



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química



Optimización de la obtención de nanopartículas de quitosano/timol y su incorporación en recubrimientos comestibles de proteínas de quínoa y quitosano, para su aplicación en frutillas frescas (*Fragaria x ananassa*) y aumentar su vida útil.

Director de Tesis: Lilian Elizabeth Abugoch James
Departamento de Ciencias de los Alimentos y
Tecnología Química
Universidad de Chile

Co-Director de Tesis: Cristián Tapia Villanueva
Departamento de Ciencias de los Alimentos y
Tecnología Química
Universidad de Chile

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO EN ALIMENTOS**

JUAN CARLOS DÍAZ GUZMÁN

**SANTIAGO – CHILE
2015**

Dedicatoria

A mis padres.

Agradecimientos

A mi profesora y directora de tesis Lilian Abugoch, por su gran disposición y confianza entregada a mi persona, al contar siempre con su apoyo tanto a nivel académico como personal, por tener siempre tiempo para responder mis consultas de la mejor manera posible y darme ánimo para seguir hacia adelante, muchas gracias por todo.

Al profesor y co-director de tesis Cristián Tapia, por su gran disposición para ayudar, corregir y dar nuevas ideas para encontrar soluciones a los problemas que se presentaban durante este trabajo y por tener siempre la disponibilidad de orientar en los ensayos que se estaban realizando. Muchas gracias.

A Estefanía Medina, Nelson Caro, Nancy Robledo y Juliette Naihual por compartir su tiempo, disposición y conocimiento que hicieron posible llevar a cabo esta memoria.

Al proyecto INNOVA CORFO: “Bioenvases a base de quínoa, quitosano con agentes activos nanoencapsulados para aumentar la vida útil de frutas de bajo pH”, código N° 12IDL2-13621, por el financiamiento de esta memoria.

Finalmente a mis padres y novia por su apoyo, paciencia y amor incondicional durante todo este proceso. Los amo.

Índice General

<u>Contenido</u>	<u>Páginas</u>
Dedicatoria	II
Agradecimientos	III
Índice general	IV - VII
Índice de tablas	VIII
Índice de figuras	IX - X
Índice de fórmulas y ecuaciones	XI
Abreviaciones y simbología	XII - XIII
Resumen	XIV
Summary	XV
1. Introducción	1 - 6
1.1.1 Películas comestibles	1 - 2
1.1.2 Quínoa (<i>Chenopodium quinoa</i> Willd)	2 - 3
1.1.3 Timol	3
1.1.4 Quitosano	3 - 4
1.1.5 Frutillas	4
1.1.6 Nanopartículas y películas comestibles elaboradas	5
1.2 Hipótesis	6
1.3 Objetivos	6
1.3.1 Objetivo General	6
1.3.2 Objetivos Específicos	6
2. Materiales y Métodos	7 - 21
2.1.1 Materia prima	7
2.1.2 Materiales	7
2.1.3 Equipos	8
2.2 Metodología	9
2.2.1 Preparación de soluciones de Quitosano/Terbutanol-Timol-Pluronic F-127-Trehalosa (Sol. QTTPT 1, 2 y 3%), Quitosano/Terbutanol-Timol-Pluronic F-127 (Sol. QTTP) y Quitosano/ác.acético-Timol-Terbutanol-Pluronic F127 (Sol.A1%QTTP)	9
2.2.2 Preparación de Sol. Q al 0,3% p/v	9
2.2.3 Preparación de Sol. QTTP o Sol. A1%QTTP	9 - 10
2.2.4 Preparación de Sol. con trehalosa QTTPT %	10
2.2.5 Fabricación nanopartículas mediante Spray Freezing in Liquid (SFL)	11

2.3 Caracterización y preparación de las muestras	12
2.3.1 Determinación de timol	12
2.3.2 Eficiencia de encapsulación (EE%) y capacidad de carga (CC%) de timol en las nanopartículas	12
2.3.3 Determinación de tamaño y potencial Z de nanopartículas	13
2.3.4 Determinación de humedad de las nanopartículas	13
2.3.5 Determinación de rendimiento en partícula (RP%)	13
2.3.6 Microscopía de transmisión electrónica (TEM) de nanopartículas	14
2.3.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas	14
2.3.8 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas	14
2.4 Preparación de mezcla filmógena en base a proteínas de quínoa/ quitosano con incorporación de nanopartículas	15
2.4.1 Preparación de concentrado proteico de quínoa	15
2.4.2 Preparación de películas de mezcla quitosano-proteína de quínoa cargadas con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)	15
2.4.3 Determinación del grado de transmisión de vapor de agua (TVA) y permeabilidad al vapor de agua (PVA)	16
2.4.4 Determinación de las propiedades mecánicas	17
2.5 Aplicación de recubrimientos comestibles a frutillas y evaluación de su vida útil	18
2.5.1 Aplicación del recubrimiento comestible en la fruta	18
2.5.2 Descripción del diagrama de bloques	19
2.5.3 Determinación de la formación de las películas sobre las frutillas y su espesor	20
2.5.4 Determinación de la vida útil de las frutillas recubiertas y control	20 - 21
2.6 Análisis estadístico	21
3. Resultados y discusión	22 - 55
3.1 Caracterización de las nanopartículas	22
3.1.1 Caracterización de nanopartículas producidas mediante método de SFL Quitosano/Terbutanol-Timol-Pluronic F-127-Trehalosa (nQTTP 1, 2 y 3%), Quitosano/Terbutanol-Timol-Pluronic F-127 (nQTTP) y Quitosano/ác.acético-Terbutanol-Timol-Pluronic F127 (nA1%QTTP)	22
3.1.1.1 Determinación de tamaño y potencial Z para diferentes formulaciones de nanopartículas	22 - 23
3.1.1.2 Determinación de capacidad de carga (CC%), eficiencia de encapsulación (EE%) de timol y rendimiento en partícula (RP%) para diferentes formulaciones de	23 - 25

nanopartículas	
3.1.1.3 Estabilidad de las nanopartículas en el tiempo	25 - 26
3.1.2 Aplicación de ultrasonido a nanopartículas producidas mediante método de SFL	26
3.1.2.1 Determinación de tamaño y potencial Z para diferentes formulaciones de nanopartículas	27 - 28
3.1.2.2 Determinación de capacidad de carga (CC%), eficiencia de encapsulación (EE%) y rendimiento en partícula (RP%) para diferentes formulaciones de nanopartículas y ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C y sonda de diámetro 12,7 mm = ULTRA)	28 - 29
3.1.2.3 Estabilidad de las nanopartículas tratadas con ultrasonido (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C) en el tiempo	29 - 30
3.1.2.4 Caracterización de nA1%QTTP+ULTRA mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM)	30 - 31
3.1.2.5 Caracterización de nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	31 - 32
3.1.2.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas	33 - 35
3.2 Caracterización de las Películas comestibles	36
3.2.1 Obtención y caracterización de películas de quitosano- proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas	36
3.2.2 Caracterización morfológica de películas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	36- 37
3.2.3 Determinación de PVA para películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas, acondicionadas a 23°C y 60 % H.R	38 - 39
3.2.4 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) para películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas, acondicionadas a 5°C y 95 % H.R	39 - 41
3.2.5 Determinación las propiedades mecánicas: de porcentaje de alargamiento (A%) y Esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) para películas de quitosano-proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas	41 - 42
3.3 Aplicación de películas comestibles a frutillas frescas y evaluación de su efectividad	43
3.3.1 Recubrimientos de quitosano sin nanopartículas y con nanopartículas al 5% (nA1%QTTP + ULTRA) en frutillas y evaluación de la vida útil de las frutillas durante el almacenamiento refrigerado	43
3.3.2 Formación de las películas sobre la superficie de las frutillas	43 - 44

3.3.3 Pérdida de peso en frutillas recubiertas durante el almacenamiento	44 - 45
3.3.4 Recuento de hongos y levaduras en frutillas recubiertas durante el almacenamiento	46 - 47
3.3.5 Decaimiento fúngico de las frutillas control y recubiertas durante el almacenamiento	48 - 49
3.3.6 Variación de la Firmeza de frutillas control y recubiertas durante el almacenamiento	50 - 51
3.3.7 Variación de pH, acidez titulable (AT), °Brix e índice de madurez (IM) de frutillas control y recubiertas durante el almacenamiento	51 - 52
3.3.8 Análisis sensorial	53
3.3.8.1 Test de Karlsruhe	53 - 54
3.3.8.2 Test de escala lineal no estructurada	55 - 56
4. Conclusiones	57 - 58
5. Bibliografías	59 - 63

Índice de tablas

	<u>Contenido</u>	<u>Páginas</u>
Tabla 1.	Composición por 100 mL de formulaciones de Sol.QTTP, Sol.QTTPT 1, 2 y 3% y Sol.A1%QTTP.	9
Tabla 2.	Condiciones experimentales de fabricación de nanopartículas por SFL.	11
Tabla 3.	Z Average, PDI y potencial Z para nanopartículas de quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127 (nQTTP); quitosano/ác.acético 1%-terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127 - trehalosa (nQTTPT 1, 2 y 3%).	23
Tabla 4.	Capacidad de carga (CC%), eficiencia de encapsulación (EE%) y rendimiento en partículas (RP%) para nanopartículas de quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127 (nQTTP); quitosano/ác.acético 1%- terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127 - trehalosa (nQTTPT 1, 2 y 3%).	25
Tabla 5.	Z Average, PDI y potencial Z para nanopartículas de quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127 (nQTTP+ULTRA); quitosano/ác.acético 1%- terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP + ULTRA) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127-trehalosa (nQTTPT1%+ULTRA), con la aplicación de ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C y sonda de diámetro 12,7 mm = ULTRA).	28
Tabla 6.	Capacidad de carga (CC%), eficiencia de encapsulación (EE%) y rendimiento en partículas (RP%) para nanopartículas de quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127 (nQTTP+ULTRA); quitosano/ác.acético 1%- terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP + ULTRA) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127 - trehalosa (nQTTPT1%+ULTRA). (ULTRA = amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C y sonda de diámetro 12,7 mm durante 30 min).	29
Tabla 7.	Estabilidad en el tiempo (días) para nanopartículas de quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127 (nQTTP+ULTRA); quitosano/ác.acético 1% -terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP+ULTRA) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127 -trehalosa (nQTTPT1%+ULTRA), con la aplicación de ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C).	30
Tabla 8.	pH, acidez titulable (AT), °Brix e índice de madurez (IM) del jugo obtenido de las frutillas control y recubiertas con películas 5°C y 95% H.R.	52
Tabla 9.	Grado de calidad asignado a cada muestra después de la evaluación sensorial en el día 0, 5 y 12 de almacenamiento de la fruta. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)).	54
Tabla 10.	Resumen de diferencias entre las tres muestras, para cada parámetro, mediante el Test de Tukey efectuado para las muestra. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)).	54

Índice de figuras

	<u>Contenido</u>	<u>Páginas</u>
Figura 1.	Esquema proceso de fabricación de nanopartículas mediante SFL.	11
Figura 2.	Diagrama de bloques proceso de inmersión.	18
Figura 3.	Variaciones del Z Average [nm] durante el tiempo de almacenamiento de las suspensiones de nanopartículas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	26
Figura 4.	Determinación del tamaño (nm) óptimo de la muestra en el tiempo (min).	26
Figura 5.	Microscopía de transmisión electrónica (TEM) para nanopartículas de quitosano/ác.acético 1%- terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP + ULTRA) por método SFL y ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C).	31
Figura 6.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) para nanopartículas de quitosano (nA1%Q) y nanopartículas de quitosano/ác.acético 1%-terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP), fabricadas por método SFL.	32
Figura 7.	Área de inhibición de crecimiento para diferentes bacterias frente a suspensiones de nA1%Q+ULTRA, nA1%QTTP+ULTRA (con la aplicación de ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C).) y controles (Sol. ác. acético 1%, Quitosano/Timol (Q/T) y Quitosano 0,3% p/v). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	35
Figura 8.	Comparación del Área de inhibición de crecimiento para diferentes bacterias frente a suspensiones de nA1%Q+ULTRA, nA1%QTTP+ULTRA, nQTP por método de SFL, nQ/T y nQ fabricadas por método de gelificación iónica (Medina, 2014). (ULTRA = amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C durante 30 min). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	35
Figura 9.	Microscopía electrónica de barrido (SEM) para películas de quitosano (QP) y cargadas con nanopartículas al 5% (nA1%QTTP+ULTRA). (ULTRA = amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C, durante 30 min).	37
Figura 10.	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP), cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones. Acondicionadas a 23°C y 60 % H.R. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	39
Figura 11.	Reducción de permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-concentrado proteico de quínoa cargadas con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA) al 1, 3 y 5%. Acondicionadas a 23°C y 60 % H.R. Donde la reducción se toma en base a QP como 100 %.	39
Figura 12.	Permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP), cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones. Acondicionadas a 5°C y 95 % H.R. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	40
Figura 13.	Reducción de permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP) cargadas con	41

	nanopartículas. Acondicionadas a 5°C y 95 % H.R. Donde la reducción se toma en base QP como 100 %.	
Figura 14.	Porcentaje de alargamiento (A%) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP), cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones. Acondicionadas a 23°C-60 % H.R. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	42
Figura 15.	Esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP), cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones. Acondicionadas a 23°C-60 % H.R. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	42
Figura 16.	Formación de películas de quitosano sin nanopartículas y con nanopartículas al 5% (nA1%QTTP+ULTRA) en la superficie de las frutillas recubiertas a los días 0 (a-c) y 16 (d-f) de almacenamiento. Observadas en microscopio óptico.	44
Figura 17.	% Pérdida de peso v/s Tiempo de almacenamiento (d) de la fruta almacenadas a 5°C y 95% H.R. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras (a-b) y en el tiempo de almacenamiento (w-z).	45
Figura 18.	Recuento total de hongos y levaduras de frutillas control y recubiertas con películas a 5°C y 95% H.R. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP)). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras (a-b) y en el tiempo de almacenamiento (x-y).	47
Figura 19.	Esquema de la apariencia de frutillas control y recubiertas con películas en función del tiempo de almacenamiento a 5°C y 95% H.R. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)).	49
Figura 20.	Firmeza (N) v/s tiempo de almacenamiento a 5°C y 95% H.R. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras (a-b) y en el tiempo de almacenamiento (x-z).	51
Figura 21.	Gráficos representativos de los resultados obtenidos. De los días 0 (A), 5 (B) y 12 (C) de almacenamiento. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)). (*)Indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	56

Índice de fórmulas y ecuaciones

	<u>Contenido</u>	<u>Páginas</u>
Ecuación 1.	Capacidad de carga de timol (CC%).	12
Ecuación 2.	Eficiencia de encapsulación (EE%).	12
Ecuación 3.	Rendimiento en partícula pre filtración (RP%).	13
Ecuación 4.	Transmisión de vapor de agua (TVA).	16
Ecuación 5.	Grado de transmisión de vapor de agua (TVA ϵ).	16
Ecuación 6.	Permeabilidad al vapor de agua (PVA).	16
Ecuación 7.	Alargamiento porcentual (A%).	17
Ecuación 8.	Esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR).	17
Ecuación 9.	Área transversal inicial del film (A_R).	17

Abreviaciones y simbología

μL	Microlitro.
μm	Micrómetro.
°C	Grados centígrados.
ANOVA	Análisis de varianza.
A%	Alargamiento Porcentual.
A_R	Área transversal inicial del film.
ASTM	American Society for Testing and Materials.
CC%	Capacidad de carga.
cm	Centímetros.
CIM	Concentración mínima inhibitoria.
d	Día.
DLS	Difracción de luz dinámica.
EAP	Concentrado proteico de quínoa.
EE%	Eficiencia de encapsulación.
ETR	Esfuerzo de tracción a la ruptura.
g	Gramo.
h	Horas.
H.R.	Humedad Relativa.
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia.
IM	Índice de Madurez.
kDa	Kilo daltons.
Kg	Kilogramo.
LMW	Peso molecular bajo.
M	Molar.
mg	Miligramos.
min	Minutos.
mL	Mililitros.
mm	Milímetros.
MMW	Peso molecular medio.
mV	Milivolt.
N	Newton.
N₂ L	Nitrógeno líquido.
nm	Nanómetros.
nA1%Q	Nanopartículas de Q uitosano/ác. A cético 1%.
nQ	Nanopartículas de Q uitosano.
nQTT	Nanopartículas de Q uitosano/ T erbutanol y T imol (0,5mg/ mL).
nQTTP	Nanopartículas de Q uitosano/ T erbutanol, T imol (0,5mg/ mL) y P luronic F-127 (0,5mg/ mL).
nQTTP T%	Nanopartículas Q uitosano/ T erbutanol, T imol (0,5mg/ mL), P luronic F-127 (0,5mg/ mL) y T rehalosa 1, 2 o 3%.

nQTTP+ULTRA	Nanopartículas Q uitosano/ T erbutanol, T imol (0,5mg/ mL) y P luronic F-127 (0,5mg/ mL), más ultrasonido 30 min (+ULTRA =amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C).
nA1%QTTP	Nanopartículas de Q uitosano/ác. A cético 1%, T erbutanol, T imol (0,5mg/ mL) y P luronic F127 (0,5mg/ mL).
PM	Peso molecular.
%PP	Porcentaje Pérdida de peso.
PVA	Permeabilidad al vapor de agua.
torr	Torricelli.
PDI	Índice de polidispersidad.
ppm	Partes por millón.
%p/v	Porcentaje peso-volumen.
Q	Quitosano.
Q/T	Quitosano y Timol.
RP%	Rendimiento en partícula.
rpm	Revoluciones por minuto.
s	Segundo.
SEM	Microscopía electrónica de barrido.
SFL	Técnica spray freezing in liquid o pulverización-congelación en nitrógeno líquido.
Sol. Q	Solución de quitosano a 3mg/mL, con solvente ácido cítrico 0,1M.
Sol. AX%Q	Solución de quitosano a 3mg/mL, con solvente ácido Acético X%.
Sol. QTTP	Mezcla cosolvente (90:10) de solución de Sol. Q y T erbutanol, cargada con 0,5 mg/ mL de T imol y 0,5 mg/ mL de P luronic F-127.
Sol. AX%QTTP	Mezcla cosolvente (90:10) de solución de Sol. AX%Q y T erbutanol, cargada con 0,5 mg/ mL de T imol y 0,5 mg/ mL de P luronic F-127.
Sol. QTTP T%	Mezcla cosolvente (90:10) de solución de Sol. Q y T erbutanol, cargada con 0,5 mg/ mL de T imol, 0,5 mg/ mL de P luronic F-127 y T rehalosa 1, 2 o 3%.
T°	Temperatura.
TEM	Microscopía de transmisión electrónica.
TVA	Transmisión de vapor de agua.
TVAε	Grado de transmisión de vapor de agua corregido por espesor de film.
%v/v	Porcentaje volumen-volumen.
UFC	Unidad formadora de colonia.
UV	Ultravioleta.

Resumen

El creciente interés de consumidores y productores por alimentos de alta calidad, y de mayor vida útil, ha impulsado el desarrollo de películas comestibles formadas a partir de componentes biodegradables. Generalmente se utilizan biopolímeros como polisacáridos y proteínas, ya sea solos o en mezcla, con plastificantes, agentes hidrofóbicos y antimicrobianos. En el presente trabajo se optimizó la obtención de nanopartículas de quitosano/ác. acético-timol-pluronic F-127 (nA1%QTTP) y posteriormente se incorporó a películas de quitosano-proteína de quínoa, fabricadas mediante la técnica de pulverización-congelación en nitrógeno líquido (SFL) con el objetivo de optimizar y elaborar recubrimientos comestibles en base a proteínas de quínoa y quitosano cargadas con antimicrobianos naturales nanoparticulados y evaluar su aplicación sobre frutillas como método para aumentar su vida útil.

