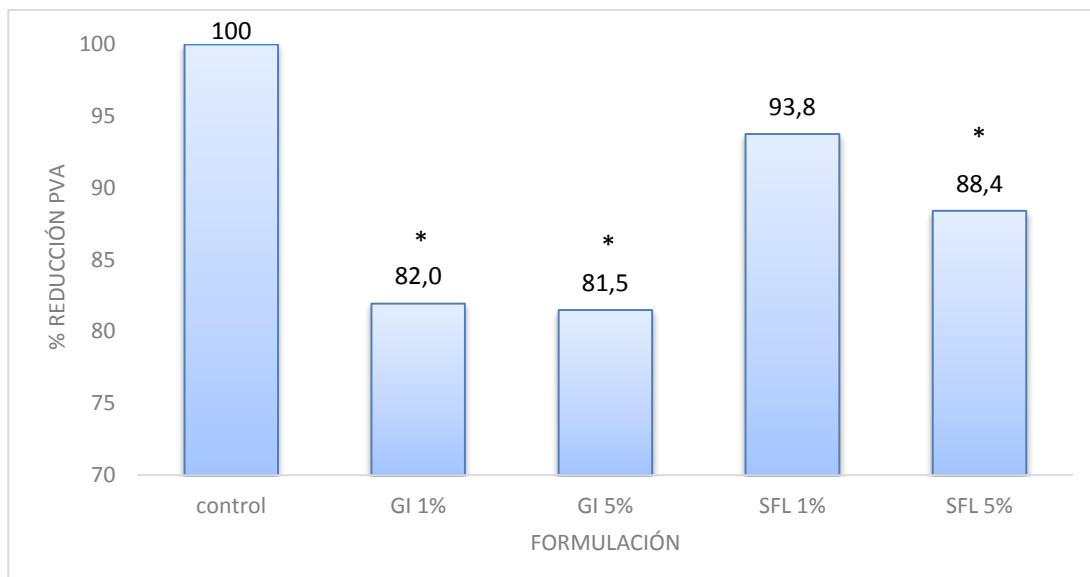


Figura 10. Reducción porcentual de permeabilidad al vapor de agua v/s tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa cargadas con nanopartículas quitosano-timol. Acondicionadas a 23 °C y 95 % HR. Comparación realizada considerando un valor de 100 % para los resultados de PVA de la película quitosano-proteína quínoa control sin nanopartículas y con respecto a éste valor la reducción porcentual de la PVA lograda con la adición de NPs. * indica reducción significativa ($p < 0,05$) con respecto al control.

Se puede observar que la adición de 1 % de NPs generadas por SFD no incide significativamente en la disminución del PVA con respecto al control con un valor de 6,2 % de reducción, mientras que la adición de un 5 % de NPs generadas por SFD producen un 11,6 % de reducción de la PVA con respecto al control, efecto significativo, igual que el generado por la incorporación de un 1 y 5 % de NPs QT generadas por GI, que permiten un ~18 % de reducción de la PVA. Se cree que a la misma carga de 1 % las NPs generadas por SFD no disminuyen la PVA de manera significativa debido a que, como se detalló previamente a través de microscopía electrónica de barrido, su morfología rugosa, fracturada y altamente porosa genera un menor efecto de tortuosidad en la película.

La Tabla 9 permite comparar los resultados de PVA con los observados para otros biopolímeros, encontrando similitud con otros autores, como en el caso de películas de quitosano con incorporación de aceite de oliva en concentraciones de 5 a 15 % (0,286 – 0,325 g mm/m² d kPa) (Pereda, Aranguren & Marcovich, 2010), pero en

otros casos los resultados de PVA son bastante mayores como en el caso de películas de proteína de soja + ácido oleico (4 – 5 g mm/m² d kPa) (Monedero et al., 2009). Las diferencias en los resultados se deben a la naturaleza multifactorial de la PVA de los distintos biopolímeros, donde influyen factores como la integridad de la matriz polimérica, la relación entre zonas amorfas y cristalinas, y zonas hidrofóbicas-hidrofílicas, la movilidad de la cadena polimérica, entre otros.

Tabla 9. Comparación de la PVA de películas obtenidas en este estudio y de otros biopolímeros utilizados comúnmente para la fabricación de películas comestibles.

Tipo película	PVA*	Fuente
Q-PQ (1:1)	0,395	Este trabajo
Q-PQ (1:1) + 2, 9 % aceite	0,379	Este trabajo
Q-PQ + 5 % NPs QT-GI	0,335	Este trabajo
Q-PQ + 5 % NPs QT-SFD	0,335	Este trabajo
Quitosano (Q)	0,40	Valenzuela, Abugoch & Tapia, 2013; Pereda, Aranguren & Marcovich, 2010
Q-PQ (9:1)	0,397	Valenzuela, Abugoch & Tapia, 2013
Q-PQ (9:1) + 2,9 % aceite	0,289	Valenzuela, Abugoch & Tapia, 2013
Aislado Proteico Soja (PS)	6,75	Monedero et al., 2009
PS + 25 % aceite	4,7	Monedero et al., 2009
Metilcelulosa	7,06	Mamani et al., 2011
Pectina	6,77	Mamani et al., 2011
*PVA	= g.mm/kPa.dia.m2	
Q	= quitosano	
PQ	= proteína de quínoa	
(1:1 – 9:1)	= relación m/m entre quitosano:proteína de quínoa	
PS	= aislado proteico soja	

En base a los resultados de propiedades mecánicas y PVA observados en esta tesis se puede deducir que las películas hidrofílicas Q-PQ pueden ser mejoradas en relación a sus propiedades de barrera al vapor de agua a través de dos formulaciones finales: 1. La incorporación de NPs de QT generadas por GI en concentración de 1 %, y 2. La incorporación de NPs de QT generadas por SFD en concentración de 5 %, convirtiéndose en un nuevo aporte al creciente sustento de uso de nanotecnología

como una alternativa viable al uso de aceite, ya que no genera alteraciones en la flexibilidad y resistencia de este tipo de biocompuestos.

Considerando el parámetro de capacidad de carga de timol de las NPs (% CC = 6,7 % para NPs generadas por SFD, y % CC = 2,9 % para NPs generadas por GI) y su % de incorporación (5 % de adición de NPs-SFD y 1% de adición de NPs-GI), se hizo una determinación teórica de timol en la película Q-PQ, arrojando resultados de un 0,34 % de timol con la incorporación de un 5 % de NPs-SFD y un 0,15 % de timol con la incorporación de un 1 % de NPs-GI. Se decide continuar con los ensayos de aplicación del recubrimiento de Q-PQ con adición de 5% de NPs de QT generadas por SFD, ya que es la que, teóricamente, permite una mayor carga de timol en la película.

5.4. Conclusiones del Capítulo 2

- La adición de NPs en las películas (en concentración de 1% para aquellas generadas por gelificación iónica y en concentración de 1 o 5 % para aquellas generadas por SFD) no afectaron las propiedades mecánicas de las películas de quitosano-proteína de quínoa.
- La adición de nanopartículas en las películas permitió la reducción de la permeabilidad al vapor de agua entre un 11,6 % a un 18,5 %, siendo mayor la reducción cuando se agregó NPs producidas por GI (al 1 y 5 %) en relación al control o a las películas que tenían aceite incorporado.
- Se puede concluir en esta etapa de la tesis que la incorporación de nanopartículas a las películas de quitosano-proteína de quínoa permite disminuir la permeabilidad al vapor de agua de los recubrimientos, sin alterar las propiedades mecánicas de los mismos.



CAPÍTULO 3

APLICACIÓN DE LAS MEZCLAS FORMADORAS DE PELÍCULAS EN FRUTILLAS Y EVALUACIÓN DE LA VIDA ÚTIL DURANTE EL ALMACENAMIENTO

6.1 Introducción

El gran desafío en la postcosecha es que los frutos mantengan sus características de frescura en el tiempo hasta llegar al consumidor final, lo que significa un largo camino; que incluye, por mencionar algunos pasos: precosecha, cosecha, selección, packing, enfriamiento, almacenamiento, transporte y venta (Defilippi, 2009). Aunque es difícil determinar el alcance de las pérdidas post-cosecha se sabe que llegan a niveles significativos. Se estima que, en países desarrollados, cerca del 20 al 25 % de los vegetales cosechados son destruidos por patógenos durante el manejo postcosecha (Sharma, Singh & Singh, 2009), cifra que aumenta a cerca de un 50 % en países tropicales y en aquellos de menor desarrollo (Tripathi & Dubey, 2004).

Según Defilippi (2009) las principales causas, biológicas y ambientales, de pérdidas en postcosecha incluyen una pobre calidad inicial, una madurez inapropiada y atrasos entre cosecha y venta, además de alteraciones durante el almacenamiento relacionadas con higiene inadecuada, mal manejo de la temperatura y niveles no deseados de gases, que favorecen la pérdida excesiva de agua, el daño mecánico y la aparición de pudriciones.

Las principales características de productos hortofrutícolas de rápido deterioro tras la cosecha es un alto contenido de agua y un pH y composición de nutrientes que los hace más susceptibles al ataque de hongos, insectos y bacterias (Tripathi & Dubey, 2004). Además, se observa una relación directa entre la tasa respiratoria del fruto y su velocidad de deterioro, en el caso de frutillas la tasa respiratoria está categorizada como “Alta”, en el rango de 20-40 mg CO₂/kg/h a 5°C, muy superior a la de algunos vegetales de mayor durabilidad como nueces y dátiles con tasas respiratorias muy bajas (< 5 mg CO₂/kg/h a 5°C) (Barbosa et al, 2003; Barney & Hummer, 2005). Por ello, las pérdidas en postcosecha de frutillas son mayores que en otro tipo de fruta, principalmente por daño microbiológico, físico y/o deshidratación.