En primer lugar, se optimizó el sistema SFL para la producción de nanopartículas y se caracterizaron por tamaño, potencial Z, índice de polidispersidad (PDI), carga de timol, morfología y estudios microbiológicos. Los mejores valores de capacidad de carga (CC%), eficiencia de encapsulación (EE%) y tamaño (nm) fueron de $6,7 \pm 0,01$, $91,2 \pm 0,17$ y $286 \pm 1,2$, respectivamente. Y se obtuvieron cuando se incorporó ácido acético como solvente para el quitosano (LMW) y se utilizó ultrasonido 30 min. Por lo que se eligió dicha formulación (nA1%QTTP+ULTRA) para la incorporación en películas.

La morfología de las nanopartículas fue determinada por SEM y presentaron una estructura amorfa, rugosa, fracturada y altamente porosa; típica de las nanopartículas producidas mediante el método SFL. Para determinar el efecto microbiológico de las nanopartículas se midió el área de inhibición de crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* y *Salmonella Tiphymurium* ATCC 14028. Los cuales mostraron mayor efecto antimicrobiano para las nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA) que los controles. La permeabilidad al vapor de agua (PVA) de las películas se evaluaron mediante el método de la copa húmeda en condiciones de 23°C y 60 %H.R, y 5°C y 95 %H.R.

Las películas se caracterizaron según sus propiedades físicas, químicas, mecánicas, de barrera, y estructurales, y fueron aplicadas en frutillas para evaluar su efecto en aumentar su vida útil poscosecha determinando: recuento de hongos y levaduras, pérdida de peso, firmeza, pH, acidez titulable, °Brix, índice de madurez, y evaluación sensorial. Las frutillas recubiertas con la película cargada con nanopartículas en comparación a los controles presentaron un menor recuento y crecimiento de hongos y levaduras, aumentando la vida útil de 8 días (frutillas control) a 12 días (frutillas recubiertas con nanopartículas). Además, el recubrimiento cargado con nanopartículas mantuvo la calidad de las frutillas, y no fue detectado por los jueces en el análisis sensorial.

Summary

Obtaining optimization nanoparticles chitosan/thymol and incorporation into edible coatings protein quinoa and chitosan, for use in fresh strawberries (*Fragaria x ananassa*) and increase their shelf life.

The growing interest of consumers and producers of high quality food, and longer life, has driven the development of edible films formed from biodegradable components. Biopolymers are generally used as polysaccharides and proteins, either alone or in admixture with plasticizers, hydrophobic and antimicrobial agents. In the present work production nanoparticles of chitosan/acetic acid–thymol–pluronic F-127 (nA1%QTTP) was optimized and later incorporated into chitosan-quinoa protein films, produced by the technique spray freezing in liquid nitrogen (SFL) in order to optimize and develop edible coatings based joined protein quinoa and chitosan nanoparticle loaded with natural antimicrobials and evaluate its implementation on strawberries as a method to increase their shelf life. First, the SFL system was optimized for the production of nanoparticles and were characterized by size, Z potential, polydispersity index (PDI), thymol charge, morphology and microbiology assays. The best load charge (CC%), encapsulation efficiency (EE%) and size (nm) where $6,7\pm 0,01$, $91,2\pm 0,17$ and $286\pm 1,2$, respectively. And they were obtained when acetic acid was incorporated as a solvent for chitosan (LMW) and used ultrasound 30 minutes. As such formulation (nA1% QTTP+ULTRA) for incorporation into films was chosen.

The morphology of the nanoparticles was determined by SEM and presented an amorphous, rough, highly fractured and porous structure; typical of the nanoparticles produced by the SFL method. In order to determine the microbiology effect of nanoparticles, the growth inhibition areas of *Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua* and *Salmonella Tiphymurium* ATCC 14028 were measured. Which showed higher antimicrobial effect for nanoparticles (nA1%QTTP+ULTRA) than controls. The water vapor permeability (PVA) of the films was evaluated by the wet cup method at condition of 23°C and 60 % RH, and 5°C and 95 % RH.

The films were characterized by physical, chemical, mechanical, barrier and structural properties, and were applied to strawberries to evaluate its effect on increasing life postharvest determining: antimicrobial capacities against moulds, fungal decay, weight loss, firmness, pH, titratable acidity, °Brix, maturity index and sensory evaluation. All strawberries coated compared to the control showed a lower fungal decay, so the edible films increased the shelf life of strawberries of 8 days (control), to 12 days (strawberries coated with nanoparticles). Furthermore, the coating nanoparticles loaded with quality maintained strawberries, and was not detected by the judges in sensory analysis.

1. Introducción

Actualmente la gran demanda por productos alimenticios de mejor calidad, inocuos y con mayor vida útil, es lo que motiva a la industria y a las nuevas investigaciones en el desarrollo de nuevas técnicas. Siendo una de las aristas más importantes para lograr este objetivo la utilización de diferentes películas comestibles a base de materiales biodegradables, tales como proteínas, lípidos y polisacáridos (Olivas y Barbosa-Canovas, 2008; Bourtoom, 2008).

La fabricación de nanopartículas de origen orgánico se ha llevado a cabo principalmente a partir de los métodos de dispersión de polímeros preformados, polimerización de monómeros, y la gelificación iónica (Hu et al, 2003). Sin embargo, actualmente se han presentado nuevas técnicas como el método de pulverización-congelación en nitrógeno líquido, técnica conocida en general por las siglas SFL (SFL; Spray Freezing in Liquids). Entre las ventajas de los productos obtenidos a partir del método SFL destacan la intensa atomización y las altas velocidades de congelación, lo que permite encapsular productos altamente sensibles a la temperatura como proteínas y péptidos sin perder actividad biológica (Hu et al, 2003).

1.1.1 Películas comestibles

Estas películas comestibles se pueden definir como una delgada capa de material que puede ser consumida y que proporciona una barrera a la humedad, al oxígeno, al movimiento de aromas y solutos desde el alimento (Bourtoom, 2008). Los recubrimientos comestibles presentan la ventaja de poder aplicarse a una gran variedad de alimentos, entre ellos frutas, inclusive aquellas que se consumen con piel, mejorando algunas de sus propiedades, y proporcionando protección individual (Min y Krochta, 2007; Lin y Zhao, 2007).

Las películas de proteínas se caracterizan por tener excelentes propiedades de barrera ante el oxígeno, dióxido de carbono y lípidos; especialmente a bajas humedades relativas (Peyron, 1991). Sin embargo, en cuanto a sus propiedades mecánicas, son frágiles y susceptibles a la ruptura debido a la fuerte energía de cohesión del polímero (Lacroix y Dang Vu, 2014). Gracias al uso de plastificantes las películas basadas en proteínas presentan una mayor elongación que las de polisacáridos (Krochta, 2002). Mientras que las películas

basadas en polisacáridos tienen la capacidad de formarse por sí solas debido a la linealidad que presentan sus cadenas poliméricas, lo que facilita la interacción de los grupos funcionales con el solvente (Debeaufort et al., 1998). Estas son derivados de celulosa, alginatos, quitosano, carragenina, pectinas, almidones, gomas, mucílagos y mezclas entre éstos componentes y otro biopolímeros (Valenzuela et al., 2013). En relación a sus propiedades funcionales, éstas presentan un valor medio a alto de esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR), es decir, son firmes, pero su elasticidad es baja, motivo por el cual se han utilizado plastificantes para su formulación (Arvanitoyannis y Gorris, 1999; Falguera et al., 2011). La permeabilidad al vapor de agua (PVA) es deficiente (mayor), debido a sus características hidrofílicas en la mayoría de los polisacáridos (García et al., 1998).

Y entre las películas compuestas de lípidos se cuenta con ceras naturales (cera de abeja, candelilla y carnauba), ácidos grasos, monoglicéridos insaturados y saturados, diacilglicéridos, triglicéridos y diversos aceites vegetales (de girasol, maíz y soya) (Morillón et al., 2002). Por su naturaleza hidrofóbica, ejercen una mayor barrera al vapor de agua en comparación con las películas basadas en polisacáridos, proteínas o sus mezclas (Jiménez et al., 2012). Por esta razón los agentes hidrofóbicos se tienden a utilizar en altas concentraciones, lo cual trae consigo algunas desventajas. Una de ella es el descenso brusco del esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR), lo que provoca, que estas se vuelvan quebradizas y porosas (Jiménez et al., 2012).

1.1.2 Quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd)

Se considera un pseudocereal de gran calidad nutricional debido principalmente al valor nutricional de las proteínas que lo componen, con un 16,3 % de proteínas en base seca (Ranhotra et al., 1993). Las fracciones proteicas de la quínoa son principalmente albúminas y globulinas del tipo de globulina 11S denominada “chenopodina” y constituyen cerca del 37 % (Brinegar y Goundan, 1993). En cuanto a las albúminas, éstas corresponden al tipo 2S y representan el 35% del total de las proteínas en la quínoa (Abugoch, 2009). Respecto a sus propiedades fisicoquímicas, poseen un punto isoeléctrico entre pH 3 y 4. Mientras que en la harina de quínoa estaría cercano

a pH 6 (Oshodi et al., 1999). Por otro lado, se cuenta que su mayor solubilidad se encontraría en la zona alcalina entre pH 10 a 11.

1.1.3 Timol

El timol (2-isopropil-5-metilfenol) es uno de los agentes microbianos más activos de los constituyentes de los aceites esenciales. Se encuentra presente en el aceite esencial del tomillo (arriba del 50%), en el aceite esencial de orégano y otras fuentes naturales, poseyendo el status de GRAS, por lo que no se considera nocivo para la salud (Davidson y Branen, 1993). Una de las cualidades más importantes del timol es su propiedad antimicrobiana que dependiendo de las concentraciones utilizadas puede causar inhibición o inactivación de los microorganismos, ya que posee un amplio espectro frente a bacterias, hongos y levaduras, poseyendo como blanco la pared y membrana celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y sistema genético (Davidson y Branen, 1993). Se reporta un CIM para *S. aureus*, *Listeria innocua*, *Escherichi coli* y *Aspergillus niger* de 250 ppm y para el caso de *Saccharomyces cereviciae* de 125 ppm (Guarda et al., 2011). Por lo que es de suma importancia lograr su encapsulación en las nanopartículas.

1.1.4 Quitosano

El quitosano es un polisacárido lineal compuesto de grupos glucosaminas y N-acetil glucosaminas unidos por enlaces glucosídicos β (1-4) (Kim et al., 2008). Es insoluble en agua, en ácidos concentrados, bases y los solventes orgánicos comunes. Pero es soluble en ácidos minerales y orgánicos diluidos, dado que, la protonación del grupo amino acelera su disolución en los medios antes citados (Chenite et al., 2000). La capacidad antimicrobiana del quitosano varía considerablemente con el tipo de quitosano, grado de desacetilación, peso molecular, microorganismo objetivo y las condiciones del medio como el pH o la fuerza iónica (Aider, 2010). En términos generales se reconoce que los hongos y levaduras son el grupo más sensible al quitosano, seguido de las bacterias gram positivas y luego de las gram negativas (Aider, 2010). El quitosano posee excelentes propiedades formadoras de film debido a la interacción mediante puentes hidrogeno intra e intermoleculares entre los grupos catiónicos del polímero y el solvente usado (Muzzarelli, 1977). Las películas a base de quitosano se caracterizan por tener buenas propiedades

mecánicas, baja flexibilidad y alta resistencia a la ruptura. Si bien presentan una buena barrera al oxígeno, la permeabilidad al vapor de agua es moderada o alta, debido a su naturaleza hidrofílica (Phan et al., 2009).

1.1.5 Frutillas

Chile tiene las condiciones ideales de suelo y clima para la producción de berries. Esta ventaja comparativa le permite que mantenga o incluso aumente su participación en el mercado mundial de la frutilla. La demanda por frutillas en el mundo va en aumento, no sólo por su sabor, sino también por los beneficios que aporta a la salud. Mercados como Europa y Estados Unidos registran un alto consumo, y es allí también donde se produce más frutilla a nivel mundial (Odepa, 2014).

Países de Europa presentan un consumo medio de frutillas cercano a 1,6 kg per cápita al año, según datos del Economic Research Council (Odepa, 2014). En Estados Unidos el consumo es mayor, llegando a 3,6 kg al año 2012. En mercados emergentes para la industria de los berries (México, Brasil, China, Corea del Sur y Japón), el consumo medio baja a 2,6 gramos (Odepa, 2014).

En el año 2013 se produjeron en Chile 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) (Odepa, 2014).

En Chile la frutilla se produce principalmente en las regiones Metropolitana y del Maule. Según estimaciones del INE, estas regiones concentran casi 80% de la superficie nacional (Odepa, 2014).

La frutilla se encuentra dentro del grupo denominado como frutos no climatéricos, debido a que la maduración se inicia y progresa sin que se produzca un alza en la producción de etileno (C_2H_4) (Giovannoni, 2001), por tanto, se considera que el C_2H_4 no es una de las hormonas fundamentales desde el punto de vista de la regulación del proceso de maduración. Se han aplicado recubrimientos comestibles en frutillas, elaborados a partir de componentes poliméricos naturales (Hernández-Muñoz et al., 2008); capaces de aumentar su vida poscosecha, debido a que actúan modificando la atmósfera interna de las frutas, bloqueando parcialmente los poros, reduciendo la difusión de gases por la respiración.

1.1.6 Nanopartículas y películas comestibles elaboradas

Nanopartículas: Elaboradas de quitosano/ác.acético-timol-pluronic F-127 (0,5mg/ mL). El quitosano de PM bajo y timol cumplen un rol muy importante en la capacidad antimicrobiana de las nanopartículas, siendo vital la cantidad que se logra encapsular de timol quien es el que presenta mayor efecto inhibitorio sobre los microorganismos. Por lo que se utilizan los parámetros de capacidad de carga (CC%) y eficiencia de encapsulación (EE%) de timol para medirlo. También es importante el tamaño de partícula ya que si es muy grande o pequeño no presenta buenos resultados en análisis microbiológicos, ni en su incorporación posteriormente en películas, por lo que un tamaño adecuado es entre 200 - 300 nm. Para lograr esto se utilizó ultrasonido y un crioprotector (trehalosa) que evita la aglomeración de las partículas durante el proceso de secado, actuado como sustituto del agua. Además se estudió la estabilidad de las nanopartículas durante el tiempo de almacenamiento medido en días mediante el método de DLS.

Películas comestibles: Fueron elaboradas de concentrado proteico de quínoa y quitosano de PM medio en relación 1:1, ya que de esta manera la película presenta propiedades mecánicas combinadas en cuanto a la búsqueda de una menor permeabilidad al vapor de agua (PVA). Y un porcentaje de alargamiento (A%) y esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) similar al de la fruta fresca. Además, con la incorporación de nanopartículas se busca mejorar estos parámetros y potenciar su capacidad antimicrobiana.

Aplicación en frutillas: Las películas comestibles se aplican en la fruta con el fin de aumentar su vida útil durante el tiempo de almacenamiento (días), para esto se realizaron análisis fisicoquímicos, microbiológicos, propiedades mecánicas y evaluaciones sensoriales.

1.2 Hipótesis

Es posible aumentar la carga de timol en nanopartículas de quitosano-timol a través de la técnica de congelación-pulverización en N₂ líquido, de manera de que sean incluidos en recubrimientos comestibles de proteínas de quínoa y quitosano, con el doble propósito de hacer barrera al vapor de agua y que tenga una acción eficaz antimicrobiana; de manera que al ser aplicada en frutillas frescas se pueda aumentar su vida útil poscosecha.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

- Aumentar la carga de timol en nanopartículas de quitosano para ser incluidas en recubrimientos comestibles en base a proteínas de quínoa y quitosano y evaluar su efectividad recubriendo frutillas frescas para aumentar su vida útil poscosecha.

1.3.2 Objetivos Específicos

- Fabricación y optimización de nanopartículas de quitosano y quitosano/timol mediante pulverización-congelación en N₂ (SFL), utilizando un agente crioprotector y ultrasonido.
- Caracterización física y morfológica de las nanopartículas de quitosano y quitosano/timol y determinación de su actividad antimicrobiana.
- Elaboración de películas de mezcla quitosano-proteína de quínoa cargadas con nanopartículas.
- Aplicación de los recubrimientos en frutillas por medio de la inmersión de la fruta, para evaluar su vida útil.

2. Materiales y Métodos

2.1.1 Materia prima

- **Quínoa (*Chenopodium quinoa* Willd):** Harina de semillas de quínoa orgánica (*Chenopodium quínoa* Willd.), adquirida de Cooperativa Las Nieves, VI Región, Chile.
- **Frutillas (*Fragaria x ananassa* Duch.):** Se adquirieron frutillas frescas de Hortifrut Comercial S.A. Santiago, Chile. Cosechadas en el mes de Diciembre 2014, con máximo de 2 días después de cosechadas.

2.1.2 Materiales

- Quitosano de peso molecular bajo (LMW), SIGMA-ALDRICH (USA), código C-3646, cuya fuente es caparazón de cangrejo con un grado de desacetilación de 78,3 % y un peso molecular viscosimétrico de 269 kDa.
- Quitosano de peso molecular medio (MMW), SIGMA-ALDRICH (USA) 448877-250G, con un grado de desacetilación de 75-85 % y un peso molecular viscosimétrico de 854 kDa.
- Pluronic F-127, SIGMA-ALDRICH, P2443.
- Timol, SIGMA-ALDRICH, T0501.
- Terbutanol, MERK, Index-No: 605-005-00-1.
- Nitrógeno líquido provisto por la empresa Clean Ice S.A.
- Trehalosa MERK, Index-No: 202-739-6.

2.1.3 Equipos

- Cámara LabTech, modelo LHT-0150E.
- Agitador magnético: Hot plate Stirrer LABTECH, Model LMS-1003.
- Agitador de paleta Bosch MSM6A3R Mixxo Cordless.
- Balanza analítica (Radwag, modelo WTB 3000).
- Termo balanza (Boeco, XX470047).
- Centrífuga Hermle modelo Z32K.

- Bomba HPLC (Waters, modelo 510), conectada a una manguera boquilla PEEK (polieter eter cetona, IDEX).
- Estufa. Heraeus D-63450 Hnau, Alemania.
- Liofilizador: ILSHINBIOBASE, modelo FD5508.
- pH-metro: JENWAY 370.
- Shaker Polyscience Dual Action, 042901.
- Ultrasonido Q700 (20 kHz; 700 W; QSonica, Estados Unidos).
- Zetasizer: Modelo NanoS4700, Malvern Instruments.

2.2 Metodología

2.2.1 Preparación de soluciones de Quitosano/Terbutanol-Timol-Pluronic F-127-Trehalosa (Sol. QTTPT 1, 2 y 3%), Quitosano/Terbutanol-Timol-Pluronic F-127 (Sol. QTTP) y Quitosano/ác.acético-Timol-Terbutanol-Pluronic F127 (Sol.A1%QTTP)

La composición de las formulaciones se describe en la **Tabla 1**.

Tabla 1.- Composición por 100 mL de formulaciones de Sol.QTTP, Sol.QTTPT 1, 2 y 3% y Sol.A1%QTTP.

Componentes por 100 mL de solución	Sol. QTTP	Sol. QTTPT 1%	Sol. QTTPT 2%	Sol. QTTPT 3%	Sol. A1%QTTP
Ácido cítrico (g)	1,73	1,73	1,73	1,73	0
Ácido acético (g)	0	0	0	0	0,945
Quitosano peso molecular bajo (g)	0,27	0,27	0,27	0,27	0,27
Timol (mg)	50	50	50	50	50
Pluronic F-127 (mg)	50	50	50	50	50
Terbutanol (mL)	10	10	10	10	10
Trehalosa (g)	0	1	2	3	0
Agua (mL)	90	90	90	90	90

2.2.2 Preparación de Sol. Q al 0,3% p/v

Se preparó 1 L de una solución de ácido cítrico 0,1 M (Sol. Q al 0,3% p/v) o una de ácido acético al 1% (A1%Q al 0,3% p/v). Posteriormente, se obtuvo una solución de quitosano de bajo PM de 3 mg/mL. Se dejó con agitación magnética 16 horas a temperatura ambiente.