Con respecto al manejo de venta de frutillas, estas comúnmente se envasan y comercializan en envases plásticos con ventilación que no permite el desarrollo de una atmósfera modificada para prolongar la vida útil de este tipo de productos

(Almenar et al., 2008). En ese sentido las películas comestibles y revestimientos han demostrado ser una alternativa eficiente en su manejo, a través del control de la transferencia humedad, intercambio de gases y de los procesos de oxidación, con la ventaja adicional de que varios principios activos pueden ser incorporados en la matriz polimérica, como agentes antioxidantes, saborizantes, especias y compuestos antimicrobianos contribuyendo a extender en una mayor medida la vida útil del producto. Se han aplicado recubrimientos comestibles en frutillas, elaborados a partir de componentes poliméricos naturales (Hernández-Muñoz et al., 2008); capaces de aumentar su vida postcosecha, debido a que actúan modificando la atmósfera interna de las frutas, bloqueando parcialmente los poros, reduciendo la difusión de gases por la respiración.

La calidad de frutillas se puede medir según parámetros como los sólidos solubles que representa la cantidad de azúcar de la fruta; se considera una buena variedad cuando esta sobrepasa el 10 % (los valores normales para las variedades chilenas fluctúan entre el 8 y 11 %), otro factor importante es la acidez titulable; los valores promedio para frutillas de nuestro país son de 0,75 a 1,74 %. Además está el pH con valores promedio entre de 3,4 a 3,6. (Ampuero, 2008).

En el capítulo anterior se pudo determinar que las películas de Q-PQ cargadas con NPs presentan propiedades de permeabilidad al vapor de agua mejoradas con respecto a la película sin NP, y además, la carga de 1 % de NPs generadas por GI y 1 y 5 % de NPs generadas por SFD no producen alteraciones significativas de las propiedades mecánicas, considerando lo anterior las películas comestibles Q-PQ seleccionadas para ser aplicadas sobre la fruta fueron las cargadas con un 5 % con NPs QT generadas por SFD, ya que, teóricamente presentaron la mayor carga de activo en la película. Esta película fue aplicada a frutillas con el fin de aumentar su vida útil durante el tiempo de almacenamiento, para esto las frutillas sometidas a los distintos tratamientos fueron empacadas en grupos de 6 unidades, en envases de plástico tipo clamshell (PET) y almacenadas en refrigeración a 5°C y 90 - 95 % HR. Durante el período de almacenamiento se determinaron como parámetros de vida útil características físicoquímicas, análisis microbiológicos, propiedades mecánicas y evaluaciones sensoriales a las frutillas.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Materiales

Recubrimientos de mezclas de Q-PQ (control) y con adición de 5 % de NPs QT-SFD
Frutillas se adquirieron de la cosecha de Hortifrut Comercial S.A. Santiago, Chile.

6.2.2 Aplicación del recubrimiento comestible en las frutillas

El procedimiento de inmersión se llevó a cabo siguiendo una serie de procesos explicados en la Figura 11.

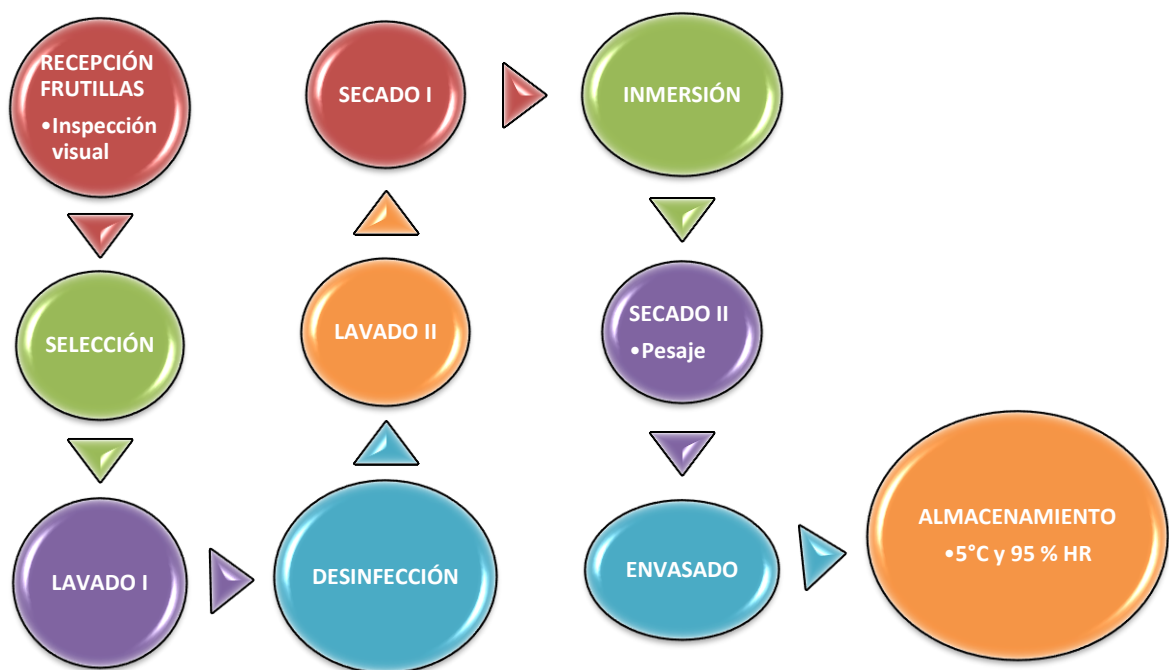


Figura 11. Proceso de inmersión/recubrimiento de las frutillas

Descripción del flujo de procesos:

- Recepción de Fruta: Se realizó inspección visual a la fruta recibida, verificando que esta no se encuentre en mal estado.
- Selección de Fruta: Se selecciona fruta sin deterioro visible (machucones, raspones, mal olor u hongos).
- Lavado I: se realizó un prelavado para eliminar suciedad superficial y preparar la fruta para la sanitización.
- Sanitización: Se aplicó una solución clorada a concentración de 150 ppm durante 5 minutos
- Lavado II: Lavado para eliminar los residuos de cloro (3 minutos).
- Secado I: Secado durante 15 minutos a 20 °C con aire forzado.
- Inmersión: Se aplicaron 2 mezclas formadoras de películas entre proteínas de quínoa-quitosano, la primera correspondiente a la mezcla sin NPs (Mezcla), y en segundo lugar a mezcla de proteínas de quínoa-quitosano cargadas con NPs SFD al 5 % (Mezcla 5 % SFD). Se mantuvo una muestra sin aplicación de recubrimiento (Control). La aplicación de las películas fue mediante inmersión, sumergiendo la fruta en las mezclas correspondientes durante 3 min, para el caso de la fruta del grupo control se realizó una segunda inmersión en agua.
- Secado II: Secado durante 20 minutos a 20 °C con aire forzado en secador.
- Envasado: Se envasaron en grupos de 6 unidades en envases de plástico (PET) tipo clamshell.
- Almacenamiento: La fruta envasada fue transportada a una cámara de refrigeración a una temperatura de 5°C y 90 - 95 % HR

6.2.3 Evaluación de la vida útil de las frutillas

Durante el periodo de almacenamiento se tomaron muestras de frutillas control y recubiertas con las diferentes mezclas formadoras de películas cada cinco días: 0, 5, 10 y 15 días. Evaluando los siguientes parámetros de vida útil:

Pérdida de peso (PP): Se tomaron muestras de 200 g de fruta control y recubiertas en triplicado, y se determinó la pérdida de peso (balanza Chyo, modelo mj-300, Japón), en los diferentes períodos de evaluación durante el tiempo de almacenamiento. Las pérdidas de peso acumulado se expresaron como la pérdida porcentual del peso original.

Firmeza: Mediante la metodología descrita por Hernández-Muñoz et al., (2008) con una máquina universal de ensayos de materiales (Lloyd Instruments Limited, Lloyd LR- 5K. Hampshire, Inglaterra). Los parámetros definidos son: carga de la célula de 100 kg, diámetro del vástago de 1 mm, penetración del vástago de 5 mm, y la fuerza máxima fue de 4,0 N. Se realizó en triplicado.

pH: Se determinó según la norma NC-ISO 1842: 2001, utilizando un pH-metro (Modelo 537, KFW Microprocessor, EE.UU.).

Acidez titulable (AT): Mediante titulación ácido-base, según la norma NCISO 750: 2001. Los resultados se expresaron en g de ácido cítrico/100 mL de pulpa de fruta.

Sólidos solubles totales (SS): Se determinó con un refractómetro digital, y se expresaron en porcentaje, según la norma NC-ISO 2173: 2001.

Relación sólidos solubles/acidez titulable: Se calculó como el cociente entre el porcentaje de SS y la AT.

Decaimiento fúngico: Se determinó el decaimiento fúngico, por inspección visual los días 0, 5, 7 y 10 de almacenamiento. Todas las frutillas que visualmente presentaban crecimiento de hongos en su superficie se consideraron deterioradas. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de frutos contaminados.

Recuento de hongos y levaduras: Se realizaron según la NC-ISO 7954:2002. Se tomaron muestras de 10 g de fruta control y recubiertas y se prepararon las diluciones necesarias para la cuantificación de las UFC/g de muestra.

6.2.4. Análisis sensorial

Se realizó un test de Karlshure a 8 jueces, donde se evaluó; color (interno y externo), aroma, textura, sabor y apariencia general. Las evaluaciones se realizaron en el Laboratorio de Evaluación Sensorial de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, en los días 1, 5 y 12 de almacenamiento de la fruta, a 5 °C y 95 % HR

6.2.5. Análisis estadístico

Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Como estadígrafos se utilizaron promedio y desviación estándar para realizar el análisis de datos. Se utilizó ANOVA de una y dos vías según fuese necesario, el método empleado para discriminar entre las medias fue el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para determinar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el programa StathGraphics Centurion XV (versión 2006).

6.3 Resultados y Discusión

6.3.1 Pérdida de peso durante el almacenamiento

En la Figura 12 se presenta el porcentaje de pérdida de peso (%PP) de las frutillas control y recubiertas con películas con y sin NPs generadas por SFD durante el almacenamiento.