2.2.3 Preparación de Sol. QTTP o Sol. A1%QTTP

Para la preparación de 100 mL de solución de co-solvente quitosano/terbutanol cargado con timol y pluronic F-127 a concentración de 0,5 mg/mL (Sol. QTTP o Sol. A1%QTTP), en primer lugar se añadió 50 mg de pluronic F-127 a 90 mL de la solución de quitosano 0,3% p/v (2.2.2). 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 terbutanol. Para llevarla a concentración final mediante la mezcla con la solución de quitosano y pluronic preparada (relación en volumen de 90/10, sol quitosano/terbutanol), a temperatura ambiente y por un periodo de 30 minutos usando agitación magnética.

2.2.4 Preparación de Sol. con trehalosa QTTPT %

Para la preparación de 100 mL de solución de co-solvente quitosano/terbutanol cargado con timol y pluronic F-127, a concentración de 0,5 mg/mL, más trehalosa al 1, 2 o 3% (Sol. QTTPT 1, 2 y 3%), en primer lugar se añadió 50 mg de pluronic F-127 a 90 mL de la solución de quitosano 0,3% p/v (2.2.2), más la cantidad de trehalosa correspondiente al 1, 2 o 3%. 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 terbutanol. Para llevarla a concentración final mediante la mezcla con la solución de quitosano, trehalosa y pluronic preparada (relación en volumen de 90/10, solución quitosano/terbutanol), a temperatura ambiente y por un periodo de 30 minutos usando agitación magnética.

2.2.5 Fabricación nanopartículas mediante Spray Freezing in Liquid (SFL)

La metodología fue adaptada y modificada desde los trabajos reportados (Engstrom et al., 2007; Gamboa, 2011, Nobeta, 2014); se fabricaron las soluciones de trabajo (Sol. QTTP, A1%QTTP, QTTPT 1, 2 y 3%), para cada ensayo 50 mL de dichas soluciones se pulverizaron sobre nitrógeno líquido y posteriormente se liofilizaron bajo las condiciones descritas en la **Tabla 2**:

Tabla 2.- Condiciones experimentales de fabricación de nanopartículas por SFL.

Bomba	HPLC Waters© Modelo M510
Presión	3000 psi
Vel. flujo	7,0 mL/min.
Tubo	manguera-boquilla PEEK de un largo de 7 cm, ID 50 μ m
Líquido criogénico	Nitrógeno líquido (-195°C), 200 mL / muestra
Agitación	Magnética en el líquido criogénico; Vórtex 2-4 cm altura
Liofilización	6,7 Pa y -55°C / 48 hrs

Posteriormente el producto liofilizado obtenido se almacena en refrigeración a 4°C.

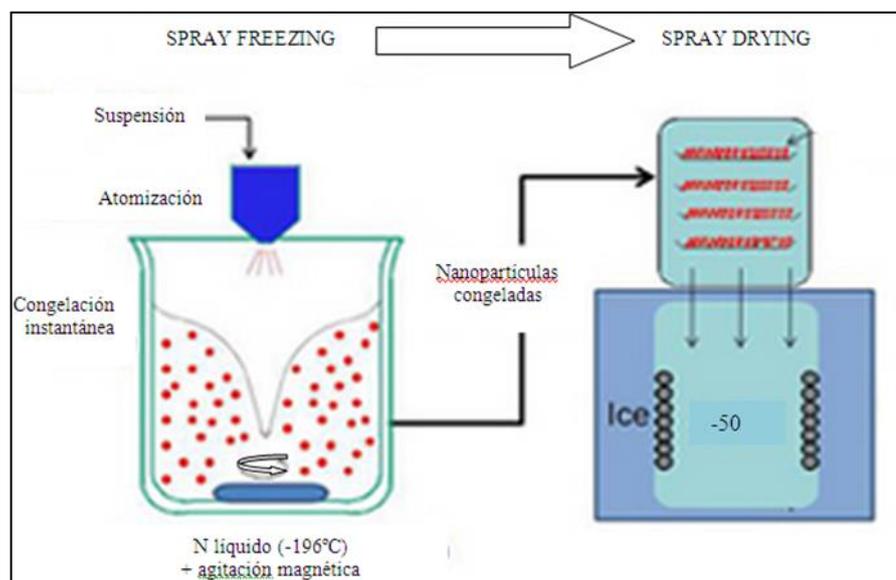


Fig.1.- Esquema proceso de fabricación de nanopartículas mediante SFL (Medina, 2014).

2.3 Caracterización y preparación de las muestras

Para la caracterización de las nanopartículas, estas fueron suspendidas en agua destilada a una concentración de 1 mg/mL. Se llevaron a agitación durante 30 minutos a una temperatura 25°C y 180 rpm. Luego fueron sometidas a ultrasonido 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).

2.3.1 Determinación de timol: El contenido de timol de las nanopartículas fue determinado mediante espectrofotometría UV a 273 nm. Para ello, primero se elaboró una curva de calibración de timol/agua de 0 a 150 ppm. Posteriormente, se preparó 30 mL de suspensiones de nanopartículas a una concentración de 1 mg/mL en agua destilada y se llevó a agitación magnética a temperatura ambiente durante 2 h. Luego, la solución se aforó a 50 mL, y se depositó en cubetas de cuarzo. Finalmente, se realizó por triplicado la medición espectrofotométrica (Espectrofotómetro Jenway 6715) a 273 nm (Keawchaoon y Yoksan, 2011; Wattanasatchaa et al., 2012).

2.3.2 Eficiencia de encapsulación (EE%) y capacidad de carga (CC%) de timol en las nanopartículas

Se estimó la CC% y EE% para el timol ya que se espera que este genere el mayor efecto antibacteriano en las nanopartículas a través de las ecuaciones 1 y 2, respectivamente (Araujo et al., 2013).

$$CC \% = MT / Mn \cdot 100 \quad (1)$$

Donde:

CC%: Corresponde a la capacidad de carga (%).

MT: Es la masa de timol determinada (mg).

Mn: Es la masa total de nanopartículas (mg).

$$EE \% = CC\% \cdot Mn / MTn \quad (2)$$

Donde:

EE %: Corresponde a la eficiencia de encapsulación (%).

CC%: Es la capacidad de carga (%).

Mn: Es la masa total de nanopartículas (mg).

MTn: Es la masa inicial de timol en las nanopartículas (mg).

2.3.3 Determinación de tamaño y potencial Z de nanopartículas: Las nanopartículas purificadas fueron sometidas a medición en triplicado de su respectivo Z Average, índice de polidispersidad (PDI) y potencial Z, a través de difracción de luz dinámica (DLS). Para ello se usó 1 mL de las muestras tratadas, las cuales fueron depositadas en una cubeta capilar plegada de poliestireno (modelo DTS 1060), utilizando como dispersante agua destilada. Se procedió a medir con láser de 633 nm a una temperatura de 25°C.

2.3.4 Determinación de humedad de las nanopartículas: La humedad fue determinada por una termobalanza a 105°C. El experimento fue realizado en triplicado.

2.3.5 Determinación de rendimiento en partícula (RP%)

El cálculo del rendimiento en partícula (RP) previo a la purificación se realizó mediante la ecuación 3 (Araujo et al., 2013):

$$RP\% = MP / MP_0 \cdot 100 \quad (3)$$

Donde:

MP: Masa total de nanopartículas en base seca obtenidas.

MP₀: Masa teórica de formulación de nanopartículas en base seca.

2.3.6 Microscopía de transmisión electrónica (TEM) de nanopartículas: Se utilizó la técnica de tinción negativa. Para ello, se tomó una grilla de cobre con una pinza fina, sobre la que se depositaron 20 μL de dispersión de nanopartículas, sin rebasar. Se esperó entre 10 s a 1 min para secar la gota de muestra parcialmente con un trozo de papel filtro. Luego se agregó una gota de colorante acetato de uranilo sobre la grilla y se esperó 1 min. Tiempo al cual se secó totalmente el borde de la grilla con un papel filtro. La grilla luego fue depositada en una placa de petri sobre papel filtro, de modo de proceder a identificarla y esperar algunos minutos hasta el secado total. Una vez preparada la grilla con la muestra, ésta se llevó a microscopía (Philips Tecnai 12 Bio Twin) (Nobeta, 2014).

2.3.7 Microscopía electrónica de barrido (SEM) de nanopartículas: Las muestras de nanopartículas se tiñeron al 2% (p/v) de ácido fosfotúngstico y se colocan sobre redes de cobre (SPI Supplies, Inc., West Chester, PA, EE.UU.), para secarse durante la noche y posteriormente llevarse a microscopía (HITACH TM tabletop microscope; Software: TM3000) (Nobeta, 2014).

2.3.8 Evaluación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas: Se determinó el área de inhibición de crecimiento según el protocolo establecido por Bauer et al. (1966), para *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Tiphymurium* ATCC 14028. Para ello, se evaluó en duplicado la capacidad antibacteriana de la formulación a una concentración de 3 mg/mL. Se utilizó un spot tóxico de 10 μL , sobre un cultivo de 10^6 UFC/mL de las cepas mencionadas en un medio Müller Hinton. Se usó un disco de diámetro de 6,0 mm, con un espesor de 0,65 mm.

2.4 Preparación de mezcla filmógena en base a proteínas de quínoa/ quitosano con incorporación de nanopartículas

2.4.1 Preparación de concentrado proteico de quínoa (EAP): Se tomó 100 g de una mezcla de harina de quínoa y agua en una relación 1:5, la cual fue llevada a pH 11 agregando la cantidad necesaria de NaOH 1 M, por un tiempo de una hora en constante agitación magnética y a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 21.000 x g por 30 min a 15°C, y se utilizó el sobrenadante obtenido.

2.4.2 Preparación de películas de mezcla quitosano-proteína de quínoa cargadas con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA): Se preparó una solución de Q de PM medio en ácido cítrico 0,1 M a una concentración final de 2% Q (p/v); para la incorporación de nanopartículas en un volumen determinado de sobrenadante acuoso de nanopartículas obtenidas se agregó como parte del solvente de manera que la carga de nanopartículas fuera de 1, 3 y 5% en relación a la masa de Q en la mezcla filmógena. Previamente se preparó concentrado proteico de quínoa (EAP) a pH 11, mezclado en una relación de 1:1 con el Q de PM medio 2%. Se añadió 100 g de solución de Q 2% (con nanopartículas) incorporando lentamente y bajo agitación constante en el vórtex del EAP (100 g); posteriormente la mezcla se ajusta a pH 3 con HCl 1M y se agita durante 1 hora. Para la eliminación de las burbujas generadas la mezcla se sometió a ultrasonido durante 30 minutos. Finalmente, 37 g de la mezcla preparada se vierten en placas de petri de polietileno de baja densidad de 13,5 cm de diámetro, las que se secan a 25°C en estufa con ventilación forzada. Las películas formadas fueron retiradas de las placas y acondicionadas a 23°C y 60 % de humedad relativa durante 2 días antes de realizar las determinaciones correspondientes.

2.4.3 Determinación del grado de transmisión de vapor de agua (TVA) y permeabilidad al vapor de agua (PVA): Para la determinación del grado de transmisión y permeabilidad de vapor de agua, se ocupó el método de la copa húmeda, de acuerdo a la Norma Chilena Oficial NCh2098.Of2000, equivalente a las normas ASTM D1653-93 y DIN 52615. Para ello, 5 copas se llenaron con agua destilada hasta alcanzar una distancia de 6 mm medidos desde el borde superior, sobre el cual se montó un film de película de igual diámetro. Finalmente, se sellaron con silicona los bordes de contacto entre el film y la copa.

La determinación de TVA y PVA, se determinó mediante dos experimentos. En el primero, las copas se colocaron en una cámara de temperatura y humedad a 60% H.R y 23°C, mientras que en el segundo, las copas se confinaron en una cámara de frío a 95 % de H.R y 5°C. Por un periodo de 21 días, donde se registró cada 24 h su cambio de peso utilizando una balanza analítica.

Para el cálculo del TVA se graficó la pérdida de masa de las copas en función del tiempo transcurrido.

$$TVA = \Delta m / t \cdot A \quad (4)$$

$$TVA\varepsilon = \Delta m / t \cdot A) \cdot \varepsilon \quad (5)$$

Donde:

TVA: Grado de transmisión de vapor de agua ($g \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$).

Δm : Cambio de masa ocurrido en el tiempo (g).

t : corresponde al tiempo entre lecturas (h).

A: Área de ensayo de la muestra (m^2).

ε : Espesor de los films (mm).

Para el cálculo de la permeabilidad al vapor de agua (PVA) se hizo uso de la ecuación 6.

$$PVA = TVA\varepsilon / \Delta P \quad (6)$$

Donde:

PVA: Permeabilidad al vapor de agua ($mm \cdot g \cdot kPa^{-1} \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$).

ΔP : Corresponde a S ($R_1 - R_2$).

S: Presión de saturación de vapor de agua a la temperatura del ensayo (kPa).

R_1 es la humedad relativa (%) de la parte con mayor presión de vapor y R_2 es la humedad relativa (%) de la parte con menor presión de vapor.

2.4.4 Determinación de las propiedades mecánicas: Se evaluó el alargamiento porcentual (A%) y el esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) en Nmm^{-2} , de acuerdo con la Norma Oficial Chilena NCh1151.Of1976, equivalente a la norma internacional ISO R1184-1970, con algunas modificaciones que se detallan a continuación. Se utilizaron al menos 4 films de cada material con dimensiones de 10 mm de ancho y 50 mm de largo, los cuales se sometieron a mediciones en el equipo universal de ensayo de materiales (Lloyd material testing TA1, Metek test & calibration instrument, serial 500No515), con una celda de 50 N. Los films 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 los films fueron estirados por la mordaza superior a una velocidad de 20 mm/min. Se registró la curva Carga vs. Alargamiento hasta el punto de ruptura de los films.

El cálculo de A% se efectuó en base a la ecuación 7, mientras que ETR se calculó en base a las ecuaciones 8 y 9.

$$A\% = (D_f - D_i / D_i) \cdot 100 \quad (7)$$

Donde:

A%: Alargamiento porcentual.

D_f: Distancia de alargamiento hasta la ruptura (mm).

D_i: Distancia inicial entre las líneas de referencia (mm).

$$ETR = C / A_R \quad (8)$$

Donde:

ETR: Esfuerzo de tracción a la ruptura (N/mm^2).

C: Carga máxima en la ruptura del film (N).

A_R: Área transversal inicial del film (mm^2).

$$A_R = \varepsilon \cdot A \quad (9)$$

Donde:

A_R: Área transversal inicial del film (mm^2).

ε : Espesor del film (mm^2).

A: Ancho del film (mm^2).

2.5 Aplicación de recubrimientos comestibles a frutillas y evaluación de su vida útil

2.5.1 Aplicación del recubrimiento comestible en la fruta

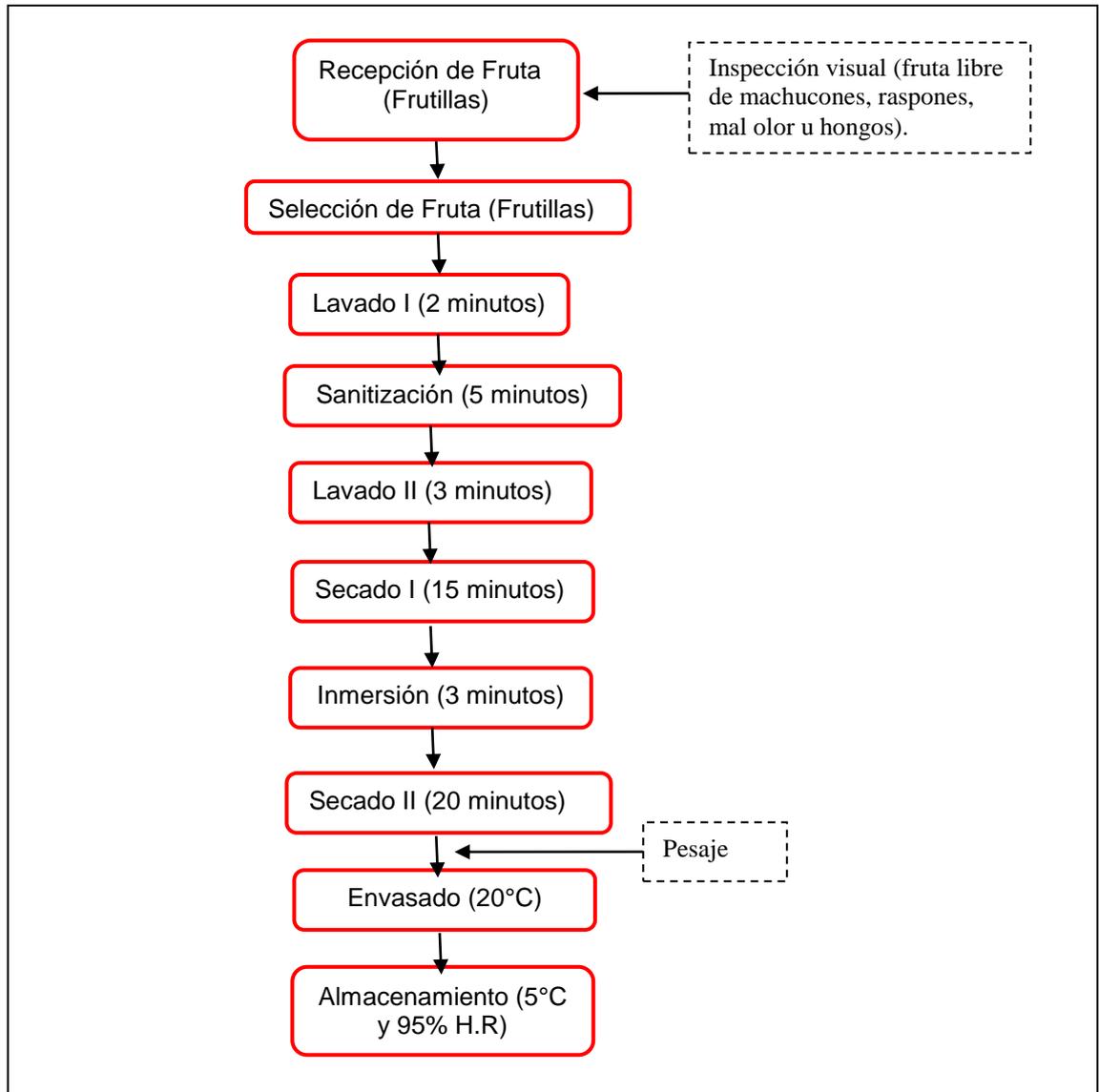


Fig.2.- Diagrama de bloques proceso de inmersión.

2.5.2 Descripción del diagrama de bloques

- **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 para la sanitización de fruta. Según especificaciones del envase de cloro concentrado. (5 min, 5 mL de cloro cada 10 L de agua).
- **Lavado II:** Lavado para eliminar los residuos de cloro (3 minutos).
- **Secado I:** Secado durante 15 minutos a 20°C con aire forzado en estufa.
- **Inmersión:** Se aplicaron 2 mezclas formadoras de películas entre proteínas de quínoa-quitosano (Mezcla (M)) y proteínas de quínoa-quitosano cargadas con nanopartículas al 5% (nA1%QTTP+ULTRA) (Mezcla 5% SFL (S)). Se mantuvo una muestra control sin aplicación de recubrimiento (Control (C)). La aplicación de las películas fue mediante inmersión, sumergiendo la fruta en las mezclas correspondientes durante 3 min.
- **Secado II:** Secado durante 20 minutos a 20°C con aire forzado en secador.
- **Envasado:** Se envasaron en envases de plástico (PET) a 20°C.
- **Almacenamiento:** La fruta envasada fue transportada a una cámara de refrigeración a una temperatura de 5°C y 95% H.R.

2.5.3 Determinación de la formación de las películas sobre las frutillas y su espesor

Se tomaron 100 g de fruta control y recubiertas, y se congelan durante 24 h a -18°C. Se realizaron cortes de tejido congelado de $\approx 0,1$ mm de espesor y se observó mediante un microscopio óptico con un aumento de 40x. Con las imágenes del tejido de fruta, se calculó el espesor de la película mediante el programa AxioVision 4.8, EE.UU.

2.5.4 Determinación de la vida útil de las frutillas recubiertas y control

Durante el período 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.

- I. **Pérdida de peso:** La pérdida de peso de la fruta con y sin recubrimiento se registró en las distintas fechas de muestreo. Las pérdidas de peso acumulado se expresa como la pérdida porcentual del peso original.

- II. **Firmeza:** Mediante la metodología descrita por Hernández-Muñoz et al. (2008) con una máquina universal de ensayos de materiales (Lloyd Instruments Limited). 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.

- III. **pH:** Se midió al jugo de la frutilla, utilizando un pH-metro según la norma NC-ISO 1842: 2001.

- IV. **Acidez titulable (AT):** Se midió al jugo de la frutilla mediante una titulación ácido-base, según la norma NC-ISO 750: 2001. Los resultados se expresaron en g de ácido cítrico/100 mL de pulpa de fruta.

- V. **°Brix:** Se midió al jugo de la frutilla con un refractómetro digital, y se expresaron en porcentaje, según la norma NC-ISO 2173: 2001.

- VI. **Índice de madurez:** Se calculó como el cociente entre el porcentaje de °Brix y la AT.
- VII. **Decaimiento fúngico:** La medición de decaimiento fúngico (frutas infectadas por contaminación fúngica), se realizó por inspección visual desde el día 0 cada 5 días hasta el día 15 (frutillas).
- VIII. **Recuento de hongos y levaduras:** Se realizaron según la NC-ISO 7954:2002 y NCh 2734 Of2002. Se tomaron muestras de 10 g de fruta control y recubiertas y se prepararán las diluciones necesarias para la cuantificación de las UFC/g de muestra.
- IX. **Análisis sensorial:** Se realizó un test de escala lineal no estructurada y un test de Karlsruhe 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 a 5°C y 95% H.R de la fruta.

2.6 **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza ($p < 0,05$) y se empleó la prueba de Tuckey para la comparación de medias. Se utilizó el programa estadístico STATGRAPHICS Centurion XV ®.

3 Resultados y discusión

3.1 Caracterización de las nanopartículas

Se caracterizó las nanopartículas elaboradas por el método de SFL, con distintas formulaciones con la aplicación de ultrasonido (nQTTP+ULTRA, nA1QTTP+ULTRA y nQTTP1%+ULTRA) y sin el (nQTTP, nQTTP y nA1%QTTP) mediante la determinación del tamaño, potencial Z y PDI como parámetro de estabilidad, capacidad de carga (CC%) y eficiencia de encapsulación (EE%) de timol, rendimiento en partículas (RP%), SEM y TEM. Con el fin de encontrar la formulación con mayor CC% y EE% de timol, con un tamaño entre 200 - 300 nm y con mayor estabilidad en el tiempo (días).

3.1.1 Caracterización de nanopartículas producidas mediante método de SFL Quitosano/Terbutanol-Timol-Pluronic F-127-Trehalosa (nQTTP 1, 2 y 3%), Quitosano/Terbutanol-Timol-Pluronic F-127 (nQTTP) y Quitosano/ác.acético-Terbutanol-Timol-Pluronic F127 (nA1%QTTP)

3.1.1.1 Determinación de tamaño y potencial Z para diferentes formulaciones de nanopartículas

En la **Tabla 3** se observan los valores de Z Average, PDI y potencial Z para las diferentes formulaciones de nanopartículas, donde se aprecia un tamaño de partícula de para nQTTP y nA1%QTTP de 993 ± 255 y 1.167 ± 202 nm. Donde se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) en las nanopartículas (nQTTP 1%, 2% y 3%) que se les adicionó trehalosa como crioprotector a distintas concentraciones (354 ± 64 , 337 ± 25 y 454 ± 37 nm, respectivamente). De los tamaños señalados, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras adicionadas con el crioprotector a distintas concentraciones, pero si presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) al compararlas con las nanopartículas que no poseen este crioprotector, en las que se triplica el tamaño. Esto se pudo deber a que el mecanismo de estabilización por parte de la trehalosa evita la agregación de las nanopartículas durante la congelación (Abdelwahed et al., 2006). La forma como actuaría este crioprotector es estableciendo enlaces de hidrógeno con los grupos polares en la superficie de las nanopartículas al final del proceso de secado preservando las estructuras nativas (Abdelwahed et al., 2006). En cuanto al PDI las muestra sin la adición

del agente crioprotector se encuentra arriba del rango de estabilidad y funcionalidad para nanopartículas que debe ser inferior al valor de 0,7 (Müller et al., 2001), mientras que las que sí lo poseen presentan un valor alrededor de 0,4. Respecto al potencial Z, nQTTPT 1% destaca significativamente ($p < 0,05$) al poseer un potencial equivalente a $47 \pm 2,8$ mV en comparación con las otras nanopartículas cuyos valores oscilan entre 33 y 41 mV. El potencial Z se entiende como la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estanca, el cual es utilizado como parámetro de estabilidad en el tiempo para las nanopartículas (Hanaor et al., 2011).

Tabla 3.- Z Average, PDI y potencial Z para nanopartículas de quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127 (nQTTP); quitosano/ác.acético1%-terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127-trehalosa (nQTTPT 1, 2 y 3%).

Formulación	Z Average [nm] Media \pm DE (n=3)	PDI Media \pm DE (n=3)	Potencial Z [mV] Media \pm DE (n=3)
nQTTP	993 ^a \pm 255	0,81 ^a \pm 0,07	41 ^a \pm 4,6
nA1%QTTP	1.167 ^a \pm 202	1,00 ^b \pm 0,0	39 ^{ab} \pm 1,7
nQTTPT 1%	354 ^b \pm 64	0,42 ^c \pm 0,05	47 ^c \pm 2,8
nQTTPT 2%	337 ^b \pm 25	0,43 ^c \pm 0,09	39 ^{ab} \pm 5,0
nQTTPT 3%	454 ^b \pm 37	0,45 ^c \pm 0,03	33 ^b \pm 5,8

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.1.1.2 Determinación de capacidad de carga (CC%), eficiencia de encapsulación (EE%) de timol y rendimiento en partícula (RP%) para diferentes formulaciones de nanopartículas

Se evaluó la capacidad de carga (CC%), la eficiencia de encapsulación (EE%) y el rendimiento en partículas (RP%) para las diferentes formulaciones de nanopartículas fabricadas (**Tabla 4**).

Para la CC%, se observa que las nanopartículas que poseen trehalosa presentan menores valores, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) mientras mayor es la concentración del agente crioprotector (1, 2 y 3%), menor es la CC% ($0,88 \pm 0,01$, $0,72 \pm 0,01$, $0,53 \pm 0,01$, respectivamente). Respecto a su EE% ronda alrededor de un 50% encontrándose diferencias ($p < 0,05$) significativas entre muestras. Se piensa que los menores valores de CC% obtenidos podrían estar evidenciando una pérdida del activo durante el proceso

de fabricación de las nanopartículas, o una competencia entre el activo y el agente crioprotector por las nanopartículas.

Por otro lado las nQTTP, la cual se utilizó ácido cítrico 0,1% como solvente para la preparación de la solución de quitosano (LMW) 0,3% p/v presento CC% de $1,83 \pm 0,01$ y EE% $55,5 \pm 0,25$. En comparación con las nA1%QTTP en la que se utilizó ácido acético 1% para la preparación de la solución de quitosano (LMW) 0,3% p/v presento un CC% de $6,8 \pm 0,04$ y $91,7 \pm 0,53$, encontrándose diferencias significativas ($p < 0,05$) con todas las otras muestras. Este aumento en CC% y EE% al reemplazar el ácido cítrico por ácido acético 1% en la solución de quitosano 0,3% p/v puede ser explicado debido a que durante el proceso de pulverización-congelación (SFL), se evapora todo el ácido acético, ya que este es líquido (P.E:118°C y P.F:16°C) a 25°C, mientras que el ác. cítrico es sólido (P.E:175°C y P.F:153°C) en la mismas condiciones, por lo cual durante el proceso se evapora prácticamente todo el ác. acético, lo que no ocurre con el ácido cítrico el cual representa un 80% de la cantidad de nanopartículas obtenidas por este proceso. Lo que genera se supone que existe menor competición por el activo al no haber ác. cítrico, lo que permitiría de mejor manera la formación de micelas con el centro hidrofóbico de óxido de polipropileno (POP) en las nanopartículas que es donde se piensa que se concentraría el activo, mientras que por el exterior se dispondrían cadenas de óxido de polietileno (POE), las cuales podrían interactuar mediante puentes de hidrógeno con los grupos amino del quitosano (Hosseinzadeh et al., 2012).

Respecto al rendimiento en partícula, se observa una tendencia de descenso en el RP% en las nanopartículas (nA1%QTTP) al reemplazar el ácido cítrico por ácido acético en la solución de quitosano al 0,3% p/v, esto puede deberse a una pérdida del activo durante el proceso de producción de las nanopartículas (Hu et al., 2003). La pérdida del activo timol (P.E:232,9°C y P.F:51,5°C) podría deberse también a que los derivados de los aceites esenciales volatilizan en vapores de agua por lo que se podría estar perdiendo por arrastre durante el proceso de congelación-pulverización.

Tabla 4.- Capacidad de carga (CC%), eficiencia de encapsulación (EE%) y rendimiento en partículas (RP%) para nanopartículas de quitosano-terbutanol- timol-pluronic F127 (nQTTP); quitosano/ác.Acético 1%-terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127 - trehalosa (nQTTPPT 1, 2 y 3%).

Muestra	CC% Media±DE (n=3)	EE% Media±DE (n=3)	Rendimiento en partículas (%RP) Media±DE (n=3)
nQTTP	1,83 ^a ± 0,01	55,5 ^a ± 0,25	73,2 ^a ± 2,59
nA1%QTTP	6,8 ^b ± 0,04	91,7 ^b ± 0,53	52,5 ^b ± 1,10
nQTTPPT 1%	0,88 ^c ± 0,01	43,3 ^c ± 0,42	80,8 ^c ± 1,06
nQTTPPT 2%	0,72 ^d ± 0,01	49,9 ^d ± 0,49	85,8 ^d ± 0,95
nQTTPPT 3%	0,53 ^e ± 0,01	47,4 ^e ± 0,62	87,1 ^d ± 1,57

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

3.1.1.3 Estabilidad de las nanopartículas en el tiempo

Se evaluó la estabilidad de las distintas formulaciones observando el crecimiento del tamaño de partícula en el tiempo medido en días. Se midió durante 45 días por el método de DLS y se pudo observar que para las nanopartículas nQTTP aumentó de 993 a 1.474 nm, nA1%QTTP 1.167 a 1.650,2 nm. Con un PDI fuera del rango de estabilidad y funcionalidad para nanopartículas que debe ser inferior al valor de 0,7 (Müller et al., 2001). Respecto a las muestras que poseen un agente crioprotector después de 8 días sus valores de PDI no aumentan significativamente en el tiempo, manteniendo su PDI dentro del rango de estabilidad. Sin embargo, sus diámetros se encuentran dentro del rango de 352 a 483 nm (Fig.3) y dado que la finalidad de las nanopartículas estudiadas va dirigida a la incorporación a películas comestibles, donde el tamaño influirá en el grado de tortuosidad de la película y por ende en la permeabilidad al vapor de agua (De Moura, 2009) se buscan tamaños por debajo de los 300 nm para un óptimo resultado.

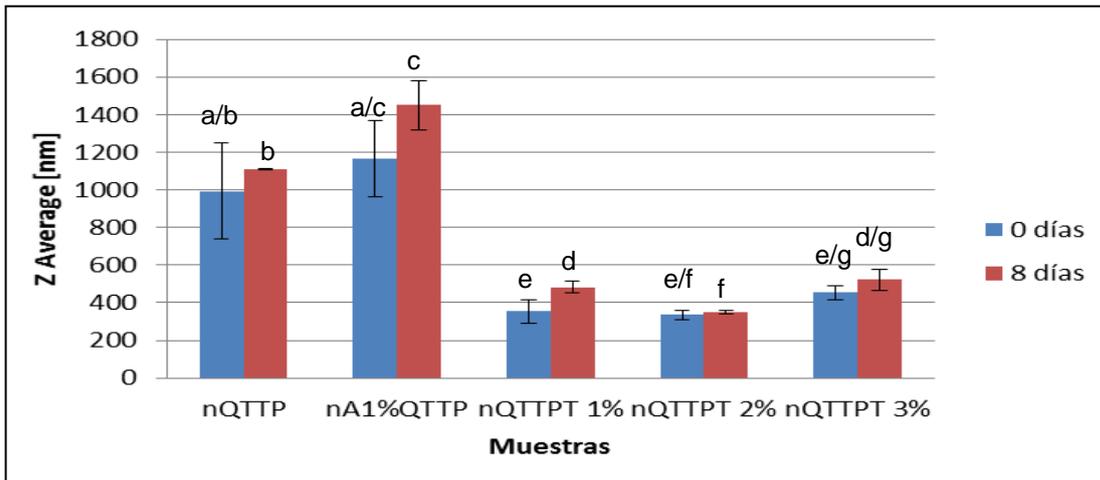


Fig. 3.- Variaciones del Z Average [nm] durante el tiempo de almacenamiento de las suspensiones de nanopartículas. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.1.2 Aplicación de ultrasonido a nanopartículas producidas mediante método de SFL

Se evaluó la utilización de ultrasonido para disminuir el tamaño de las partículas de las muestras de nanopartículas realizada con de quitosano/(ác. cítrico o ác. acético) -terbutanol- timol- pluronic F127 y trehalosa al 1, 2 y 3%.

En primer lugar, se determinaron las condiciones óptimas para la aplicación por ultrasonido (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C y sonda de diámetro 12,7 mm) (Ghosh et al., 2013). Se tomó como óptimo el proceso en el cual se obtuviera el tamaño más pequeño con la menor cantidad de energía posible (Fig.4), encontrándose un tiempo de 30 minutos como óptimo.

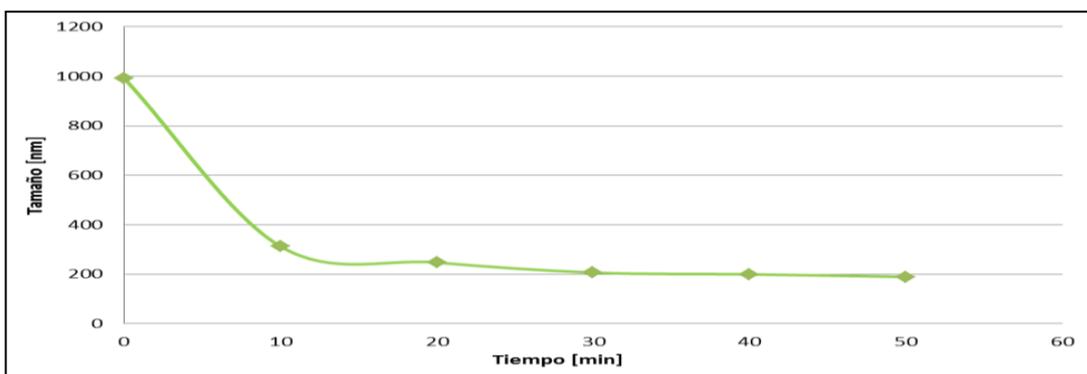


Fig.4.- Determinación del tamaño (nm) óptimo de la muestra en el tiempo (min).

3.1.2.1 Determinación de tamaño y potencial Z para diferentes formulaciones de nanopartículas

En la **Tabla 5** se observan los valores de Z Average, PDI y potencial Z para las diferentes formulaciones de nanopartículas fabricadas mediante el método SFL, más la aplicación de ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C y sonda de diámetro 12,7 mm) (Ghosh et al., 2013). Donde se aprecia un Z Average de $174 \pm 10,25$, $288 \pm 7,17$ y $181 \pm 8,99$ nm para nQTTP+ULTRA, nA1%QTTP+ULTRA y nQTTP1%+ULTRA, respectivamente. De los tamaños señalados, no se observó diferencias significativas ($p > 0,05$) entre nQTTP+ULTRA y nQTTP1%+ULTRA el cual este último posee un agente crioprotector adicionado. Esto podría deberse que el ultrasonido produce ondas ultrasónicas en el fluido por cambio de tamaño en sintonía con una señal eléctrica oscilante a la frecuencia de los ultrasonidos, esto crea ondas de compresión en el líquido que "rompen" el líquido, por lo que no importar el tamaño inicial de las muestras una vez terminado este proceso (Ghosh et al., 2013).

En cuanto al PDI las muestras luego de la aplicación de ultrasonido se encuentran dentro del rango de estabilidad y funcionalidad para nanopartículas que debe ser inferior al valor de 0,7 (Müller et al., 2001). Respecto al potencial Z, nQTTP1%+ULTRA y nQTTP+ULTRA destacan significativamente ($p < 0,05$) al poseer un potencial equivalente a $47 \pm 0,95$ y $45,8 \pm 2,18$ mV (estables en el tiempo), en comparación con las otras nanopartículas de nA1%QTTP+ULTRA cuyo valor es de $19,6 \pm 1,43$ mV (podrían tender a la aglomeración). Para el caso de las suspensiones de nanopartículas de quitosano preparadas, se esperaban valores positivos debido a los grupos amino protonados del quitosano con carga positiva, los cuales son rodeados por sus contra iones citratos (Hanaor et al., 2011).

Tabla 5.- Z Average, PDI y potencial Z para nanopartículas de quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127 (nQTTP+ULTRA); quitosano/ác.acético 1%-terbutanol-timol pluronic F127 (nA1%QTTP+ULTRA) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127 - trehalosa (nQTTP1%+ULTRA), con la aplicación de ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C y sonda de diámetro 12,7 mm = ULTRA).

Formulación	Z Average [nm] Media±DE (n=6)	PDI Media±DE (n=6)	Potencial Z [mV] Media±DE (n=6)
nQTTP + ULTRA	174 ^a ± 10,25	0,32 ^a ± 0,03	45,8 ^a ± 2,18
nA1%QTTP + ULTRA	288 ^b ± 7,17	0,42 ^b ± 0,02	19,6 ^b ± 1,43
nQTTP1% + ULTRA	181 ^a ± 8,99	0,34 ^a ± 0,04	47 ^a ± 0,95

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

3.1.2.2 Determinación de capacidad de carga (CC%), eficiencia de encapsulación (EE%) y rendimiento en partícula (RP%) para diferentes formulaciones de nanopartículas y ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C y sonda de diámetro 12,7 mm = ULTRA)

Se evaluó la capacidad de carga (CC%), la eficiencia de encapsulación (EE%) y el rendimiento en partículas (RP%) para las diferentes formulaciones de nanopartículas fabricadas por método SFL, más la aplicación de ultrasonido (Tabla 6). Para la CC%, se observa que las nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA), posee diferencias significativas (p<0,05) (6,7±0,01%), en comparación con nQTTP+ULTRA y nQTTP1%+ULTRA (3,2±0,01 y 1,7±0,01%). Lo que puede atribuirse a que en las nA1%QTTP+ULTRA se utilizó ácido acético al 1% (P.E:118°C y P.F:16°C) en la preparación de la solución de quitosano (LMW), el cual se evapora durante el proceso de congelación-pulverización (SFL) (pruebas experimentales realizadas), lo que no ocurre con el ácido cítrico el cual representa un 80% de la cantidad de nanos obtenidas (nQTTP+ULTRA y nQTTP1%+ULTRA), permitiendo de mejor manera la encapsulación del activo (Hu et al., 2003). Respecto al RP% y EE% corresponden a los mostrados y discutidos en la sección 3.1.1.2.