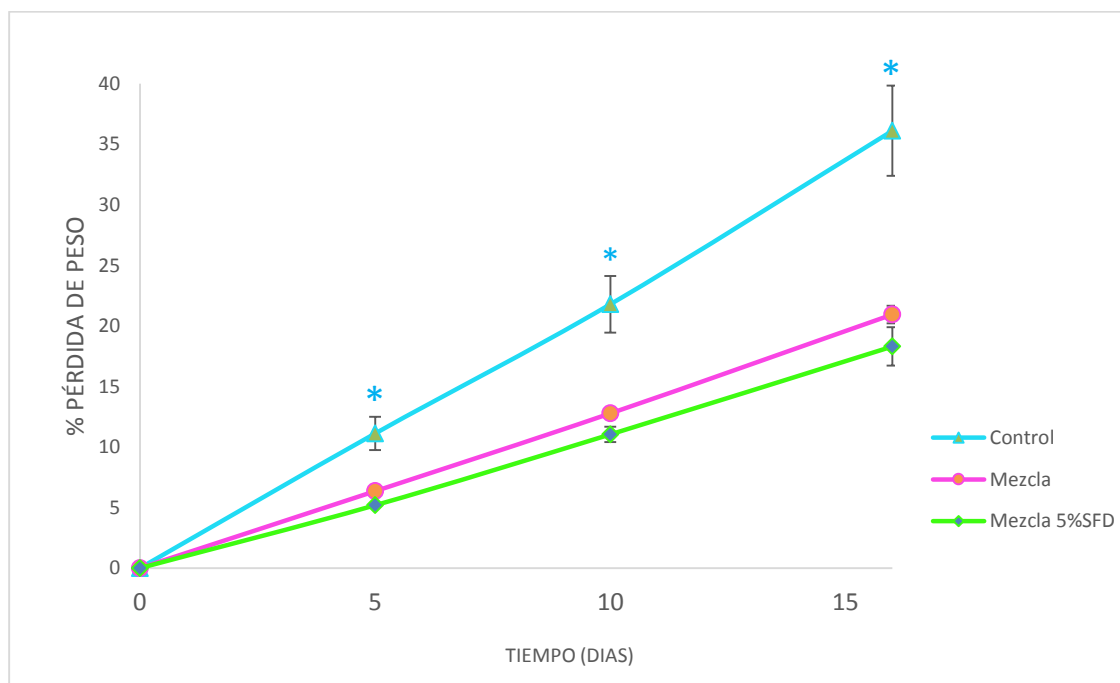


Figura 12. Porcentaje de pérdida de peso v/s tiempo de almacenamiento (días) de las frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD). * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras en cada tiempo ensayado.

Se pudo observar el aumento significativo del % PP con la prolongación del período de almacenamiento en todos los tratamientos, además, se observa que durante todo el tiempo de almacenamiento las muestras recubiertas pierden significativamente menos peso que el control, sin diferencias significativas entre el tratamiento con recubrimiento sin NPs y con adición de 5 % de NPs QT-SFD. El día 5 de almacenamiento la muestra sin recubrimiento (control) presenta un %PP de 11 %,

mientras que las muestras recubiertas presentan valores de 6,4 % para la aplicación de recubrimiento sin nanopartículas y un 5,2 % para la aplicación de recubrimiento con NPs. Durante el día 10 la muestra sin recubrimiento (control) posee un valor de %PP de 22 % mientras que las muestras recubiertas un 11 % para recubrimiento sin nanopartículas (mezcla) y un 12,8 % para recubrimiento con NPs (mezcla 5 % SFD). Finalmente al día 16 la muestra control reduce su peso en un 36 %, mientras que las muestras recubiertas presentan un disminución de un 18,3 % para recubrimiento sin NPs y 21 % para recubrimiento con NPs.

Se ha descrito que los recubrimientos comestibles constituyen barreras físicas efectivas contra la pérdida de humedad de frutas debido a que permiten controlar la difusión de gases en los estomas; organelos que regulan el proceso de transpiración e intercambio gaseosos entre la fruta y su entorno (Colla, Sobral & Menegalli, 2006; Guerreiro, et al., 2015; Nadim, et al., 2015), de esta manera se deduce que los resultados encontrados en este estudio se deben a que los recubrimientos con y sin NPs generan una barrera semipermeable a la transferencia de H₂O disminuyendo la transpiración de la fruta. Estos resultados han sido reportados en otros estudios; Amal, et al., (2010), utilizaron recubrimientos comestibles en base a proteína de soja y gluten, con adición de timol o cloruro de calcio, encontrando que dichos tratamientos disminuyen significativamente la pérdida de peso de frutillas durante su almacenamiento. Por otro lado, Colla, Sobral & Menegalli (2006) desarrollaron un compuesto en base harina de amaranto y ácido esteárico que redujo significativamente la PP de frutillas durante el almacenamiento en relación al control.

Sin embargo, en otros trabajos en los que se han recubierto frutillas con mezclas basadas en hidrocoloides no se ha observado un efecto significativo sobre la disminución del %PP de las frutas, posiblemente porque también hay otros factores que afectan las propiedades de barrera de las películas después de su aplicación en las frutas; como la distribución del recubrimiento en el contorno de las frutillas, la capacidad de éste para formar una capa continua y/o de penetrar en los poros del fruta, la morfología de la piel del fruto y las propiedades mecánicas y de adhesividad del recubrimiento, que afectan notablemente los procesos de transferencia de gases del fruto cuando es recubierto (Valenzuela et al., 2015). También se ha planteado que

las diferencias observadas en la habilidad de reducir el %PP durante el almacenamiento se atribuya a las diferentes PVA de los polisacáridos usados en la formulación del recubrimiento comestible (Guerreiro, et al., 2015). El estudio de Valenzuela et al., (2015) utilizó recubrimientos comestibles en base a Q, a Q-proteína de quínoa (en relación v/v 90:10), y a Q-proteína de quínoa-aceite, sin observar diferencias significativas en el %PP durante el tiempo de almacenamiento, salvo en el tratamiento con recubrimiento de Q, que mostró el mayor %PP a los 15 días, atribuido a la naturaleza hidrofílica de Q que actuaría aumentando el flujo de vapor de agua a través de la película. En nuestro caso la mayor fracción de proteína de quínoa adicionada a la mezcla (relación Q-proteína de quínoa 50:50) implicaría una menor PP ya que la naturaleza hidrofílicas de ambos polímeros los haría interactuar entre sí mediante puentes de hidrogeno (Abugoch et al., 2011), dejando menor proporción de enlaces disponibles para interactuar con las moléculas de agua.

6.3.2 Recuento de hongos y levaduras

Se realizó un recuento de hongos filamentosos (mohos) y levaduras a partir de la observación del desarrollo de colonias en medio de cultivo selectivo y diferencial para microorganismos de naturaleza fungi. En la Figura 13 se presentan los resultados del recuento de hongos y levaduras expresado en logaritmo de las unidades formadoras de colonias/g de muestra (log UFC/g) para las frutillas sin recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de Q-PQ sin NPs (mezcla) y con 5 % de NPs QT generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD).

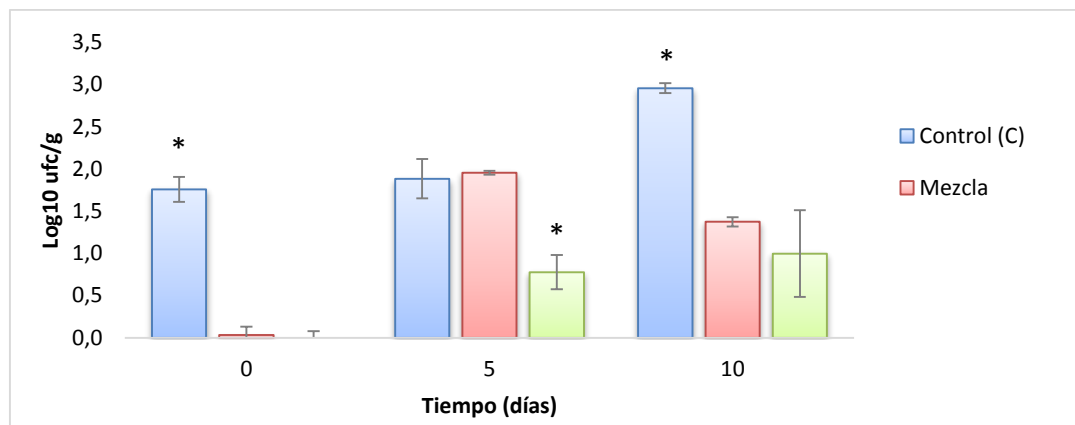


Figura 13. Recuento total de hongos filamentosos y levaduras de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD). * indica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre tratamientos en cada tiempo de ensayo.

Se observó un aumento significativo del desarrollo de hongos y levaduras, durante el período de almacenamiento, en todos los tratamientos. Sin embargo, los tratamientos con recubrimientos (con y sin NPs) permitieron obtener un menor nivel de carga de microorganismos que el control. En el día 0 de almacenamiento las frutillas control presentaron diferencias significativas con un recuento de hongos y levaduras de 1,8 log UFC/g, en comparación a las recubiertas, que generaron un efecto protector inmediato al no presentar desarrollo. Para el día 5 de almacenamiento las frutillas recubiertas con películas que poseen NPs generaron una protección antifúngica que se reflejó en una disminución significativa del recuento de hongos y levaduras totales con un valor de 0,8 log UFC/g, respecto de las frutillas control y mezcla, que presentaron conteos de 1,9 log UFC/g y 2,0 log UFC/g, respectivamente. En el día 10 de almacenamiento el recuento de hongos y levaduras aumentó significativamente, respecto al día 5 para las muestras sin recubrimiento que alcanzó un nivel de 3,0 log UFC/g, contrario a las muestras recubiertas con y sin NPs que no presentan un aumento significativo con respecto a los valores del día 5, con conteos de 1,4 log UFC/g para recubrimiento control sin NPs y 1,0 log UFC/g para recubrimientos con NPs.

Durante el período de estudio los conteos de hongos y levaduras se mantuvieron bajo el límite máximo permitido en alimentos (5 Log₁₀ UFC/g) (Stannard, 1997), incluso en el grupo control.

Los resultados observados concuerdan con lo descrito previamente en la literatura; Vu et al., (2011) reporta que la actividad antimicrobiana de aceites esenciales de tomillo y orégano tienen la más alta efectividad en el control de hongos y flora total aislada de frutillas. Por su parte, Amal et al., (2010), observó que el tratamiento de frutillas con recubrimientos de proteína de soja o gluten + timol generan las más bajas cargas de microorganismos. En el trabajo de Guerreiro et al., (2015) el tratamiento con recubrimientos con aceites esenciales de eugenol y citriol permite un menor desarrollo de hongos y levaduras en la misma fruta. En el trabajo de Valenzuela et al., (2015) se observó que recubrimientos en base a Q y Q-proteína de quínoa permitían un menor desarrollo de hongos y levaduras que el grupo de frutillas no recubiertas.