Por todo esto se decidió en adelante que las nanopartículas a ser utilizadas en la incorporación a las películas sean las nA1%QTTP+ULTRA (ULTRA = amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51° con sonda de diámetro 12,7 mm durante 30 min) ya que son las que poseen un mejor tamaño (entre 200 – 300nm) y mayor CC% de timol que es lo que se busca para lograr una mayor barrera al vapor de agua y efecto antibacteriano significativo.

Tabla 6.- Capacidad de carga (CC%), eficiencia de encapsulación (EE%) y rendimiento en partículas (RP%) para nanopartículas de quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127 (nQTTP+ULTRA); quitosano/ác.acético 1%-terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP+ULTRA) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127-trehalosa (nQTTP1%+ULTRA). (ULTRA = amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C y sonda de diámetro 12,7 mm durante 30 min).

Muestra	CC% Media±DE (n=3)	EE% Media±DE (n=3)	Rendimiento en partículas (%RP) Media±DE (n=3)
nQTTP + ULTRA	3,2 ^a ± 0,01	98,5 ^a ± 0,40	73,2 ^a ± 2,59
nA1%QTTP + ULTRA	6,7 ^b ± 0,01	91,2 ^b ± 0,17	52,5 ^b ± 1,10
nQTTP1% + ULTRA	1,7 ^c ± 0,01	84,3 ^c ± 0,72	80,8 ^c ± 1,06

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

3.1.2.3 Estabilidad de las nanopartículas tratadas con ultrasonido (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C) en el tiempo

En la **Tabla 7** se evaluó la estabilidad medida como el grado de aglomeración de las nanopartículas en el tiempo (días) por medio del método de DLS para las distintas formulaciones con la aplicación de ultrasonido. Se midió durante 57 días y se pudo observar que para las nanopartículas desde el día 0 hasta el día 57 no presentaron diferencias significativas (p>0,05) en el aumento de su tamaño. Presentando un PDI (0,32 a 0,42) dentro del rango de estabilidad y funcionalidad para nanopartículas que debe ser inferior al valor de 0,7 (Müller et al., 2001). Debido a que sus diámetros se encuentran por debajo de 300 nm al aplicar ultrasonido se encuentran dentro del rango óptimo para su aplicación dentro de las películas.

Tabla 7.- Estabilidad en el tiempo (días) para nanopartículas de quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127 (nQTTP+ULTRA); quitosano/ác.acético 1%-terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP+ULTRA) y quitosano-timol-terbutanol-pluronic F127 - trehalosa (nQTTP1%+ULTRA), con la aplicación de ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C).

Formulación	Tiempo (días)	Z Average [nm] Media±DE (n=3)	PDI Media±DE (n=3)	Potencial Z [mV] Media±DE (n=3)
nQTTP + ULTRA	57	195 ^a ± 1,70	0,34 ^a ± 0,01	46,2 ^a ± 0,06
nA1%QTTP + ULTRA	57	286 ^b ± 1,2	0,42 ^a ± 0,01	19,6 ^b ± 0,81
nQTTP1% + ULTRA	57	188 ^c ± 5,05	0,37 ^b ± 0,03	46,8 ^a ± 0,65

Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

3.1.2.4 Caracterización de nA1%QTTP+ULTRA mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM)

Se evaluó el tamaño de nA1%QTTP+ULTRA mediante TEM. Como se observa en la Fig. 5 posee una morfología esférica con un tamaño que fluctúa entre los 36 a los 160 nm. Se observó un bajo grado de aglomeración, lo que puede atribuirse a la utilización de ultrasonido (Ghosh et al., 2013). Resultados similares en tamaño se han reportado por algunos autores que han trabajado en producción de nanopartículas de quitosano por medio de gelificación iónica (Savé, 2011; Keawchaon y Yoksan, 2011; Medina, 2014). Por otro lado, si se comparan los tamaños de partículas obtenidos mediante TEM y DLS (140,8±29 y 286±1,2, respectivamente), se observan claras diferencias, donde se duplica aproximadamente el valor cuando se mide por DLS. Esto es debido a que la técnica TEM, realiza una medición microscópica directa y DLS lo que realmente mide es el diámetro hidrodinámico, el cual se basa en la relación entre el comportamiento de las partículas y su tamaño (Akbari, 2011, Nobeta, 2014).

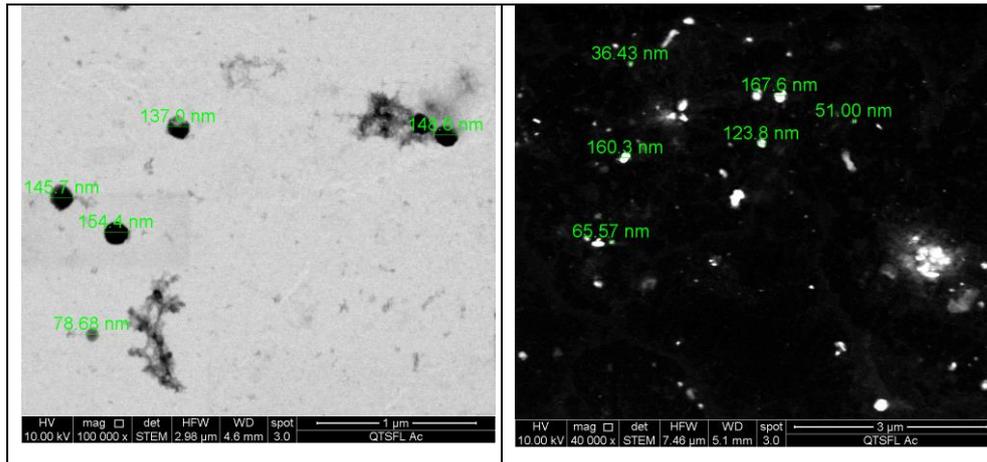


Fig.5.- Microscopía de transmisión electrónica (TEM) para nanopartículas de quitosano/ác.acético 1%-terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP+ULTRA) por método SFL y ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C).

3.1.2.5 Caracterización de nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

Dado que para obtener las micrografías SEM fue necesario secar las muestras de suspensiones nQA1% y nQA1%TTP formaron estructuras a nivel macro. Por lo cual no es posible determinar las estructuras de las nanopartículas. Además de que no fueron fotografiadas con el zoom más adecuado para el tamaño de estas.

De lo que se puede observar en las micrografías la estructura y morfología de nA1%Q (Fig. 6-a/b), muestra una morfología amorfa, rugosa, fracturada y altamente porosa; típica de las nanopartículas producidas mediante el método SFL. Para el caso de nA1%QTTP (Fig. 6-c/d), la morfología mantiene una estructura amorfa y rugosa, pero presenta un mayor grado de fractura. El alto grado de porosidad observado se atribuye a la formación de canales formados al momento de la sublimación del solvente presente en la nanogota congelada (Hu, et al 2003).

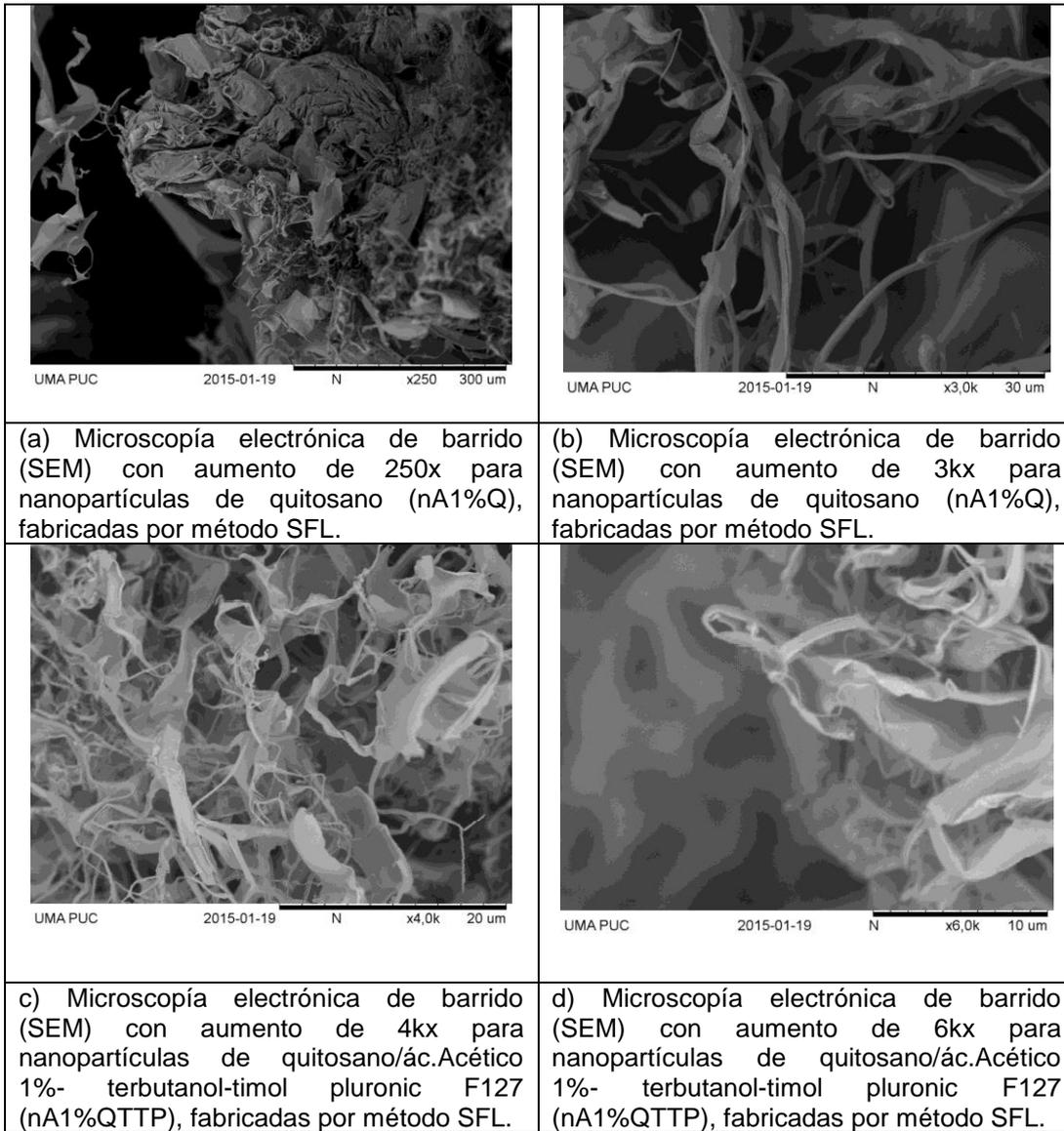


Fig.6.- Microscopía electrónica de barrido (SEM) para nanopartículas de quitosano (nA1%Q) y nanopartículas de quitosano/ác.acético 1%- terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP), fabricadas por método SFL.

3.1.2.6 Determinación de la actividad antimicrobiana de las nanopartículas

Se determinó el área de inhibición de crecimiento para *Listeria Innocua*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Tiphymurium* ATCC 14028 (Fig.7). Se observó que para las 3 bacterias, las nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA (ULTRA = amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C durante 30 min) presentaron un área de inhibición de crecimiento al enfrentarse tanto a las suspensiones de nA1%Q+ULTRA a una concentración de 3 mg/mL de nanopartículas (0,24 mg/mL de timol), y a las soluciones de quitosano 0,3% p/v, quitosano/timol y ácido acético, utilizadas para preparar las nanopartículas (Fig.7). Este efecto esperado se atribuye a las propiedades antimicrobianas del timol y quitosano, el cual por su naturaleza policatiónica interactuaría con las cargas negativas de la superficie celular de los microorganismos, produciendo una alteración de la funcionalidad celular (Chung et al., 2004).

En caso de la *Listeria innocua* se observa que la mayor área de inhibición se alcanza al utilizar las nanopartículas de nA1%QTTP+ULTRA a una concentración de 3 mg/mL de nanopartículas obteniéndose un valor de $4,41 \pm 2,65 \text{ mm}^2$ y para la las nA1%Q+ULTRA fue de $1,32 \pm 0,29 \text{ mm}^2$. Mientras que para las soluciones de quitosano, quitosano/timol y ác. acético fueron de $1,09 \pm 0,78$, $1,35 \pm 1,12$ y $1,09 \pm 0,78 \text{ mm}^2$, respectivamente. Este resultado concuerda con lo presentado en la literatura, donde se establece (Wazed et al., 2011) un mejor efecto antimicrobiano al utilizar nanopartículas de quitosano respecto a solución de quitosano. Por otro lado, para *Staphylococcus aureus* y *Salmonella Tiphymurium* se observa una mayor área de inhibición para la suspensión de nA1%QTTP+ULTRA a 3 mg/mL de nanopartículas ($3,58 \pm 1,64$ y $3,84 \pm 1,1 \text{ mm}^2$) respecto a las soluciones de ác. acético 1%, Quitosano/Timol (Q/T) y Quitosano 0,3% p/v). En cuanto a las suspensiones de nA1%QTTP a las concentraciones de 3 y 50 mg/mL de nanopartículas, se observaron diferencias significativa ($p < 0,05$) en sus áreas. Esto podría ser explicado por la disrupción de la integridad de la membrana microbiana al ocurrir la adsorción y permeación de las nanopartículas por parte de la superficie celular (Chen et al., 2010; Strand, 2003), dado que las nanopartículas a una concentración de 50 mg/mL era una suspensión aglomerada.

Se esperaba que las suspensiones con nA1%QTTP+ULTRA tuvieran una actividad antimicrobiana mayor debido a la naturaleza lipofílica del timol

que ejercería su capacidad antimicrobiana a nivel de la membrana y de los complejos enzimáticos de los microorganismos, alterando la permeabilidad de membrana y/o la inhibición de la cadena respiratoria celular (Marei et al., 2012).

Al comparar las nanopartículas producidas por SFL (nA1%QTTP+ULTRA, nA1%Q+ULTRA y nQTP) y gelificación iónica (Q/Timol y nQ) (Medina, 2014; Nobeta, 2014) a una concentración de 0,24 mg/mL de timol (Fig.8) se puede observar que los controles nA1%Q+ULTRA y nQ, presentan menos efecto antimicrobiano que las nanopartículas que contienen timol (nA1%QTTP+ULTRA y Q/Timol), a excepción de nQTP lo que se puede deber a la baja carga de timol en las nanopartículas para manifestar algún efecto o que posee un tiempo de liberación del compuesto activo muy tardío. Además de su mayor tamaño original, lo que dificultarían la adsorción de las nanopartículas por parte de la membrana celular de la bacteria (Marei et al., 2012). Mientras que las nanopartículas nA1%QTTP+ULTRA y Q/Timol no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$) para ninguno de los 3 microorganismos estudiados. Esto se puede deber a que la CC% son aproximadamente similares, de lo que se deduce que la capacidad antimicrobiana se debe al timol que ejecuta su acción a nivel de los lípidos 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).

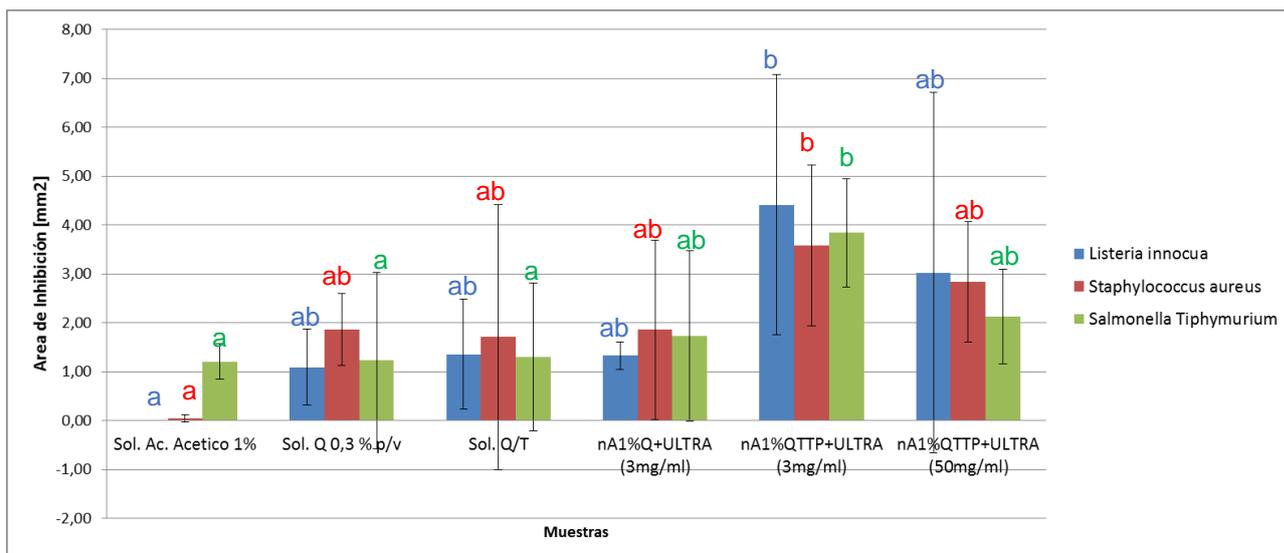


Fig.7.- Área de inhibición de crecimiento para diferentes bacterias frente a suspensiones de nA1%Q+ULTRA, nA1%QTTP+ULTRA (con la aplicación de ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C.) y controles (Sol. ác. acético 1%, Quitosano/Timol (Q/T) y Quitosano 0,3% p/v). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

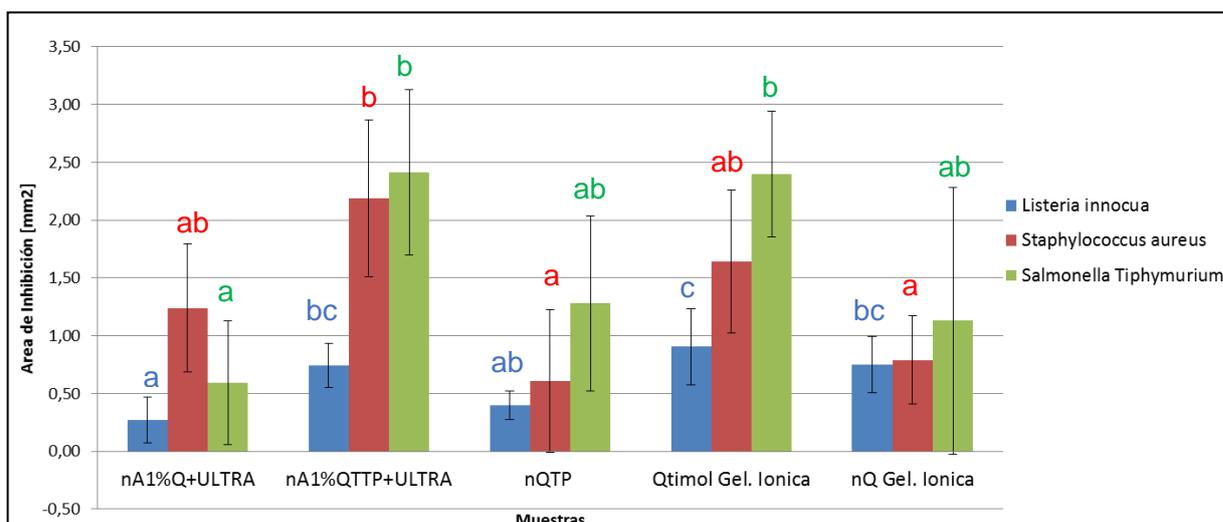


Fig.8.- Comparación del Área de inhibición de crecimiento para diferentes bacterias frente a suspensiones de nA1%Q+ULTRA, nA1%QTTP+ULTRA, nQTP por método de SFL, nQ/T y nQ fabricadas por método de gelificación iónica (Medina, 2014). (ULTRA = amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C durante 30 min). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.2 Caracterización de las Películas comestibles

Las nanopartículas que presentaron mayores CC% de timol, tamaño entre 200-300nm y buena estabilidad fueron las nA1%QTTP+ULTRA, las que fueron elegidas para su incorporación en películas comestibles de quitosano y proteína de quínoa. Las películas se caracterizaron mediante SEM, permeabilidad al vapor de agua (PVA), porcentaje de alargamiento (A%) y esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) en dos condiciones de almacenamiento 23°C y 60%H.R y 5°C y 95% H.R, cargadas con 1, 2 y 3% de nanopartículas respecto a la cantidad de quitosano de PM medio utilizado en ellas.