Los mecanismos envueltos en el control de microorganismos mediante los activos utilizados en este estudio fueron descritos previamente en el Capítulo 1 e incluyen alteraciones a nivel de membrana; particularmente en el caso de timol y otros terpenos, pueden generar trastornos de la permeabilidad de la membrana plasmática de los hongos al generar una disminución de los lípidos totales y ergosterol en las células, con el consecuente arranque de los constituyentes citoplasmáticos (Tao et al., 2014), además de tener efectos inhibitorios sobre complejos enzimáticos, como el complejo ATP-asa, histidin Descarboxilasa, amilasa, entre otros (Hyldgaard et al., 2012).

6.3.3 Decaimiento fúngico

En la Figura 14 se muestran los resultados de decaimiento fúngico (DF) de las frutillas sin recubrimiento y recubiertas (con y sin NPs) durante un período de 10 días almacenadas a 5 °C y 95 % HR. Se pudo observar que al día 0 y 5 de almacenamiento ninguna de las muestras evidencia un deterioro fúngico apreciable. Para el día 7 de almacenamiento, las muestras sin recubrimiento (control) y con

recubrimiento sin NPs adicionadas (mezcla), presentan un crecimiento de hongos de un 12,5 % aprox., mientras que en la muestra con recubrimiento con NPS (mezcla 5 % SFD) no se observó la presencia de hongos hasta el día 9 (foto no mostrada), es decir, el tratamiento con recubrimiento con NPs permitió generar un efecto protector sobre las frutillas, extendiendo en 2 días su almacenamiento sin mostrar señales de deterioro fúngico, lo que equivale a un 30 % de mayor duración en almacenamiento. Al décimo día, las frutillas sin recubrimiento (control) y las tratadas con recubrimiento sin NPs (mezcla) presentaron un DF de un 20 %, mientras que las frutillas con recubrimiento con NPs al 5 % de concentración (mezcla 5 % NPs SFD) presentaron al mismo período un crecimiento fúngico de un 10 %. Por lo tanto, el tratamiento con mezcla Q-PQ con adición de NPs de QT genera un efecto protector significativo contra el daño por hongos cuando es aplicado en forma de recubrimiento sobre frutillas frescas.













Tiempo (días)	Control	Mezcla	Mezcla 5% SFD
0			
5			
7			
10			

Figura 14. Fotografías de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD). Almacenadas a 5 °C y 95 % HR. En amarillo se indica el % de decaimiento fúngico de la muestra en el período de tiempo determinado.

6.3.4 Variación de la firmeza

En la Tabla 10, se presenta la variación de la firmeza (N) de las frutillas control y recubiertas con películas de Q-PQ sin NPs (mezcla), y cargadas con NPs SFD al 5 % (mezcla 5 % SFD) durante el tiempo de almacenamiento en cámara de frío a 5°C y 95 % HR.

Tabla 10. Firmeza (N) de las frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD) en los tiempos de almacenamiento analizados.

Firmeza (N)			
	Día 0	Día 5	Día 10
Muestras	Media±DE	Media±DE	Media±DE
Control	1,25 ^{aX} ± 0,68	1,16 ^{aX} ± 0,47	1,22 ^{aX} ± 0,60
Mezcla	1,45 ^{aX} ± 0,63	1,50 ^{abX} ± 0,76	1,47 ^{aX} ± 0,87
Mezcla 5%SFD	1,25 ^{aX} ± 0,68	1,65 ^{bY} ± 0,57	1,36 ^{aXY} ± 0,76

DE: desviación estándar

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras en un mismo tiempo (a-b) y por muestra a lo largo del tiempo de almacenamiento (X-Y).

Al inicio y final del ensayo (Día 0 y 10) no se observaron diferencias significativas en la firmeza de las frutillas para ninguno de los tres tratamientos, es decir, la aplicación de recubrimiento con o sin NPs no genera modificaciones de la firmeza en comparación al control sin recubrimiento en estos tiempos, sólo se observó que el tratamiento con recubrimiento (con o sin NPs) genera un aumento significativo ($p < 0,05$) de la firmeza al día 5 de almacenamiento, lo que puede atribuirse y es concordante a la menor pérdida de peso que se observa con la aplicación de recubrimiento. Por otro lado, el tratamiento con recubrimiento con NPs también puede generar un efecto protector de la firmeza de las frutillas debido a un mayor control microbiológico, concordante con los resultados de conteo de hongos y levaduras descritos previamente; donde se observó que el tratamiento con recubrimiento con NPs generó un menor recuento de hongos y levaduras y un menor decaimiento fúngico.

La aplicación de recubrimientos comestibles se menciona en varios estudios como una estrategia para controlar la migración de humedad desde las frutas y por lo tanto, controlar la integridad y la textura de frutillas durante el almacenamiento (Maftoonazad y Ramaswamy's, 2005; Colla, Sobral & Menegalli, 2006; Nadim et al., 2015), además se atribuyen dichos resultados a un posible efecto de reducción del metabolismo de la fruta con la aplicación del recubrimiento, donde la retención de la firmeza puede atribuirse al retardo en la degradación de protopectinas de naturaleza insoluble en pectinas más solubles (Maftoonazad y Ramaswamy's, 2005).

6.3.5 Sólidos solubles (SS), pH, acidez titulable (AT) y relación SS/AT

En la Tabla 11 se presenta la variación de acidez titulable (AT), sólidos solubles (SS=°Brix) e índice de madurez (IM) de las frutillas control y recubiertas con y sin NPs durante el almacenamiento:

Se pudo observar que los valores de los parámetros evaluados se encontraban dentro de los rangos de normalidad descritos para las variedades de frutillas chilenas (Ampuero, 2008). Para un sabor aceptable de frutillas se recomienda un mínimo de 7 % de sólidos solubles y/o un máximo de 0,8 % de acidez titulable (Santos & Kirschbaum, 2012). En este trabajo los valores para SS se mantuvieron dentro de dicha recomendación de calidad.

Tabla 11.- Sólidos solubles (SS), pH, acidez titulable (AT) y relación SS/AT de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD). Almacenadas a 5 °C y 95 % HR.

Muestras	Media±DE 0 días	Media±DE 5 días	Media±DE 10 días
Sólidos solubles			
Control	9,33 aX ± 1,21	9,80 aX ± 1,05	8,90 aX ± 1,37
Mezcla	8,80 aX ± 0,92	9,05 aX ± 0,05	9,10 aX ± 0,79
Mezcla 5 %SFL	8,73 aX ± 1,50	9,63 aX ± 1,24	10,07 aX ± 0,12
pH			
Control	3,30 aY ± 0,08	3,26 aXY ± 0,07	3,23 aXY ± 0,09
Mezcla	3,36 aX ± 0,11	3,23 aX ± 0,04	3,25 aX ± 0,07
Mezcla 5 %SFL	3,28 aX ± 0,13	3,25 aX ± 0,10	3,34 ab ± 0,10
Acidez Titulable			
Control	1,08 bXY ± 0,09	0,96 aX ± 0,06	1,11 aY ± 0,02
Mezcla	0,86 aX ± 0,03	0,98 aX ± 0,01	1,35 aY ± 0,63
Mezcla 5 %SFL	0,92 aX ± 0,07	0,94 aX ± 0,12	0,99 aY ± 0,14
Relación SS/AT			
Control	8,65 aXY ± 0,73	10,2 aY ± 0,81	8,05 aX ± 1,41
Mezcla	10,3 aX ± 1,3	9,20 aX ± 0,09	7,75 aX ± 0,34
Mezcla 5 %SFL	9,61 aX ± 2,35	10,4 aX ± 2,61	10,3 aX ± 1,43

DE: desviación estándar

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras en un mismo tiempo (a-b) y por muestra a lo largo del tiempo de almacenamiento (X-Y).

Las determinaciones de SS, pH y AT en los 3 tiempos de análisis indican que la aplicación de recubrimiento (con o sin NPs) no genera un efecto en la variación de estos parámetros, ya que no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las frutillas control y las recubiertas durante todo el período de almacenamiento. Con respecto a la variación de los parámetros a lo largo del tiempo de almacenamiento se observó un aumento significativo de la AT al día 10, independiente del tratamiento realizado.

Se deduce que las variaciones observadas en los parámetros presentados en la Tabla 11 están relacionados con el proceso de maduración de las frutillas,

independiente del tratamiento aplicado, al ser frutas no climatéricas, los cambios fisiológicos son menos notorios, y en general, las variaciones los SS y AT se atribuyen principalmente a la deshidratación de la fruta, que incide directamente en la pérdida de peso y la firmeza. Resultados similares a los observados en este estudio fueron descritos por Valenzuela et al., (2015) quienes reportan que los SS, AT y relación SS/AT no fueron afectados por la aplicación del recubrimiento y que los cambios observados en estos parámetros al final del periodo de almacenamiento se deben al fenómeno de senescencia de los frutos.

6.3.6 Análisis sensorial

Se realizó un test de valoración de la calidad (Test de Karlshure) a un panel entrenado de 8 jueces. Los atributos evaluados fueron, el color, aroma, textura, sabor, y color. Estos atributos fueron seleccionados ya que son los elementos de calidad que el consumidor considera (Valenzuela et al., 2015).

Test de Karlshure

Los resultados del test de valoración de calidad con escala Karlshure se observan en la Tabla 12:

Tabla 12. Grado de calidad asignado a cada muestra a partir de la evaluación sensorial en el día 0, 5 y 12 de almacenamiento de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD).

Muestras	DIA 0		DIA 5		DIA 12	
	Promedio de la Calidad total	Grado	Promedio de la Calidad total	Grado	Promedio de la Calidad total	Grado
Control	7,1	I*	7,9	I*	5,2	II**
Mezcla	7,5	I*	7,5	I*	3,3	III***
Mezcla 5 %SFD	7,3	I*	7,6	I*	6,1	II**

* Grado de calidad I: rango: 7- 9

** Grado de calidad II: rango: 4 - 6,9

*** Grado de Calidad III: rango:1-3,9

Para el día 0 y 5, las frutillas de los 3 grupos (control, mezcla y mezcla 5%-SFD) se encuentran dentro del grado de calidad I (Rango: 7,0- 9,0), lo que indica que son productos aptos para su comercialización (ya que el límite de comercialización 5,5), esto implica que los frutos presentan características típicas y apreciaciones como excelente, muy buena y buena (Wittig, 2001). Al día 12 de almacenamiento las muestras recubiertas con NPs presentaron un valor promedio de 6,1, dentro del grado II de deterioro tolerable, pero fue la única aceptable para su comercialización en dicho período, el puntaje obtenido con el tratamiento de recubrimiento con NPs se clasifica como de calidad satisfactoria, en contraste con las frutillas control sin recubrimiento que a pesar de pertenecer al grupo grado II de deterioro tolerable, presentan un puntaje de 5,2 clasificado como regular e inferior al límite de comercialización de 5,5. En el mismo período de 12 días de almacenamiento las muestras con recubrimiento sin NPs son las que presentaron el menor puntaje, con un valor de 3,3, dentro del grado de calidad III de deterioro indeseable, calidad defectuosa y bajo el límite de comestibilidad de 4 (Wittig, 2001). Se deduce que el tratamiento con NPs genera un efecto protector de las características organolépticas de las frutillas, estos resultados se atribuyen a un posible control microbiológico logrado con la aplicación de recubrimiento con NPs QT, concordante con los resultados de menor recuento de hongos y levaduras y menor decaimiento fúngico observado, así como también a la menor pérdida de peso observada en los frutos recubiertos.

En la literatura son pocos los estudios sobre recubrimientos en frutillas que toman en cuenta la aceptabilidad de los consumidores, con la aplicación de paneles sensoriales, al respecto se puede citar el trabajo de Guerreiro et al., (2015), quienes trabajaron con recubrimientos de alginato de sodio y aceites esenciales, observando que a los 7 días de almacenamiento las muestras se encontraban en su mayoría en un estado de evaluación de 4 que es el mínimo aceptado para consumo, y a los 14 días todas las muestras estaban fuera del óptimo sensorial de consumo con una puntuación de 3. En general destacan con los mayores valores de puntaje sensorial los recubrimientos de alginato de sodio + eugenol o citriol posiblemente debido al efecto antimicrobiano de estos tratamientos. En el estudio de Valenzuela et al., (2015) la aplicación de recubrimientos comestibles elaborados en base a Q y proteína de quínoa sobre frutillas no mostraron diferencias significativas con el grupo control en

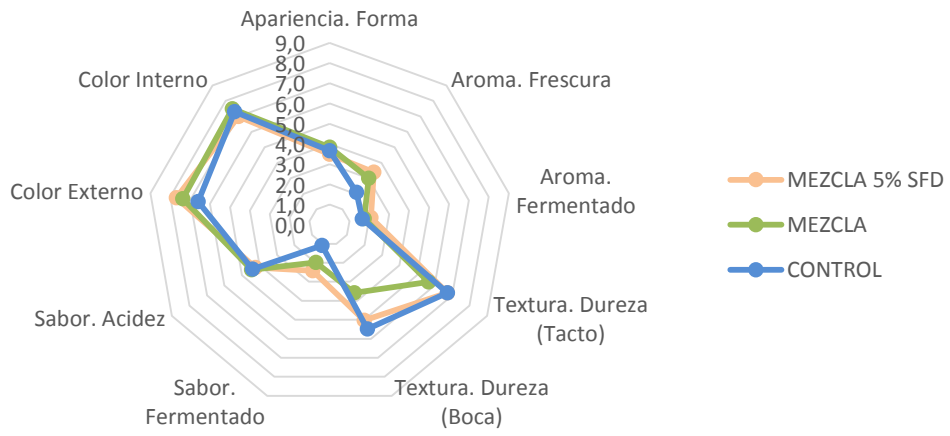
todo el tiempo de evaluación, es decir, los panelistas no fueron capaces de detectar diferencias organolépticas importantes tras la aplicación de los tratamientos.

La vehiculización de aceites esenciales o sus derivados en recubrimientos comestibles permite generar un menor impacto en las características organolépticas de frutillas dado el enmascaramiento en la matriz polimérica y en el caso particular de este trabajo, por la protección primaria del activo en la nanopartícula, lo que genera que al tiempo 0 no se observen diferencias organolépticas significativas entre la fruta recubierta y la no recubierta, contrario a lo descrito para aplicaciones directas de aceites esenciales sobre la fruta, como lo reportado por Vu et al., (2011), quienes utilizaron aceites esenciales pulverizados sobre la fruta, destacando la baja puntuación sensorial para parámetros de sabor y olor tras la utilización de aceite esencial de timol.

Test de escala lineal no estructurada

En la Figura 15 se pueden observar los gráficos obtenidos del análisis sensorial de las frutillas control y recubiertas con y sin NPs durante un periodo de almacenamiento de 12 días (tiempo final ya que todas las muestras presentaban un deterioro visible).

A) 0 días



B) 5 días

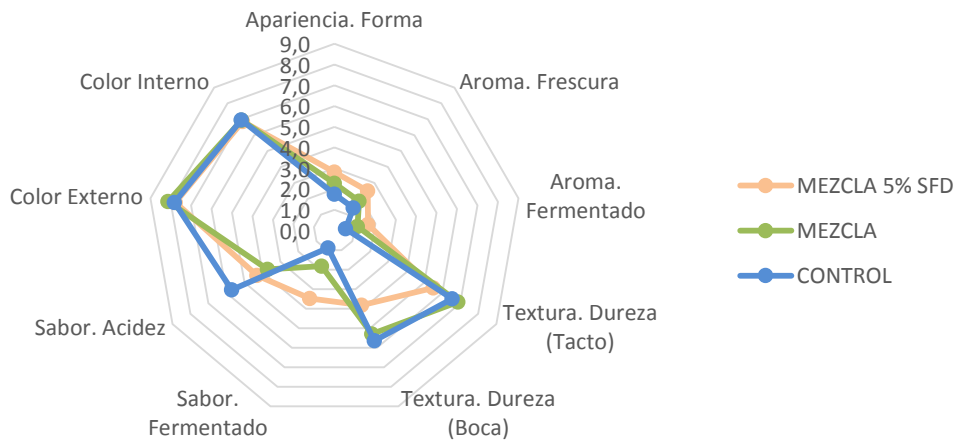




Figura 15. Gráficos del análisis sensorial descriptivo. Días 0 (A), 5 (B) y 12 (C) de almacenamiento de frutillas sin tratamiento con recubrimiento (control) y sometidas a tratamiento con recubrimiento de quitosano-proteína de quínoa sin nanopartículas (mezcla) y con 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica (mezcla 5 % SFD).

La evaluación sensorial hecha a las frutillas al inicio del ensayo (Figura 15.A) no evidencia diferencias significativas en los parámetros de apariencia, acidez, aroma a fermentado y color interno, entre los tratamientos y el control. Al mismo período, se encontraron diferencias significativas y una menor puntuación en el parámetro aroma a fresca en las muestras sin recubrir (control), con un puntaje de 2,1 respecto de las recubiertas que presentan puntaje mayor a 3. El aroma de los alimentos es una de las particularidades organolépticas más complejas de definir, en el caso particular de frutillas, los compuestos volátiles son los responsables del aroma y también contribuyen al sabor, estos compuestos comprenden solamente del 0,01 % al 0,001 % del peso fresco de la fruta, pero tienen un efecto muy grande en su calidad (Alcántara, 2009). En ese sentido se puede deducir que la aplicación del recubrimiento, al generar una micro atmósfera sobre la fruta y una concentración de los compuestos volátiles de la misma lo que acentúa su olor a fresca y sería un aporte sobre la calidad del fruto recién cosechado. El parámetro de color también se ve favorecido con la aplicación del recubrimiento, presentando puntajes significativamente mayores los frutos recubiertos respecto al control que presenta un

valor de 6,6, mientras que las frutillas recubiertas sin NPs presentaron un valor de 7,4 y las recubiertas con NPs un valor de 7,7, se puede deducir que la aplicación del recubrimiento resalta la coloración natural del fruto, efecto particularmente importante, ya que el color es sin duda el primer factor de calidad que percibe el consumidor, en el caso de la frutilla es uno de los factores más importantes en la apariencia de las mismas e influye de manera decisiva en la evaluación sensorial del alimento, además, la evaluación visual del color es previa a las demás (sabor, olor, textura, etc.), por lo que puede actuar en forma excluyente y llevar al rechazo de un producto previo a evaluar el resto de sus parámetros de calidad.

Al día 5 de almacenamiento (Figura 15.B) no se observan diferencias significativas entre los tratamientos en los parámetros de apariencia, aroma (frescura y fermentado) y color (externo e interno). La textura, representada por dureza al tacto y en boca, arroja en este período los valores más bajos para las muestras recubiertas con NPs; dureza al tacto con valores de 6,6 para frutillas control, 6,9 para recubrimiento sin NPs y 5,5 para recubrimiento con NPs, y la dureza en boca de las frutillas sin recubrimiento un valor de 5,6, 5,3 para recubrimiento sin NPs y 3,8 para recubrimiento con NPs. Por otro lado, el parámetro de sabor a fermentado presenta en este período un valor significativamente mayor en el tratamiento con NPs, con puntaje de 3,5 mientras que las frutillas con recubrimiento sin NPs presentaron un valor de 1,8 y el control sin recubrimiento un valor de 0,9. Por su parte, el parámetro sabor a acidez se presenta con un valor significativamente mayor en el grupo control con un puntaje de 5,7, mientras que en el recubrimiento sin NPs el valor fue de 3,7 y para el recubrimiento con NPs el valor fue de 4,3.

Para el día 12 la evaluación sensorial (Figura 15.C) el parámetro de aroma a fermentado presenta un valor significativamente menor para el recubrimiento con NPs, con puntaje de 1,3, mientras que las frutillas con recubrimiento sin NPs presentaron un valor de 4,4 y el control un valor de 3. Además, en este período el parámetro de color externo presenta un valor significativamente mayor con la aplicación de recubrimiento con NPs de 5,5 v/s un puntaje de 4,7 para el grupo control y 4,3 para recubrimiento sin NPs. En el mismo período no se observan diferencias significativas entre los tratamientos para los parámetros de dureza al tacto

y color interno. La evaluación de los parámetros dureza en boca, sabor fermentado y sabor a acidez no fueron evaluados por los elevados resultados del análisis microbiológico en todas las muestras.