3.2.1 Obtención y caracterización de películas de quitosano- proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas

En base a los datos obtenidos de la elaboración y caracterización de nanopartículas, se escogieron nanopartículas de quitosano/ác.acético 1%-terbutanol-timol-pluronic F127 (nA1%QTTP+ULTRA) fabricadas por el método SFL y sometidas a ultrasonido 30 min (amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C). Con ellas, se cargaron las películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa (QP) evaluadas a continuación.

3.2.2 Caracterización morfológica de películas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

En la Fig.9 se observan las imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) que permiten evidenciar la incorporación efectiva de las nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA) a las películas de quitosano, tras agregar un 5% de nanopartículas a la formulación. En la Fig.9 (a-b) se observa que las películas de quitosano sin la adición de nanopartículas mostraron una microestructura superficial compacta, homogénea, y con presencia de algunos poros. Además se observó la presencia de microfracturas en la superficie, lo que puede deberse al proceso de secado (Fig.9 –b). En la Fig.9 (c-d) se puede observar una película compacta, homogénea con la presencia de algunos poros y la presencia de nanopartículas en toda la superficie de la película. Varios autores han reportado la alta homogeneidad estructural en películas de

quitosano (Vargas et al., 2009; Abugoch et al., 2011), debido a que este material es un polisacárido muy estructurado. Según la literatura en la medida que en las superficies de las películas se presenten más poros, canales y grietas, se produce una mayor permeabilidad al vapor de agua y otros gases (Jiménez et al., 2010). Finalmente la presencia de la microfracturas observadas en las películas pueden explicar en parte un menor valor de ETR, ya que estas otorgan una mayor fragilidad a las matrices de las películas (Mali et al., 2002).

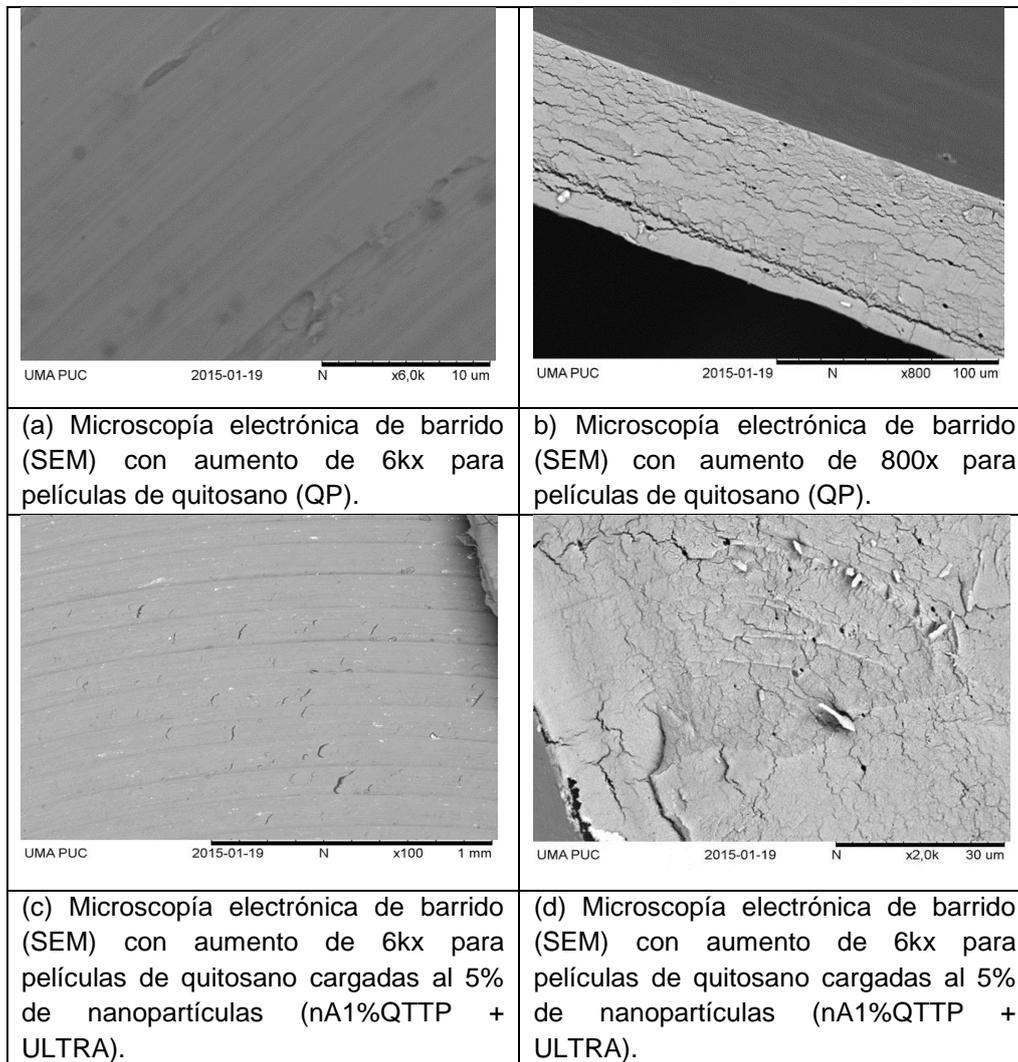


Fig.9.- Microscopía electrónica de barrido (SEM) para películas de quitosano (QP) y cargadas con nanopartículas al 5% (nA1%QTTP+ULTRA). (ULTRA = amplitud 80%, pulsaciones cada 30 segundos y T° máxima 51°C, durante 30 min).

3.2.3 Determinación de PVA para películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas, acondicionadas a 23°C y 60 % H.R

Se busca la película comestible de quitosano-proteína de quínoa cargada a distintas concentraciones de nanopartículas que presente la menor permeabilidad al vapor de agua, de manera de conservar adecuadamente los parámetros mecánicos y fisicoquímicos de la fruta recubierta con esta durante el tiempo de almacenamiento (días).

En la Fig.10 se observa que el PVA para películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa (QP) control (sin nanopartículas) se obtuvo un valor de PVA de $0,38 \pm 0,02$ g·mm/kPa·día·m² mientras que para las películas cargadas con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA) al 1, 3 y 5% se obtuvo valores de $0,36 \pm 0,04$, $0,36 \pm 0,05$ y $0,34 \pm 0,03$ g·mm/kPa·día·m², respectivamente. Observando que las películas cargadas con nanopartículas 1 y 3%, no presentan diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto al control. Entre las QP cargadas con nanopartículas 1, 3, 5% no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$), pero si las QP cargadas al 5% respecto al control. En la Fig.11 se observa una reducción del 12% del valor de PVA en relación al blanco QP cuando la película se encuentra cargada con nanopartículas al 5%. Se piensa que la disminución de PVA presentada al incorporar nanopartículas en QP se puede atribuir por un lado a la formación de un camino tortuoso para la difusión del vapor de agua (Duncan, 2011). Mediante éste concepto las moléculas de gas tendrían que atravesar canales formados por las nanopartículas intercaladas en la matriz polimérica en vez de atravesar directamente de manera perpendicular el polímero. De esta forma, el camino tortuoso incrementaría la longitud promedio de difusión del vapor de agua (Duncan, 2011; Nobeta, 2014).

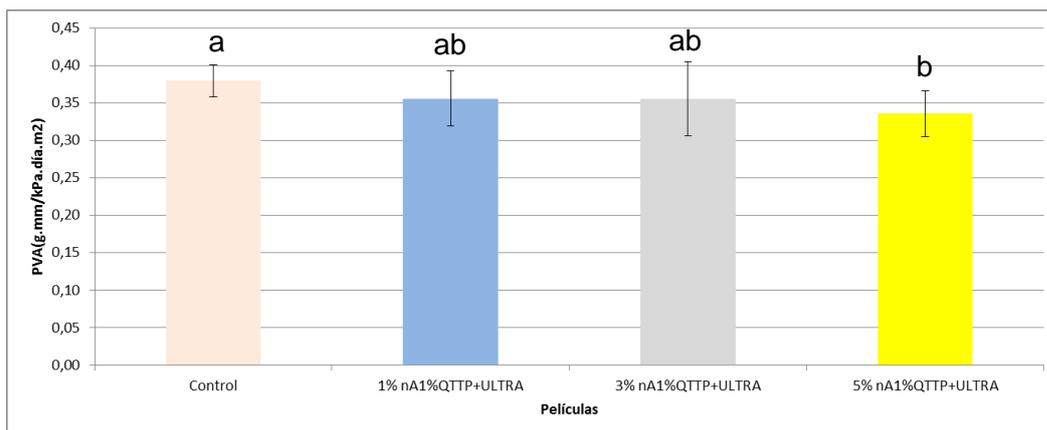


Fig.10.- Permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP), cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones. Acondicionadas a 23°C y 60 % H.R. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

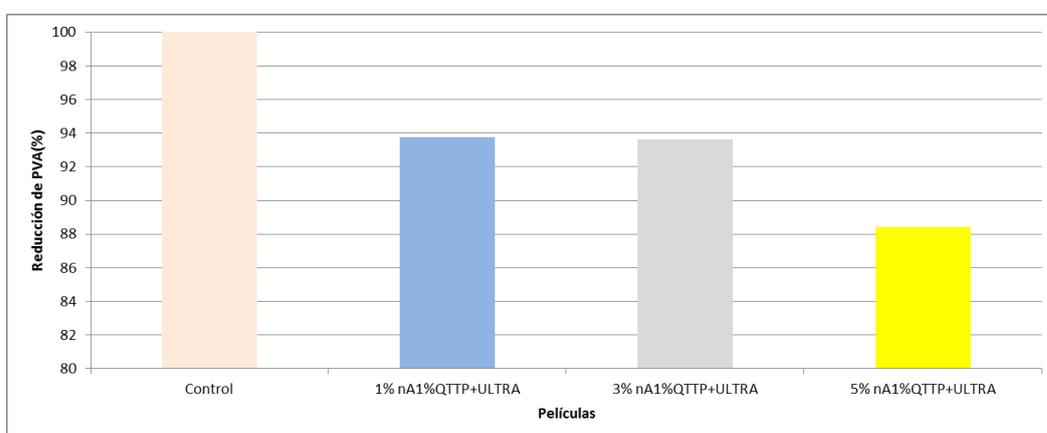


Fig.11.- Reducción de permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-concentrado proteico de quínoa cargadas con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA) al 1, 3 y 5%. Acondicionadas a 23°C y 60 % H.R. Donde la reducción se toma en base a QP como 100 %.

3.2.4 Permeabilidad al vapor de agua (PVA) para películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas, acondicionadas a 5°C y 95 % H.R

Para simular una condición de almacenamiento de las frutillas se evaluó la PVA para películas cargadas con nanopartículas (Fig.12 y 13), acondicionadas a 5°C y 95 % H.R. Para el control sin nanopartículas (QP control) se obtuvo un valor de PVA de $2,35 \pm 0,43$ g·mm/kPa·día·m² mientras que para las películas cargadas de nA1%QTTP+ULTRA al 1, 3 y 5% se obtuvo valores de $1,9 \pm 0,11$,

2,04±0,45 y 2,01±0,27 g·mm/kPa·día·m², respectivamente. Observando que las películas cargadas con nanopartículas 1, 3 y 5%, no presentan diferencias significativas ($p>0,05$) respecto al control, ni entre ellas. En la Fig.13 se puede observar una reducción del 19,5, 13,2 y 14,5% del valor de PVA en relación al blanco QP cuando la película se encuentra cargada con nanopartículas al 1, 3 y 5%, respectivamente. Sin embargo, la concentración de nanopartículas no es un factor que indique diferencias significativas entre las mismas. Como ya se explicó anteriormente, la disminución del valor de PVA cuando se incorporan nanopartículas se piensa que se debe al efecto de camino tortuoso generado en la matriz (Duncan, 2011; Nobeta, 2014).

Respecto a los resultados obtenidos, Se piensa que el incremento del valor de PVA cuando se acondicionan las películas a 5°C se debe al aumento de la presión del vapor de agua que se genera a una alta H.R (Phan The et al., 2009). Debido a esto, el uso de nanopartículas resultó más eficiente para películas acondicionadas a 5°C que frente a 23°C (20% de reducción máxima de PVA frente a un 12%, respectivamente).

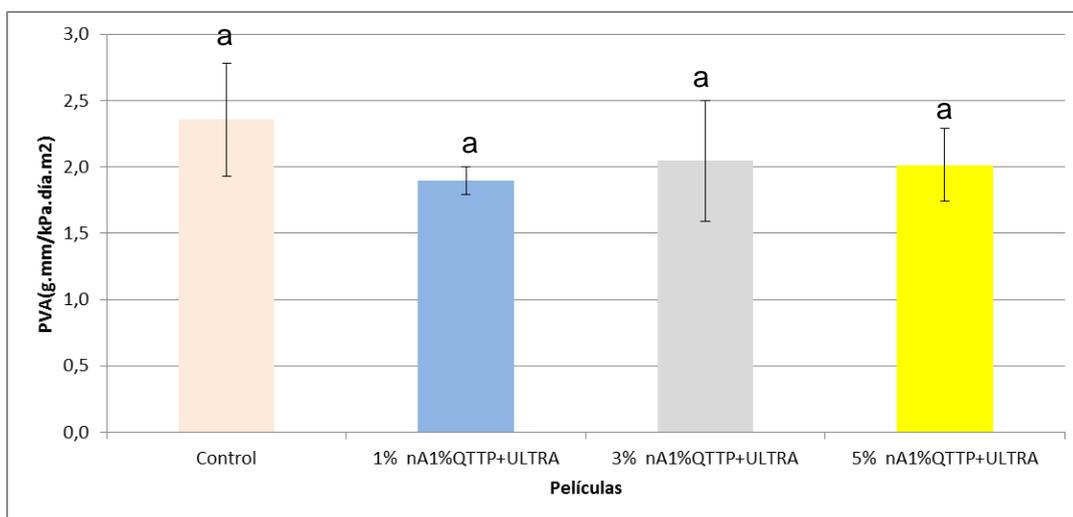


Fig.12.- Permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP), cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones. Acondicionadas a 5°C y 95 % H.R. Letras distintas indican diferencias significativas ($p<0,05$).

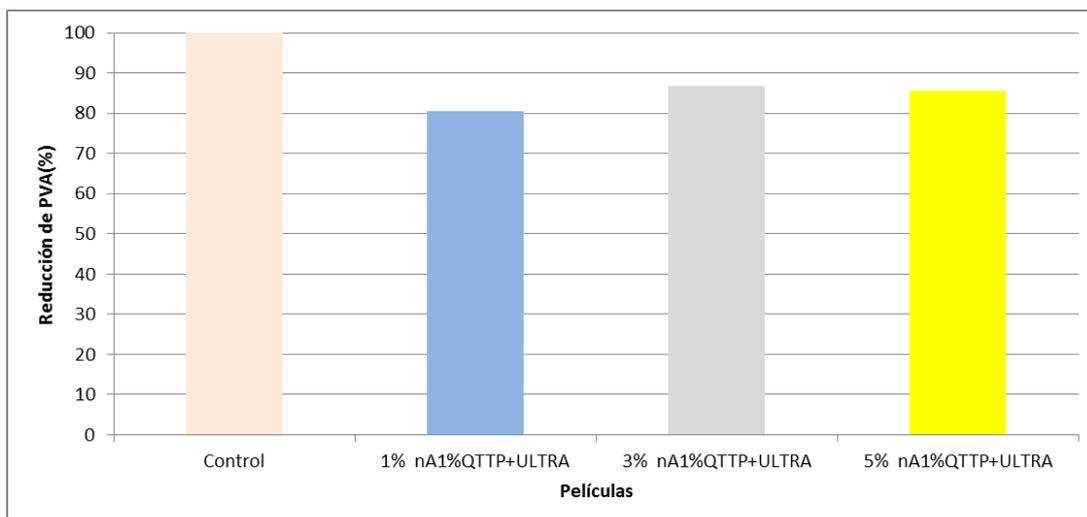


Fig.13.- Reducción de permeabilidad al vapor de agua (PVA) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas. Acondicionadas a 5°C y 95 % H.R. Donde la reducción se toma en base QP como 100 %.

3.2.5 Determinación las propiedades mecánicas: de porcentaje de alargamiento (A%) y Esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) para películas de quitosano- proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas

Se determinó el porcentaje de alargamiento (A%) y el esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) para películas de quitosano-proteína de quínoa (QP) cargadas con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA) al 1, 3 y 5% (Fig. 14 y 15). Para el A% se observa un valor de un $48,4 \pm 17,4\%$ en QP control no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) con las QP cargadas con nanopartículas a distintas concentraciones (1, 3 y 5%; $41,9 \pm 14,3$, $45,5 \pm 18,4$ y $45,3 \pm 14,4\%$, respectivamente) (Fig.14). La concentración de nanopartículas no demostró ser un factor responsable de diferencias significativas en A%. En la literatura se describen como los principales factores que afectan las propiedades mecánicas de films de quitosano la concentración y el grado de desacetilación del polímero, el solvente utilizado y el pH (Kim et al., 2006; Nobeta, 2014).

Por otro lado, para el ETR se obtiene, para QP sin nanopartículas un valor equivalente a $7,61 \pm 1,6$ N/mm² no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) con QP cargadas con 5% de nanopartículas ($7,31 \pm 1,1$ N/mm²), pero si existen diferencias con QP cargadas con nanopartículas al 1 y 3% ($6,06 \pm 0,95$ y $5,56 \pm 0,62$ N/mm², respectivamente) (Fig.15). Se deduce que la incorporación

de 5 y 10% de nanopartículas a los films afectan el comportamiento mecánico de los mismos por constituir un porcentaje mayor del polímero que los vuelve más rígidos y más resistentes, pero menos elásticos (Kim et al., 2006; Nobeta 2014; Savé, 2011; Valenzuela et al., 2013).

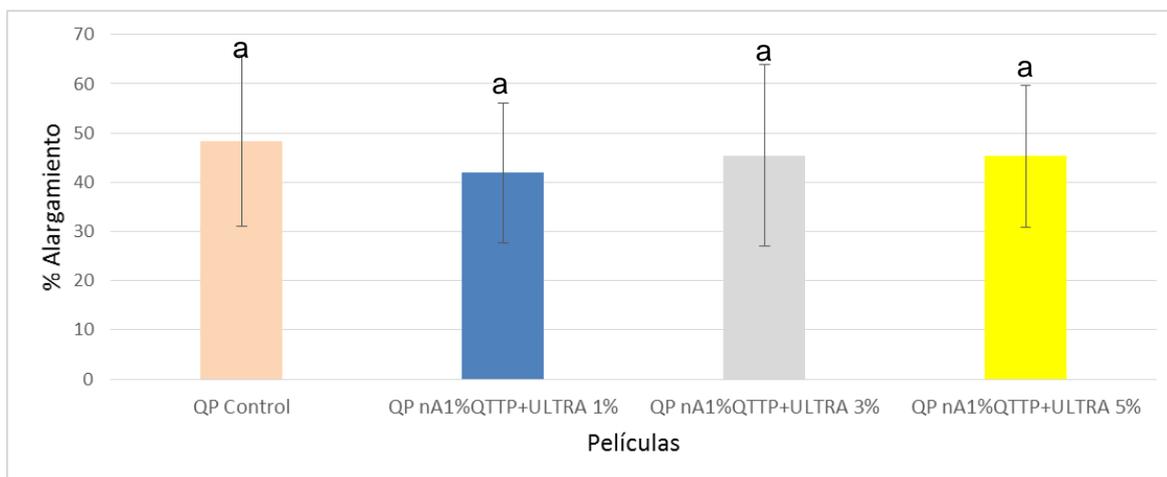


Fig.14.- Porcentaje de alargamiento (A%) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP), cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones. Acondicionadas a 23°C-60 % H.R. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

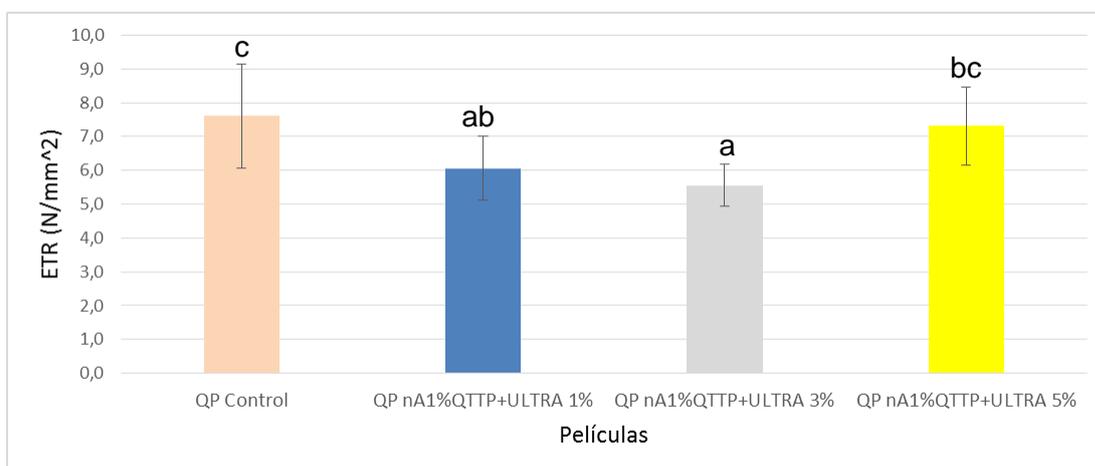


Fig.15.- Esfuerzo de tracción a la ruptura (ETR) vs tipo de películas de quitosano-proteína de quínoa (QP), cargadas con nanopartículas a diferentes concentraciones. Acondicionadas a 23°C-60 % H.R. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

3.3 Aplicación de películas comestibles a frutillas frescas y evaluación de su efectividad

Las películas comestibles seleccionadas fueron las cargadas a un 5% de nanopartículas, ya que a esa concentración presenta la mayor reducción de permeabilidad al vapor de agua (PVA) ya que en los otros parámetros prácticamente no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) respecto al control. Esta película fue aplicada a frutillas con el fin de aumentar su vida útil durante el tiempo de almacenamiento (16 días), para esto se realizaron análisis fisicoquímicos, microbiológicos, propiedades mecánicas y evaluaciones sensoriales.

3.3.1 Recubrimientos de quitosano sin nanopartículas y con nanopartículas al 5% (nA1%QTTP + ULTRA) en frutillas y evaluación de la vida útil de las frutillas durante el almacenamiento refrigerado

3.3.2 Formación de las películas sobre la superficie de las frutillas

En la Fig.16 se presentan las imágenes obtenidas por microscopía óptica que evidencian la formación de las películas en la superficie de las frutillas los días 0 y 16 de almacenamiento. En donde la muestra se congeló durante 24h a -18°C y se realizaron cortes de tejido de $\approx 0,1\text{mm}$ de espesor, en donde se observó mediante microscopio óptico la formación de una película en la superficie de las frutillas recubiertas con películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa sin nanopartículas (Mezcla (M) (b-e)), y cargadas con nanopartículas (nA1%QPPT+ULTRA) al 5% (Mezcla 5% SFL (S) (c-f)). Las muestras se encontraban almacenadas en condiciones de 5°C y 95% H.R. que es una condición buena para el almacenamiento de frutillas (Mitchell et al., 1996). Respecto a los espesores de las películas aplicadas en la frutillas no presentaron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$) en el día 0 de almacenamiento, encontrándose para la Mezcla (M) un valor de $389\ \mu\text{m}$ y para la Mezcla 5% SFL (S) de $392\ \mu\text{m}$. El cual varío significativamente ($p < 0,05$) al día 16 de almacenamiento (Mezcla (M): $162\ \mu\text{m}$ y para Mezcla 5% SFL (S): $288\ \mu\text{m}$) presentando diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambas. Pero es importante contemplar los 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 fruto (Hagenmaier y Baker, 1995; Valenzuela, 2012).

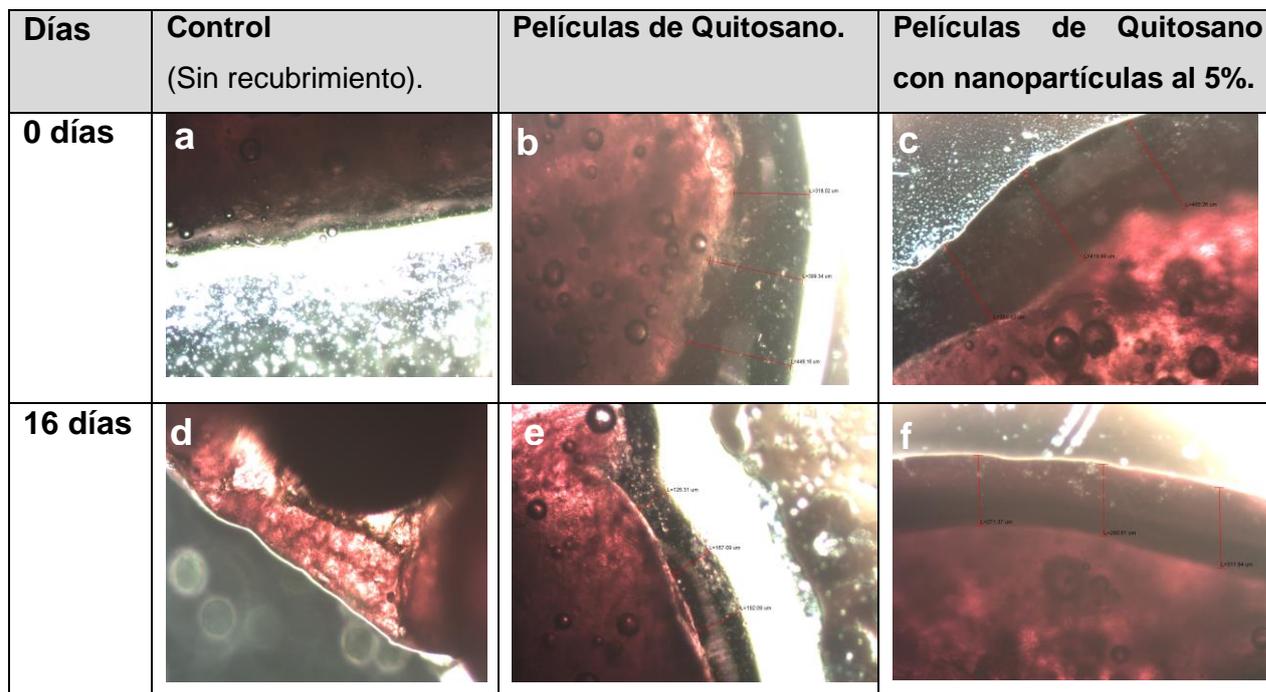


Fig.16.- Formación de películas de quitosano sin nanopartículas y con nanopartículas al 5% (nA1%QTTP+ULTRA) en la superficie de las frutillas recubiertas a los días 0 (a-c) y 16 (d-f) de almacenamiento. Observadas en microscopio óptico 40x.

3.3.3 Pérdida de peso en frutillas recubiertas durante el almacenamiento

La pérdida de peso de las frutas se relaciona en mayor medida con sus procesos metabólicos propios (eliminación de CO₂, vapor de H₂O y aromas volátiles), donde se ve reflejado en la pérdida de agua durante el tiempo de almacenamiento.

En la Fig. 17 se presenta el porcentaje de pérdida de peso (%PP) expresada en porcentaje de peso relativo al peso inicial de las frutillas control y recubiertas con películas durante el almacenamiento. En relación al efecto del almacenamiento se observa en la Fig.17 que el %PP se incrementó significativamente en cada día de análisis ($p < 0,05$), independiente del tratamiento utilizado. Respecto al efecto de los recubrimientos sobre el %PP, se observa que durante todo el tiempo de almacenamiento las muestras recubiertas con películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa (Mezcla (M)), y cargadas con nanopartículas (nA1%QPPT+ULTRA) al 5%

(Mezcla 5% SFL (S)) no existió diferencias significativas ($p>0,05$) en su pérdida de peso. Pero si se observan diferencia significativa ($p<0,05$) con respecto a las muestras sin recubrimientos (Control (C)) durante todo el tiempo de almacenamiento. En el día 5 de almacenamiento la muestra sin recubrimiento presentan un %PP de 11%, mientras que las muestras recubiertas un alrededor de un 6,5% aprox. Durante el día 10 la muestra sin recubrimiento (Control (C)) posee un valor de %PP de 22% mientras que las muestras recubiertas alrededor de un 13%. Y al día 16 la muestra control reduce su peso en un 36,1%, mientras que las muestras recubiertas presentar un disminución de un 21%. De lo que se deduce que el uso de recubrimientos disminuyen significativamente ($p<0,05$) la pérdida de peso de las muestras durante el tiempo de almacenamiento. En otros trabajos en los que se han recubierto frutillas con mezclas principalmente basadas en hidrocoloides no se ha observado un efecto significativo sobre la disminución del %PP de las frutas (Han et al., 2004; Hernández-Muñoz et al., 2008; Valenzuela, 2012). En los análisis a las películas aisladas, la película de quitosano-concentrado de proteína de quínoa (Mezcla (M)) no mostro diferencias significativas ($p>0,05$) con respecto a las películas cargadas con nanopartículas (Mezcla 5% SFL (S)) en su PVA. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en las muestras, donde las películas que poseen nanopartículas si bien no presentan diferencias significativas ($p>0,05$) tienden a tener menor pérdida de agua.

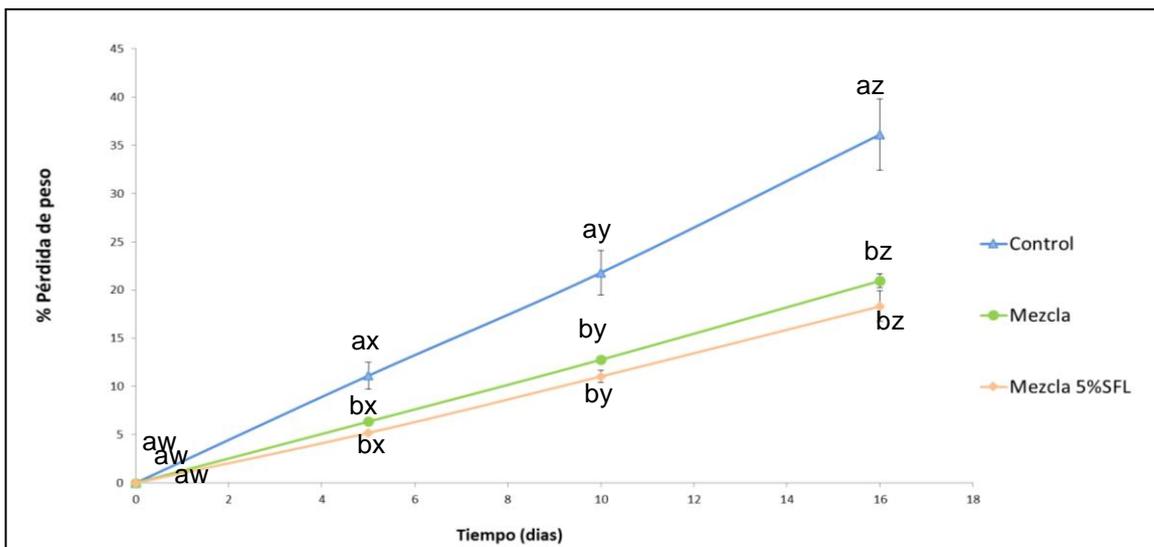


Fig.17.- % Pérdida de peso v/s Tiempo de almacenamiento (d) de la fruta almacenadas a 5°C y 95% H.R. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con

película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras (a-b) y en el tiempo de almacenamiento (w-z).

3.3.4 Recuento de hongos y levaduras en frutillas recubiertas durante el almacenamiento

En la Fig.18 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 control (Control (C)) y recubiertas con películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa (Mezcla (M)), y películas quitosano-concentrado de proteína de quínoa cargadas con nanopartículas (nA1%QPPT+ULTRA) al 5% (Mezcla 5% SFL (S)) durante el almacenamiento medido en días a 5°C y 95% H.R. Se observa que durante todo el período de almacenamiento las frutillas recubiertas presentaron siempre una menor carga de hongos y levaduras comparadas con las frutillas control. En el día 0 de almacenamiento las frutillas control presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) con un recuento de hongos y levaduras de 1,8 log UFC/g, en comparación a las recubiertas, encontrándose dentro de los límites de consumo aceptable para frutas frescas, estimados en UFC/g de muestra (RSA, 2014).

Para el día 5 de almacenamiento el recuento de hongos y levaduras no aumentó significativamente respecto al día 0 ($p > 0,05$) para las muestras sin recubrimiento (Control (C) 1,9 log UFC/g), ni para las muestras recubiertas con nanopartículas al 5% (Mezcla 5% SFL (S) 0,8 log UFC/g). Pero si existieron diferencias significativas ($p < 0,05$) con las muestras recubiertas con películas sin nanopartículas (Mezcla (M) 2,0 log UFC/g). De lo que se observa que las frutillas recubiertas con película adicionada con nanopartículas al 5% (nA1%QPPT) presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control sin recubrimiento (Control (C)) y a la película sin nanopartículas (Mezcla (M)). Sin embargo, todas las muestras se encontraron dentro de los límites aceptables de consumo (RSA, 2014).

En el día 10 de almacenamiento el recuento de hongos y levaduras aumentó significativamente ($p < 0,05$), respecto al día 5 para las muestras sin

recubrimiento (Control (C) 3,0 log UFC/g), pero no para las muestras recubiertas con y sin nanopartículas (Mezcla 5% SFL (S) 1,0 log UFC/g y Mezcla (M) 1,4 log UFC/g). Sin embargo, al día 10 de almacenamiento las frutillas control exceden el límite máximo permitido para su consumo, mientras que las muestras recubiertas son seguras aún para el consumo (RSA, 2014).

Finalmente, para el día 16 de análisis, el recuento de hongos y levaduras aumentó significativamente respecto al día 10, para todas las muestras no considerándose aptas para su consumo (Fig.19) (RSA, 2014).

La tendencia general del análisis fue que efectivamente las frutillas recubiertas con películas que poseen nanopartículas generaron una protección antifúngica que se reflejó en una disminución significativa ($p < 0,05$) del recuento de hongos y levaduras totales, respecto de las frutillas control a 5°C y 95% H.R.

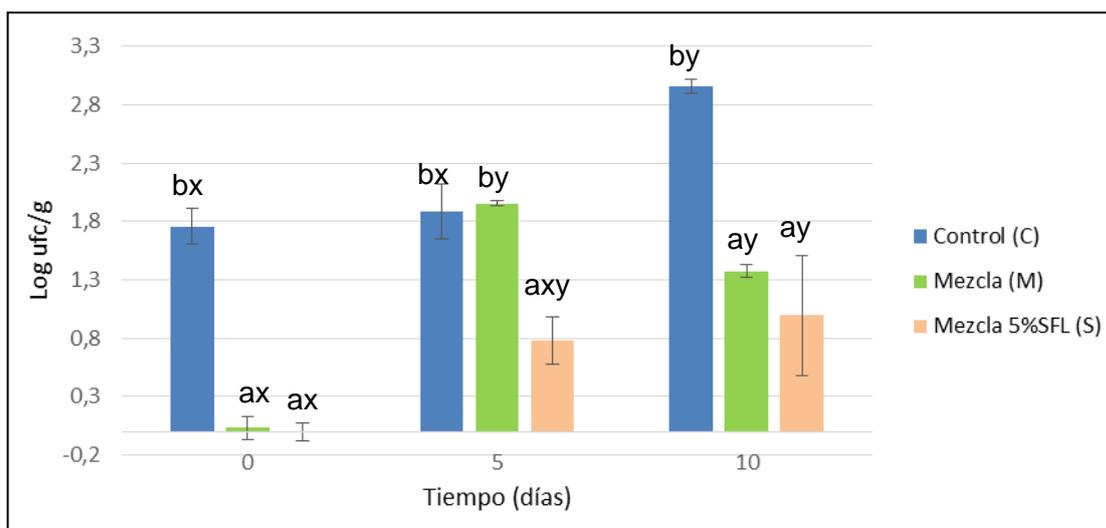


Fig.18.- Recuento total de hongos y levaduras de frutillas control y recubiertas con películas a 5°C y 95% H.R. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP)). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras (a-b) y en el tiempo de almacenamiento (x-y).

3.3.5 Decaimiento fúngico de las frutillas control y recubiertas durante el almacenamiento

En la Fig.19 se muestra que al tiempo 0 y 5 días de almacenamiento ninguna de las muestras poseen un deterioro visual apreciable. Sin embargo, en el día 10 de almacenamiento las muestras sin recubrimiento y con recubrimiento sin nanopartículas adicionadas, presentan un deterioro (crecimiento de hongos de un 20% aprox.), comenzando este el día 8 de almacenamiento. Lo que concuerda con la duración promedio de éstas frutas en las condiciones utilizadas en estos ensayos donde se ha descrito entre 7 a 10 días (Mitchell et al., 1996). Sin embargo, las frutillas que poseían un recubrimiento cargadas con nanopartículas al 5% (Mezcla 5% SFL (S)) aún no presentaron un crecimiento fúngico que impida su consumo, lo que se ve reflejado en el análisis microbiológico realizado (sección 3.3.4). Estas mostraron deterioro apreciable al día 12 de almacenamiento, de lo que se puede deducir que existió un aumento de un 50% de vida útil, respecto a las muestras sin recubrir. La protección antifúngica de recubrimientos basados en mezclas de quitosano y otros polímeros sobre la contaminación natural de frutillas se ha descrito en varios estudios (Han et al., 2004; Hernández-Muñoz et al., 2006; Hernández-Muñoz et al., 2008; Valenzuela, 2012).

Tiempo (días)	Control (C)	Mezcla (M)	Mezcla 5% SFL (S)
0			
5			
10			
16			

Fig.19.- Esquema de la apariencia de frutillas control y recubiertas con películas en función del tiempo de almacenamiento a 5°C y 95% H.R. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)).