6.4 Conclusiones del capítulo

- Las frutillas recubiertas (con y sin nanopartículas) pierden significativamente menos peso que el control durante todo el tiempo de almacenamiento, por lo que se deduce que el recubrimiento genera una barrera semipermeable a la transferencia de H₂O disminuyendo la transpiración de la fruta.
- Los tratamientos con recubrimientos (con y sin nanopartículas) presentaron recuentos de hongos y levaduras significativamente menores que el control, sin provocar cambios significativas de los parámetros fisicoquímicos de la fruta.
- Las frutillas recubiertas con nanopartículas presentaron un decaimiento fúngico significativamente menor respecto a la aplicación de recubrimiento sin nanopartículas y al control, retrasando la aparición de deterioro fúngico desde 7 a 9 días, lo que equivale a un 30 % de mayor duración sin daño fúngico.
- Las evaluaciones sensoriales utilizadas en este estudio dan cuenta de un efecto protector sobre la vida útil de las frutillas a partir de la utilización de recubrimiento con NPs por sobre el recubrimiento sin NPs y el control, estos resultados son concordantes además con los resultados del análisis microbiológico y decaimiento fúngico que también indican un efecto positivo sobre la calidad postcosecha derivado de la aplicación de recubrimientos de quitosano-proteína de quínoa con NPs de QT.

7 CONCLUSIONES GENERALES

- Se determinó que la adición de hasta un 5% de nanopartículas quitosano-timol (obtenidas por gelificación iónica y atomización criogénica) en películas de quitosano-proteína de quínoa permite disminuir significativamente la permeabilidad al vapor de agua de las películas.
- La adición de 1 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por gelificación iónica y hasta 5 % de nanopartículas quitosano-timol generadas por atomización criogénica en las películas de quitosano-proteína de quínoa no afectaron las propiedades mecánicas de las mismas.
- La aplicación de recubrimientos comestibles en base a quitosano y proteína de quínoa con adición de nanopartículas de quitosano-timol sobre frutillas frescas, permitió mejorar parámetros de evaluación de vida útil como: menor porcentaje de pérdida de peso y menor recuento de hongos y levaduras, sin provocar cambios significativos en la firmeza y los parámetros fisicoquímicos de la fruta.
- Los resultados permiten concluir que el uso de nanotecnología es una estrategia viable para mejorar la funcionalidad de películas elaboradas a partir de biopolímeros, y puede contribuir al desarrollo de un nuevo material de envasado para alimentos; que cumpla con los requisitos actuales para un material de envase óptimo; biodegradable, no tóxico, de fuentes renovables alternativas al uso de plásticos derivados del petróleo.
- Los resultados sugieren la necesidad de nuevas investigaciones que permitan optimizar la composición de películas comestibles elaboradas en base a

quitosano y proteína de quínoa, con adición de nanopartículas de quitosano-timol, particularmente es necesario lograr un mayor control de la PVA de la película, y que esto se traduzca en un mayor control de la pérdida de peso tras la aplicación del recubrimiento en frutas frescas, pueden definirse nuevas cargas de nanopartículas y nuevos mecanismos de incorporación de las mismas a los recubrimientos, también pueden ser ensayados formas alternativas de aplicación de la película a la fruta.

REFERENCIAS

- Abdollahi, M., Alboofetileh, M., Behrooz, R., Rezaei, M., & Miraki, R. (2013). Reducing water sensitivity of alginate bio-nanocomposite film using cellulose nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 54, 166-173. Retrieved Mar, from
- Abugoch, L. E. (2009). Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, Chemistry, Nutritional, and Functional Properties. 58, 1-31.
- Abugoch, L. E., Romero, N., Tapia, C. A., Silva, J., & Rivera, M. (2008). Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* willd) protein isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4745-4750. Retrieved Jun 25, from
- Abugoch, L. E., Tapia, C., Villaman, M. C., Yazdani-Pedram, M., & Diaz-Dosque, M. (2011). Characterization of quinoa protein-chitosan blend edible films. *Food Hydrocolloids*, 25(5), 879-886. Retrieved Jul, from
- Agnihotri, S. A., Mallikarjuna, N. N., & Aminabhavi, T. M. (2004). Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 100(1), 5-28. Retrieved Nov 5, from
- Agullo, E., Rodriguez, M. S., Ramos, V., & Albertengo, L. (2003). Present and future role of chitin and chitosan in food. *Macromolecular Bioscience*, 3(10), 521-530. Retrieved Oct 15, from
- Akbari, B., Pirhadi, M., & M., Zandrahimi. (2011). Particle size characterization of nanoparticles: A practical approach. In *Iranian Journal Of Material Science and Engineering*. Vol. 8, pp. 48-56).
- Aktas, Y., Andrieux, K., Alonso, M. J., Calvo, P., Gursoy, R. N., Couvreur, P., et al., (2005). Preparation and *in vitro* evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. *International Journal of Pharmaceutics*, 298(2), 378-383. Retrieved Jul, from
- Alcántara, M. D. L. (2009). Estimación de los daños físicos y evaluación de la calidad de la fresa durante el manejo poscosecha y el transporte simulado Universidad Politécnica De Valencia.
- Ali, S. W., Rajendran, S., & Joshi, M. (2011). Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers*, 83(2), 438-446. Retrieved Jan 10, from
- Almenar, E., Samsudin, H., Auras, R., Harte, B., & Rubino, M. (2008). Postharvest shelf life extension of blueberries using a biodegradable package. *Food Chemistry*, 110(1), 120-127. Retrieved Sep 1, from

Amal, S. H., Atress, M. M., El-Mogy, H. E., Aboul, A., & Alsanius, B. W. (2010). Improving Strawberry Fruit Storability by Edible Coating as a Carrier of Thymol or Calcium Chloride *Journal of Horticultural Science & Ornamental Plants*, 2(3), 88-97.

Ampuero, L. (2008). Estudio piloto de mercado regional y majeo postcosecha de seis variedades de frutillas en la XII Región de Magallanes y Antártica Chilena. Universidad de Magallanes.

Angón, P., Santos, N., & Hernández, C. (2006). Índices para la determinación de las condiciones óptimas de maduración de un fruto. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 10(30), 3-8.

Antoniou, J., Liu, F., Majeed, H., Qi, J., Yokoyama, W., & Zhong, F. (2015). Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 465, 137-146. Retrieved Jan 20, from

Appendinia, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 3, 113-126.

Asasutjarit, R., Chayanid, S., Nardauma, T., & Sirijit, P. (2013). Effect of Formulation Compositions on Particle Size and Zeta Potential of Diclofenac Sodium-Loaded Chitosan Nanoparticles. *International Journal of Medical, Health, Pharmaceutical and Biomedical Engineering*, 7(9), 309-311.

Barioglio, Carlos Fernando (2006). *Diccionario de Las Ciencias Agropecuarias*. 1ª ed. Encuentro Grupo Editor. Córdoba. Argentina. ISBN 897-23022-4-3

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. Retrieved Jan, from

Balú, A. (2012). *Nanopartículas soportadas sobre materiales porosos para la síntesis de productos de alto valor añadido*. (Doctor), Universidad de Córdoba, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba.

Barbosa-Cánovas, G., Fernández-Molina, J. J., Alzamora, S. M., Tapia, M. S., López-Malo, A., & Welti Chanes, J. (2003). Handling and preservation of fruits and vegetables by combined methods for rural areas, *FAO Document Repository*.

Barney, D., & Hummer, K. (2005). *Currants, Gooseberries, and Jostaberries: A Guide for Growers, Marketers, and Researchers in North America*.

Bauer, A.W., Kirby, W.M., Sherris J.C. y Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol*, 45, 493-496.

Becherán, L. (2011). Estudio físico-químico de la reacción de acomplejamiento de la quitosana con el alginato de sodio y con el poli(ácido acrílico) y de la formación de partículas nanométricas de ambos complejos como potenciales portadoras de fármacos. Universidad De La Habana.

Beuchat LR. 2001. Control of foodborne pathogens and spoilage microorganisms by naturally occurring antimicrobials. En: Microbial Food Contamination. Wilson CL, S Droby. (Ed.). CRC Press. London, UK. pp: 149-169.

Bilensoy, E., Sarisozen, C., Esendagli, G., Dogan, A. L., Aktas, Y., Sen, M., et al., (2009). Intravesical cationic nanoparticles of chitosan and polycaprolactone for the delivery of Mitomycin C to bladder tumors. International Journal of Pharmaceutics, 371(1-2), 170-176. Retrieved Apr 17, from

Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. International Food Research Journal, 15(3).

Brinegar, C., & Goundan, S. (1993). Isolation and characterization of chenopodin, the 11s seed storage protein of quinoa (*Chenopodium-quinoa*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41(2), 182-185. Retrieved Feb, from

Calvo, P., RemunanLopez, C., VilaJato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. Journal of Applied Polymer Science, 63(1), 125-132. Retrieved Jan, from

Caro N, Medina E, Diaz-Dosque M, Lopez L, Abugoch L, Tapia C (2016) Novel active packaging based on films of chitosan and chitosan/quinoa protein printed with chitosan-tripolyphosphate-thymol nanoparticles via thermal ink-jet printing. Food Hydrocolloids 52:520-532. doi:10.1016/j.foodhyd.2015.07.028

Casariego, A., Souza, B. W. S., Cerqueira, M. A., Teixeira, J. A., Cruz, L., Diaz, R., et al., (2009). Chitosan/clay films' properties as affected by biopolymer and clay micro/nanoparticles' concentrations. Food Hydrocolloids, 23(7), 1895-1902. Retrieved Oct, from

Castro, E., Taboada, P., & Mosquera, V. (2012). Polimerosomas de poli(butadieno)-bloque-poli(óxido de etileno) cargados con nanopartículas de oro. Revista Iberoamericana de Polímeros, 13(3).

Chambi, H. N. M., & Grosso, C. R. F. (2011). Mechanical and water vapor permeability properties of biodegradable films based on methylcellulose, glucomannan, pectin and gelatin. Ciencia E Tecnologia De Alimentos, 31(3), 739-746. Retrieved Jul-Sep, from

Chang, P. R., Jian, R. J., Yu, J. G., & Ma, X. F. (2010). Fabrication and characterisation of chitosan nanoparticles/plasticised-starch composites. Food Chemistry, 120(3), 736-740. Retrieved Jun, from

Chen, L. C., Kung, S. K., Chen, H. H., & Lin, S. B. (2010). Evaluation of zeta potential difference as an indicator for antibacterial strength of low molecular weight chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 82(3), 913-919. Retrieved Oct, from

Cheow, W. S., Ng, M. L. L., Kho, K., & Hadinoto, K. (2011). Spray-freeze-drying production of thermally sensitive polymeric nanoparticle aggregates for inhaled drug delivery: Effect of freeze-drying adjuvants. *International Journal of Pharmaceutics*, 404(1-2), 289-300. Retrieved Feb 14, from

Chu, C. L., Liu, W. T., Zhou, T., & Tsao, R. (1999). Control of postharvest gray mold rot of modified atmosphere packaged sweet cherries by fumigation with thymol and acetic acid. *Canadian Journal of Plant Science*, 79(4), 685-689. Retrieved Oct, from

Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. I., Wu, J. C. G., et al., (2004). Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), 932-936. Retrieved Jul, from

Colla, E., Sobral, P. J. A., & Menegalli, F. C. (2006). Effect of composite edible coating from *Amaranthus cruentus* flour and stearic acid on refrigerated strawberry (*Fragaria ananassa*) quality. *Latin American Applied Research*, 36(4), 249-254. Retrieved Oct, from

Cunningham, P., Ogale, A. A., Dawson, P. L., & Acton, J. C. (2000). Tensile properties of soy protein isolate films produced by a thermal compaction technique. *Journal of Food Science*, 65(4), 668-671. Retrieved May-Jun, from

De Alvarenga, E. S. (2011). *Characterization and Properties of Chitosan. Biotechnology of Biopolymers.*

de Moura, M. R., Aouada, F. A., Avena-Bustillos, R. J., McHugh, T. H., Krochta, J. M., & Mattoso, L. H. C. (2009). Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles. *Journal of Food Engineering*, 92(4), 448-453. Retrieved Jun, from

Defilippi, B. (2009). *Postcosecha de frutas y hortalizas. Inia.cl: INIA.*

Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703-714. Retrieved Dec, from

Duncan, T. V. (2011). Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 363(1), 1-24. Retrieved Nov, from

Durango, A. M., Soares, N. F. F., & Andrade, N. J. (2006). Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*, 17(5), 336-341. Retrieved May, from

Dutta, P. K., Dutta, J., & Tripathi, V. S. (2004). Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 63(1), 20-31. Retrieved Jan, from

El Ghaouth, A., Arul, J. G., Jean, & Asselin, A. (1992). Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. *Postharvest Pathology and Mycotoxins*, 82(4), 398-402.

Engstrom, J. D., Simpson, D. T., Cloonan, C., Lai, E. S., Williams, R. O., Kitto, G. B., et al., (2007). Stable high surface area lactate dehydrogenase particles produced by spray freezing into liquid nitrogen. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(2), 163-174. Retrieved Feb, from

Engstrom, J. D., Simpson, D. T., Lai, E. S., Williams, R. O., & Johnston, K. P. (2007). Morphology of protein particles produced by spray freezing of concentrated solutions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 65(2), 149-162. Retrieved Feb, from

Fan, W., Yan, W., Xu, Z. S., & Ni, H. (2012). Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 90, 21-27. Retrieved Feb, from

Fernandez-Urrusuno, R., Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1999). Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 16(10), 1576-1581. Retrieved Oct, from

Ferrada, María José (2001). Competitividad de la frutilla chilena. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). <http://www.odepa.cl/articulo/competitividad-de-la-frutilla-chilena-2>

Ferrada, María José (2002). El sector berries en Chile. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). <http://www.odepa.cl/articulo/el-sector-berries-en-chile-2>

Ferreira, C. O., Nunes, C. A., & Delgadillo, I. L.-d.-S., J.A. (2009). Characterization of chitosan–whey protein films at acid pH. *Food Research International*, 42(7), 807–813.

Gamboa, A., Araujo, V., Caro, N., Gotteland, M., Abugoch, L., & Tapia, C. (2015). Spray Freeze-Drying as an Alternative to the Ionic Gelation Method to Produce Chitosan and Alginate Nano-Particles Targeted to the Colon *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, 104, 4373–4385.

Gokce, Y., Cengiz, B., Yildiz, N., Calimli, A., & Aktas, Z. (2014). Ultrasonication of chitosan nanoparticle suspension: Influence on particle size. *Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects*, 462, 75-81. Retrieved Nov 20, from

Goycoolea, F. M., Remuñán-López, C., & Alonso, M. J. (2009). Nanopartículas en base a polisacáridos: Quitosano. Vol. XVIII. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia: Monografía XVIII: Nanotecnología Farmacéutica:(Real Academia Nacional de Farmacia).

Ghosh V, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity. *Ultrason Sonochem.* 2013 Jan;20(1):338-44

Guerreiro, A. C., Gago, C. M. L., Faleiro, M. L., Miguel, M. G. C., & Antunes, M. D. C. (2015). The use of polysaccharide-based edible coatings enriched with essential oils to improve shelf-life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 110, 51-60. Retrieved Dec, from

Guo, P., Hsu, T. M., Zhao, Y., Martin, C. R., & Zare, R. N. (2012). Preparing amorphous hydrophobic drug nanoparticles by nanoporous membrane extrusion. *Nanomedicine*, 12(119).

Hammer, K. A., Carson, C. F., & Riley, T. V. (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6), 985-990. Retrieved Jun, from

Han, C., Zhao, Y., Leonard, S. W., & Traber, M. G. (2004). Edible coatings to improve storability and enhance nutritional value of fresh and frozen strawberries (*Fragaria x ananassa*) and raspberries (*Rubus ideaus*). *Postharvest Biology and Technology*, 33(1), 67-78. Retrieved Jul, from

Hernandez-Munoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D., & Gavara, R. (2008). Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 110(2), 428-435. Retrieved Sep 15, from

Hoang, V. V. (2010). *Handbook of Nanophysics: Nanoparticles and Quantum Dots*: CRC Press.

Holley, R. A., & Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*, 22(4), 273-292. Retrieved Aug, from

Hosseini, S. F., Zandi, M., Rezaei, M., & Farahmandghavi, F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and *in vitro* release study. *Carbohydrate Polymers*, 95(1), 50-56. Retrieved May, from

Hosseinzadeh, H., Atyabi, F., Dinarvand, R., & Ostad, S. N. (2012). Chitosan-Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and *in vitro* study. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 1851-1863. Retrieved 2012, from

Hu, J. (2003). A nanoparticle engineering process: spray-freezing into liquid to enhance the dissolution of poorly water soluble drugs. The University of Texas at Austin.

Hu, J. H., Johnston, K. P., & Williams, R. O. (2003). Spray freezing into liquid (SFL) particle engineering technology to enhance dissolution of poorly water soluble drugs:

organic solvent versus organic/aqueous co-solvent systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 20(3), 295-303. Retrieved Nov, from

Hung, L.-H., & Lee, A. P. (2007). Microfluidic Devices for the Synthesis of Nanoparticles and Biomaterials. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 27(1), 1-6.

Hyltdgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3. Retrieved 2012, from

Instrument, M. (2005). Zeta Potential: An Introduction in 30 Minutes In Technical note. Malvern:(Malvern Instrument).

Ito, T., Sun, L., Bevan, M. A., & Crooks, R. M. (2004). Comparison of nanoparticle size and electrophoretic mobility measurements using a carbon-nanotube-based coulter counter, dynamic light scattering, transmission electron microscopy, and phase analysis light scattering. *Langmuir*, 20(16), 6940-6945. Retrieved Aug, from

Jancurova, M., Minarovicova, L., & Dandar, A. (2009). Quinoa - a Review. *Czech Journal of Food Sciences*, 27(2), 71-79. Retrieved 2009, from

Ji, J., Hao, S., Liu, W., Wu, D., Wang, T., & Xu, Y. (2011). Preparation, characterization of hydrophilic and hydrophobic drug in combine loaded chitosan/cyclodextrin nanoparticles and *in vitro* release study. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 83(1), 103-107. Retrieved Mar 1, from

Jimenez, A., Jose Fabra, M., Talens, P., & Chiralt, A. (2012). Effect of re-crystallization on tensile, optical and water vapour barrier properties of corn starch films containing fatty acids. *Food Hydrocolloids*, 26(1), 302-310. Retrieved Jan, from

Kaloti, M., & Bohidar, H. B. (2010). Kinetics of coacervation transition versus nanoparticle formation in chitosan-sodium tripolyphosphate solutions. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 81(1), 165-173. Retrieved Nov 1, from

Keawchaon, L., & Yoksan, R. (2011). Preparation, characterization and *in vitro* release study of carvacrol-loaded chitosan nanoparticles. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 84(1), 163-171. Retrieved May, from

Kim, S., Fernandes, M. M., Matama, T., Loureiro, A., Gomes, A. C., & Cavaco-Paulo, A. (2013). Chitosan-lignosulfonates sono-chemically prepared nanoparticles: Characterisation and potential applications. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 103, 1-8. Retrieved Mar 1, from

Kjm, K. M., Son, J. H., Kim, S. K., Weller, C. L., & Hanna, M. A. (2006). Properties of chitosan films as a function of pH and solvent type. *Journal of Food Science*, 71(3), E119-E124. Retrieved Apr, from

Klaric, M. S., Kosalec, I., Mastelic, J., Pieckova, E., & Pepeljnak, S. (2007). Antifungal activity of thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oil and thymol against moulds from damp dwellings. *Letters in Applied Microbiology*, 44(1), 36-42. Retrieved Jan, from

Koebnik, R., Locher, K., & Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Molecular Microbiology*, 37(2), 239-253.

Kumar, M. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46(1), 1-27. Retrieved Nov, from

Kurek, M., Galus, S., & Debeaufort, F. (2014). Surface, mechanical and barrier properties of bio-based composite films based on chitosan and whey protein. *Food Packaging and Shelf Life*, 1(1), 56-67.

Liu, D., Li, H., Zhou, G., Yuan, M., & Qin, Y. (2015). Biodegradable poly(lactic-acid)/poly(trimethylene-carbonate)/laponite composite film: development and application to the packaging of mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Polymers For Advanced Technologies*.

Lárez V., C. (2003). Algunos usos del quitosano en sistemas acuosos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 4(2).

Maftoonazad, N., & Ramaswamy, H. S. (2005). Postharvest shelf-life extension of avocados using methyl cellulose-based coating. *Lwt-Food Science and Technology*, 38(6), 617-624. Retrieved 2005, from

Mamani Chambi H, Ferreira Grosso C (2011) Mechanical and water vapor permeability properties of biodegradables films based on methylcellulose, glucomannan, pectin and gelatin. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos* 31 (3):739-746

Marei, G. I. K., Rasoul, M. A. A., & Abdelgaleil, S. A. M. (2012). Comparative antifungal activities and biochemical effects of monoterpenes on plant pathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 103(1), 56-61. Retrieved May, from

Mitcham, E. J., Crisosto, C. H., & Kader, A. A. (2013). Bayas (Berries): Zarzamora (Mora), Arándano Azul, Arándano Rojo, Frambuesa: Recomendaciones para Mantener la Calidad Postcosecha. *Postharvest Technology*, University of California. Retrieved 13 de marzo, 2015, from http://postharvest.ucdavis.edu/frutasymelones/Bayas_Berries/

Mitchell, F., Mitcham, E., Thompson, J., & Welch, N. (1996). Handling strawberries for fresh Market In Special Publication 2442 (eds) California Agricultural Natural Resources. Oakland, USA 14.

Monedero, Maria, F., Jose Fabra, M., Talens, P., & Chiralt, A. (2009). Effect of oleic acid-beeswax mixtures on mechanical, optical and water barrier properties of soy protein isolate based films. *Journal of Food Engineering*, 91(4), 509-515. Retrieved Apr, from

Muller, R. H., Jacobs, C., & Kayser, O. (2001). Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy Rationale for development and what we can expect for the future. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47(1), 3-19. Retrieved Mar 23, from

Nadim, Z., Ahmadi, E., Sarikhani, H., & Chayjan, R. A. (2015). Effect of methylcellulose-based edible coating on strawberry fruit's quality maintenance during storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(1), 80-90. Retrieved Feb, from

Nanocomposix.com. (September 2012). Nanocomposix's guide to dynamic light scattering measurement and analysis. (15/11/2012 ed., vol. 1.3. Nanocomposix.com.

Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593-+. Retrieved Dec, from

Nobeta, H. (2014). "Elaboración y caracterización de nanopartículas de quitosano y quitosano/timol mediante pulverización-congelación en nitrógeno líquido (SFL) y su incorporación a películas de quitosano/proteínas de quínoa (*Chenopodium quinoa Willd*)". Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Begin, A., & Holley, R. A. (2000). Diffusion of acetic and propionic acids from chitosan-based antimicrobial packaging films. *Journal of Food Science*, 65(5), 768-773. Retrieved Jul-Aug, from

Panreac (2014). Timol: Ficha de Datos de Seguridad. Panreac.com. Retrieved 14 de marzo, 2015, from <http://pub.panreac.com/msds/ESP/1738.Htm>

Pefaur, J. (2014). El mercado de las frutillas. Oficina de estudios y políticas agrarias:(Ministerio de agricultura).

Pereda, M., Aranguren, M. I., & Marcovich, N. E. (2010). Caseinate films modified with tung oil. *Food Hydrocolloids*, 24(8), 800-808. Retrieved Nov-Dec, from

Peretto, G., Du, W.-X., Avena-Bustillos, R. J., Sarreal, S. B. L., Hua, S. S. T., Sambo, P., et al., (2014). Increasing strawberry shelf-life with carvacrol and methyl cinnamate antimicrobial vapors released from edible films. *Postharvest Biology and Technology*, 89, 11-18. Retrieved Mar, from

Pinzón, I., Fischer, G., & Corredor, G. (2007). Determinación de los estados de madurez del fruto de la gulupa (*Passiflora edulis Sims.*). *Agronomía Colombiana*, 25(1), 83-95.

Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate Research*, 339, 2693-2700.

- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465. Retrieved Nov-Dec, from
- Rampino, A., Borgogna, M., Blasi, P., Bellich, B., & Cesaro, A. (2013). Chitosan nanoparticles: Preparation, size evolution and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 455(1-2), 219-228. Retrieved Oct, from
- Ravi Kumar, M. N. V. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive & Functional Polymers*, 46, 1-27.
- Robinson, L. N. (2008). *Water Resources Research Progress*: Nova Science Pub Inc
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York.
- Sanchez, F., & Sobolev, K. (2010). Nanotechnology in concrete - A review. *Construction and Building Materials*, 24(11), 2060-2071. Retrieved Nov, from
- Santos, S., & Kirschbaum, D. (2012). Protocolo de calidad para frutillas frescas y congeladas Resolución N° 866/2012. Ministerio de agricultura, ganadería y pesca. Dirección Nacional de Transformación y Comercialización de Productos Agrícolas y Forestales de la Subsecretaría de Agricultura, República de Argentina.
- Savé, P. (2011). Elaboración de nanopartículas de quitosano e incorporación en películas quitosano-quínoa. In Tesis de Pregrado. Universidad de Chile:(Universidad de Chile).
- Sharma, R. R., Singh, D., & Singh, R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50(3), 205-221. Retrieved Sep, from
- Shi, A.-m., Wang, L.-j., Li, D., & Adhikari, B. (2013). Characterization of starch films containing starch nanoparticles Part 1: Physical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), 593-601. Retrieved Jul 25, from
- Sigma-Aldrich (2014). TIMOL: FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD. sigmaaldrich.com: Sigma-Aldrich. Retrieved 14 de marzo, 2015, from <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/t0501?lang=es@ion=CL>
- Srivastava, D. N., Perkas, N., Gedanken, A., & Felner, I. (2002). Sonochemical synthesis of mesoporous iron oxide and accounts of its magnetic and catalytic properties. *Journal of Physical Chemistry B*, 106(8), 1878-1883. Retrieved Feb 28, from
- Stannard, C. (1997). Development and use of microbiological criteria for foods. *Food Science and Technology Today*, 11(3).

Strand, S. P., Varum, K. M., & Ostgaard, K. (2003). Interactions between chitosans and bacterial suspensions: adsorption and flocculation. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 27(1), 71-81. Retrieved Jan, from

Tao, F., Hill, L. E., Peng, Y., & Comes, C. L. (2014). Synthesis and characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications. *Lwt-Food Science and Technology*, 59(1), 247-255. Retrieved Nov, from

Tripathi, P., & Dubey, N. K. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 32(3), 235-245. Retrieved Jun, from

Vakili, M., Rafatullah, M., Salamatinia, B., Abdullah, A. Z., Ibrahim, M. H., Tan, K. B., et al., (2014). Application of chitosan and its derivatives as adsorbents for dye removal from water and wastewater: A review. *Carbohydrate Polymers*, 113, 115-130. Retrieved Nov 26, from

Valenzuela, C., Abugoch, L., & Tapia, C. (2013). Quinoa protein-chitosan-sunflower oil edible film: Mechanical, barrier and structural properties. *Lwt-Food Science and Technology*, 50(2), 531-537. Retrieved Mar, from

Valenzuela, C., Tapia, C., Lopez, L., Bunge, A., Escalona, V., & Abugoch, L. (2015). Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(6), 406-411. Retrieved Nov, from

Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A., & Gonzalez-Martinez, C. (2009). Characterization of chitosan-oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536-547. Retrieved Mar, from

Vasconez, M. B., Flores, S. K., Campos, C. A., Alvarado, J., & Gerschenson, L. N. (2009). Antimicrobial activity and physical properties of chitosan-tapioca starch based edible films and coatings. *Food Research International*, 42(7), 762-769.

Villamán, M. (2007). Elaboración y caracterización de films comestibles basadas en mezclas entre proteínas de quinoa y quitosano. Universidad de Chile, Universidad de Chile.

Viroben, G., Barbot, J., Mouloungui, Z., & Gueguen, J. (2000). Preparation and characterization of films from pea protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1064-1069. Retrieved Apr, from

Vu, K. D., Hollingsworth, R. G., Leroux, E., Salmieri, S., & Lacroix, M. (2011). Development of edible bioactive coating based on modified chitosan for increasing the shelf life of strawberries. *Food Research International*, 44(1), 198-203. Retrieved Jan, from

Wattanasatcha, A., Rengpipat, S., & Wanichwecharungruang, S. (2012). Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent. *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1-2), 360-365. Retrieved Sep, from

Weiss, J., Cancelliere, C., & McClements, D. J. (2000). Mass transport phenomena in oil-in-water emulsions containing surfactant micelles: Ostwald ripening. *Langmuir*, 16(17), 6833-6838. Retrieved Aug, from

Wiles, J. L., Vergano, P. J., Barron, F. H., Bunn, J. M., & Testin, R. F. (2000). Water vapor transmission rates and sorption behavior of chitosan films. *Journal of Food Science*, 65(7), 1175-1179. Retrieved Oct, from

Wittig, E. (2001). *Evaluación Sensorial: Una metodología actual para tecnología de alimentos* (Edición Digital ed.): Biblioteca Digital de la Universidad de Chile.

Woranuch, S., & Yoksan, R. (2013). Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 96(2), 578-585. Retrieved Jul, from

Wu, Y., Guo, J., Yang, W., Wang, C., & Fu, S. (2006). Preparation and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) polymer magnetic microspheres. *Polymer*, 47(15), 5287-5294. Retrieved Jul 12, from

Yildirim, I., & Yapici, B. (2007). Inhibition of conidia germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by some alternative chemical. *Pakistan Journal of Biological Science*, 10(8), 1294-1300

Zhang, H., Oh, M., Allen, C., & Kumacheva, E. (2004). Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules*, 5(6), 2461-2468. Retrieved Nov-Dec.