3.3.6 Variación de la Firmeza de frutillas control y recubiertas durante el almacenamiento

En la Fig. 20 se presenta la variación de la firmeza (N) medidas en el equipo Lloyd según metodología descrita por Hernández-Muñoz et al. (2008) a las frutillas control y recubiertas con películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa sin nanopartículas (Mezcla (M)), y cargadas con nanopartículas (nA1%QPPT+ULTRA) al 5% (Mezcla 5% SFL (S)) durante el tiempo de almacenamiento (días). En ella se puede observar que al tiempo 0, 10 y 16 días, no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) de las muestras con recubrimiento (Mezcla (M) y Mezcla 5% SFL (S)), con respecto a las sin recubrir (Control (C)) sobre la firmeza de las frutillas. Sin embargo, en el tiempo 2 (5 días de almacenamiento) las muestras recubiertas (Mezcla (M): $1,50 \pm 0,76$ N y Mezcla 5% SFL (S): $1,65 \pm 0,57$ N) presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a las muestras sin recubrir (Control (C): $1,16 \pm 0,47$ N). Como en otros estudios, en los cuales se recubrieron frutillas con películas elaboradas en base a quitosano en combinación con gluconato de calcio (CaGlu) en diferentes proporciones, se reportaron resultados positivos, en la mejora de la firmeza de las frutillas, debido al aporte de CaGlu a la pared celular (Ribeiro et al., 2007; Hernández-Muñoz et al., 2008).

Respecto al efecto del almacenamiento sobre la firmeza de las frutillas se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) de la firmeza desde el día 0 al día 16 de almacenamiento (Fig. 20), independiente del tratamiento realizado en las frutillas (Vargas et al., 2006). Como la pérdida de la firmeza de las frutillas es uno de los factores que limitan su calidad y tiempo de almacenamiento poscosecha, cabría la posibilidad de agregar a las películas sustancias capaces de disminuir o alterar los procesos degradativos de la pared celular (Lara et al., 2004).

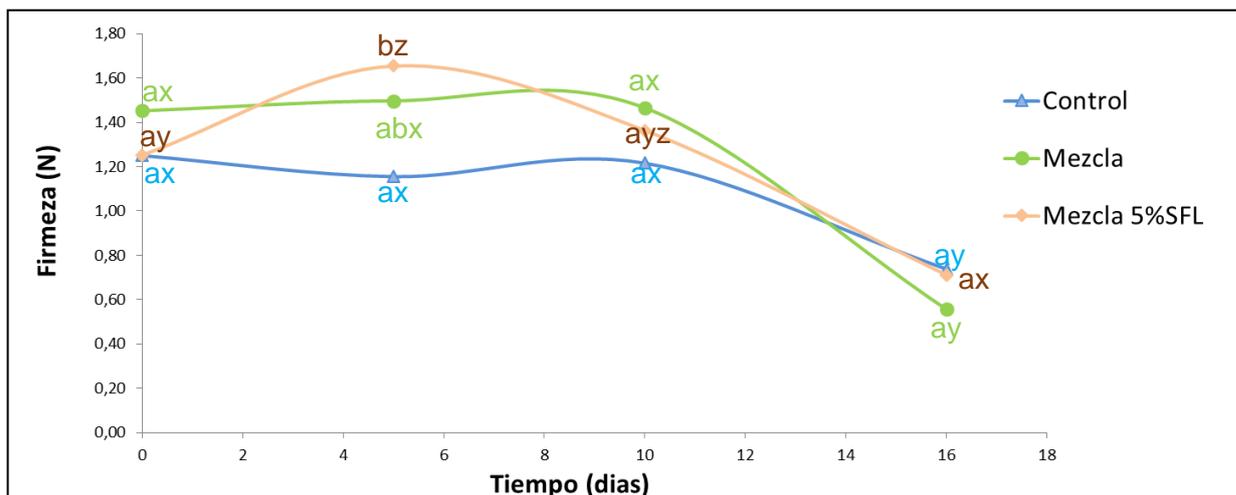


Fig. 20.- Firmeza (N) v/s tiempo de almacenamiento a 5°C y 95% H.R. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras (a-b) y en el tiempo de almacenamiento (x-z).

3.3.7 Variación de pH, acidez titulable (AT), °Brix e índice de madurez (IM) de frutillas control y recubiertas durante el almacenamiento.

En la **Tabla 8** se presenta la variación de pH, acidez titulable, °Brix e índice de madurez del jugo obtenido de las frutillas control y recubiertas con y sin nanopartículas durante el almacenamiento. En la tabla se puede observar que en °Brix y pH no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras sin recubrimiento y las muestras con recubrimiento (Mezcla (M) y Mezcla 5% SFL (S)) en ningún tiempo de almacenamiento. Respecto al índice de madurez solo al día 16 de almacenamiento, las muestras que se encontraban recubiertas con nanopartículas (Mezcla 5% SFL (S): $9,45b \pm 0,34$) mostraron diferencias significativas respecto a las sin recubrir y a las recubiertas (Control (C): $7,77 \pm 0,83$ y Mezcla (M): $7,51 \pm 0,92$). Y respecto a la acidez titulable solo en el día 0 de almacenamiento se pueden observar diferencias significativas entre la muestra sin recubrir y aquellas con recubrimiento, no encontrándose diferencias significativas ($p > 0,05$) a lo largo del tiempo de almacenamiento posterior. Los resultados obtenidos coinciden con gran parte de los trabajos en donde se han recubierto frutillas con diferentes tipos de películas comestibles, y se reporta no haber encontrado diferencias entre la fruta control y las recubiertas para los parámetros antes

mencionados, como tampoco en la medida que avanza el almacenamiento, atribuyendo este comportamiento al carácter no climatérico de éstas frutas (Han et al., 2004; Hernández-muñoz, 2006; Vargas et al., 2006; Valenzuela, 2012).

Tabla 8.- pH, acidez titulable (AT), °Brix e índice de madurez (IM) del jugo obtenido de las frutillas control y recubiertas con películas 5°C y 95% H.R.

Muestras	°Brix			
	Tiempo 1 (0 días) Media±DE (n=3)	Tiempo 2 (5 días) Media±DE (n=3)	Tiempo 3 (10 días) Media±DE (n=3)	Tiempo 4 (16 días) Media±DE (n=3)
Control	9,33 ^{ax} ± 1,21	9,80 ^{ax} ± 1,05	8,90 ^{ax} ± 1,37	8,27 ^{ax} ± 0,57
Mezcla	8,80 ^{ax} ± 0,92	9,05 ^{ax} ± 0,05	9,10 ^{ax} ± 0,79	8,67 ^{ax} ± 0,81
Mezcla 5%SFL	8,73 ^{ax} ± 1,50	9,63 ^{ax} ± 1,24	10,1 ^{ax} ± 0,12	8,93 ^{ax} ± 0,70
pH				
Control	3,30 ^{ay} ± 0,08	3,26 ^{axy} ± 0,07	3,23 ^{axy} ± 0,09	3,15 ^{ax} ± 0,06
Mezcla	3,36 ^{ax} ± 0,11	3,23 ^{ax} ± 0,04	3,25 ^{ax} ± 0,07	3,25 ^{ax} ± 0,18
Mezcla 5%SFL	3,28 ^{ax} ± 0,13	3,25 ^{ax} ± 0,10	3,34 ^{ax} ± 0,10	3,21 ^{ax} ± 0,03
Acidez Titulable (AT)				
Control	1,08 ^{bxy} ± 0,09	0,96 ^{ax} ± 0,06	1,11 ^{ay} ± 0,02	1,07 ^{abxy} ± 0,10
Mezcla	0,86 ^{ax} ± 0,03	0,98 ^{ax} ± 0,01	1,35 ^{ax} ± 0,63	1,16 ^{bx} ± 0,10
Mezcla 5%SFL	0,92 ^{ax} ± 0,07	0,94 ^{ax} ± 0,12	0,99 ^{ax} ± 0,14	0,94 ^{ax} ± 0,04
Índice de Madurez (IM)				
Control	8,65 ^{axy} ± 0,73	10,2 ^{ay} ± 0,81	8,05 ^{ax} ± 1,41	7,77 ^{ax} ± 0,83
Mezcla	10,3 ^{ax} ± 1,3	9,20 ^{ax} ± 0,09	7,75 ^{ax} ± 0,3,43	7,51 ^{ax} ± 0,92
Mezcla 5%SFL	9,61 ^{ax} ± 2,35	10,4 ^{ax} ± 2,61	10,3 ^{ax} ± 1,43	9,45 ^{bx} ± 0,34

(*) Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras (a-b) y en el tiempo de almacenamiento (x-y).

3.3.8 Análisis sensorial

3.3.8.1 Test de Karlsruhe

Se observa en la **Tabla 10** para el día 0 de almacenamiento no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre las muestras entre ningún parámetro evaluado. Lo mismo ocurre en el día 5 de almacenamiento en todos los parámetros evaluados excepto en olor donde existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre la muestra no recubierta (Control (C): 8,1 promedio) y la recubierta sin nanopartículas (Mezcla (M): 7,1 promedio), pero no hubo diferencias significativas entre la muestra sin recubrir y la recubierta con nanopartículas (Mezcla 5% SFL (S): 7,8 promedio). Por lo que se puede decir que los panelistas no encontraron ninguna diferencia significativa ($p > 0,05$) entre las muestras sin recubrir y las recubiertas que contenían adicionadas nanopartículas. De igual forma para el día 12 de almacenamiento no se evaluó sabor ya que la muestra control excedía el límite microbiológico permitido para el consumo (RSA, 2014). Pero solo existió diferencias significativas ($p < 0,05$) en el parámetro olor entre las muestras Control (C) (6,1 valor promedio) y la Mezcla 5% SFL (S) (7,1 valor promedio). Esto se explica ya que la muestra sin recubrir ya presentaba un deterioro visible, mientras que la recubierta cargada con nanopartículas al 5%, comenzaba levemente a deteriorarse (Fig. 19).

Para el grado de calidad asignado a cada muestra después de la evaluación sensorial para el día 0, podemos observar (**Tabla 9**), que el valor promedio más bajo de las tres muestras: Control (C): 7,1, Mezcla (M): 7,5, Mezcla 5% SFL (S): 7,3) encontrando dentro del rango grado I (Rango: 7,0- 9,0), lo que nos indica que son productos que están aptos para su comercialización (límite de comercialización 5,5) de igual manera sucede en el día 5 de almacenamiento. Finalmente en el día 12 de almacenamiento las muestras recubiertas con nanopartículas al 5% (Mezcla 5% SFL (S): 6,1 valor promedio), dentro del grado II, pero es la única aceptable para su comercialización, lo que concuerda con los resultados obtenidos en trabajos similares (Valenzuela, 2012).

Tabla 9.- Grado de calidad asignado a cada muestra después de la evaluación sensorial en el día 0, 5 y 12 de almacenamiento de la fruta. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)).

Muestras	Día 0		Día 5		Día 12	
	Promedio de la Calidad total	Grado	Promedio de la Calidad total	Grado	Promedio de la Calidad total	Grado
Control (C)	7,1	I	7,9	I	5,2	II
Mezcla (M)	7,5	I	7,5	I	3,3	III
Mezcla 5%SFL (S)	7,3	I	7,6	I	6,1	II

Rangos para la asignación del grado de calidad

- Grado de calidad 1: 7- 9
- Grado de calidad 2: 4 - 6,9
- Grado de Calidad 3: 1-3,9

Tabla 10.- Resumen de diferencias entre las tres muestras, para cada parámetro, mediante el Test de Tukey efectuado para las muestra. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)).

Parámetros	Día 0	Día 5	Día 12
	Diferencias entre Muestras (*)	Diferencias entre Muestras (*)	Diferencias entre Muestras (*)
Color Externo	C ^a M ^a S ^a	C ^a M ^a S ^a	C ^a M ^a S ^a
Color Interno	C ^a M ^a S ^a	C ^a M ^a S ^a	C ^b M ^a S ^b
Apariencia/Forma	C ^a M ^a S ^a	C ^a M ^a S ^a	C ^a M ^a S ^a
Olor	C ^a M ^a S ^a	C ^c M ^a S ^{ac}	C ^a M ^a S ^b
Sabor	C ^a M ^a S ^a	C ^a M ^a S ^a	---
Textura	C ^a M ^a S ^a	C ^a M ^a S ^a	C ^a M ^a S ^a

(*) Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05).

3.3.8.2 Test de escala lineal no estructurada

En la en la Fig. 21 se pueden observar los gráficos obtenidos del análisis sensorial de las frutillas control y recubiertas con y sin nanopartículas durante un período de almacenamiento de 12 días (ya que todas las muestras presentaban un deterioro visible al día 16).

De acuerdo con los resultados obtenidos en el tiempo 0 de almacenamiento no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en los parámetros de apariencia, acidez, aroma a fermentado y color interno, para ninguna de las 3 muestras. Esto se explica debido a que no se podía detectar a simple vista las muestras que se encontraban recubiertas. Lo mismo sucede en el día 5 de almacenamiento en los parámetros de apariencia, aroma (frescura y fermentado) y color (externo e interno). Pero si hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en textura tanto para dureza en boca y tacto de la muestra recubierta sin nanopartículas (Mezcla (M)) con respecto a la muestra sin recubrir (Control (C)) y la recubierta cargada con nanopartículas (Mezcla 5% SFL (S)) en el día 0. Mientras que en ambas no existieron diferencias significativas ($p > 0,05$). Respecto al parámetro frescura existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras con recubrimiento (Mezcla (M): 3,0 promedio y Mezcla 5% SFL (S): 3,4 promedio) y la sin recubrir (Control (C): 2,1 promedio). Lo mismo sucede con el parámetro de color externo (Mezcla (M): 7,4 promedio, Mezcla 5% SFL (S): 7,7 promedio y Control (C): 6,6 promedio). Y en sabor a fermentado se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre todas las muestras. En el día 5 de almacenamiento se encuentran diferencias significativas ($p < 0,05$) en acidez y dureza en boca para todas las muestras. Mientras que en dureza en boca la muestra recubierta con nanopartículas presenta diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a las muestras sin recubrir y a las recubiertas sin nanopartículas. Y en el día 12 de almacenamiento no hay diferencias significativas en dureza al tacto y color interno. Cabe recordar que una mejor evaluación no significa que es mejor, estos valores solo indican la evaluación característica del producto, como su huella digital (Fig.21).

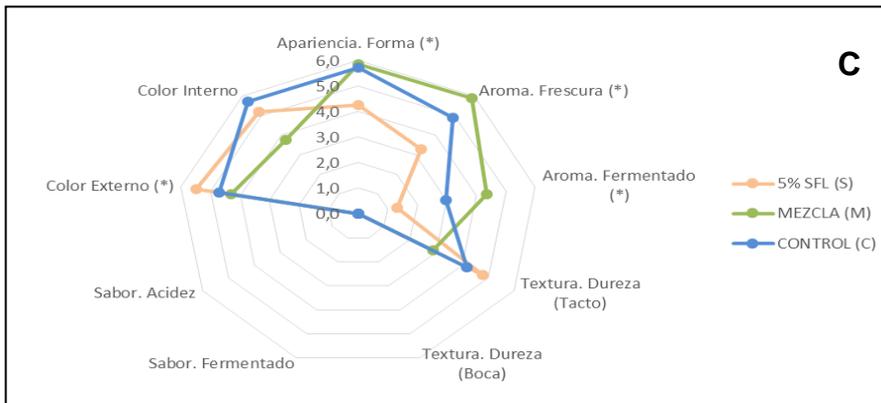
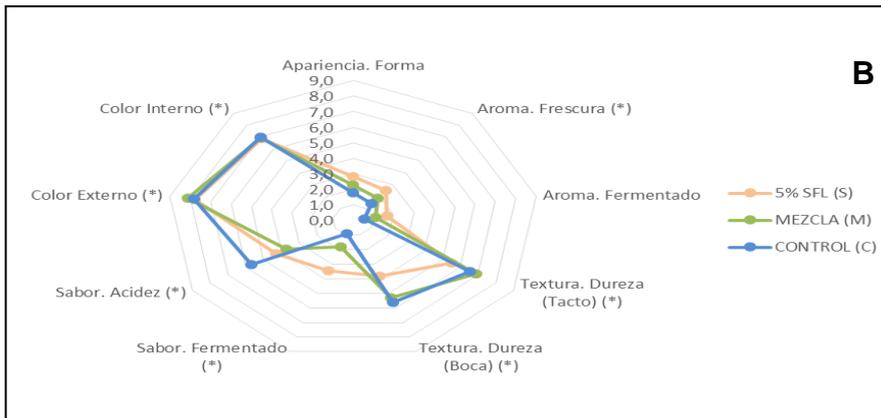
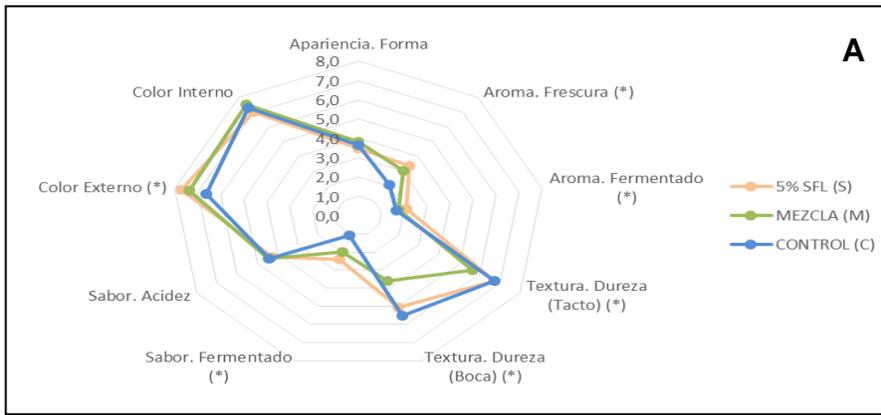


Fig. 21.- Gráficos representativos de los resultados obtenidos. De los días 0 (A), 5 (B) y 12 (C) de almacenamiento. (Control (C): fruta sin película, Mezcla (M): fruta con película de quitosano, Mezcla 5% SFL (S): fruta con película de quitosano cargada al 5% con nanopartículas (nA1%QTTP+ULTRA)). (*)Indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

4 Conclusiones

- Mediante la técnica Spray Freezing in Liquids se logró fabricar nanopartículas de quitosano/ác.acético-terbutanol-timol-pluronic F127 que mediante ultrasonido, se alcanzaron tamaños bajo los 300 nm y potenciales Z de 20 mV. Y nanopartículas quitosano-terbutanol-timol-pluronic F127-trehalosa a distintas concentraciones con tamaños entre 337 - 425 nm y potenciales Z mayores a 30 mV.
- El uso de trehalosa en las nanopartículas (nQTTPT 1%, 2% y 3%) reduce significativamente el tamaño en comparación de nanopartículas sin este. Pero también reduce la cantidad de activo que se logra encapsular pudiéndose producir una competencia entre el activo y el agente crioprotector por las nanopartículas.
- Se triplico el porcentaje de capacidad de carga de timol con la incorporación de ácido acético 1% en la solución de quitosano 0,3% p/v, en relación a la utilización de ácido cítrico en esta solución.
- Todas las formulaciones de nanopartículas sometidas a ultrasonido siempre presentaron tamaños menores de 300 mn sin importar su composición y presentaron una gran estabilidad en el tiempo.
- La permeabilidad al vapor de agua de las diferentes películas no mostraron diferencias significativas entre ellas. Pero se pudo observar una reducción entre 12 y 20% del valor de PVA cuando la película se encuentra cargada con nanopartículas. El uso de nanopartículas resultó más eficiente para películas acondicionadas a 5°C que frente a 23°C, lográndose un 20% de reducción máxima de PVA en relación al control.
- La incorporación de nanopartículas a las películas comestibles no afectaron sus propiedades mecánicas.

- Las frutillas recubiertas con la película cargada con nanopartículas en comparación a las controles presentaron una menor recuento y crecimiento de hongos y levaduras, aumentando la vida útil en un 50% respecto al control.
- En el análisis sensorial la aplicación de las películas en frutillas no alteró los parámetros de calidad, presentando una mejor apariencia las frutillas recubiertas con película cargada con nanopartículas, no siendo detectadas por los jueces con respecto al control.
- En el porcentaje de pérdida de peso se observa que las muestras recubiertas con películas de quitosano-concentrado de proteína de quínoa y cargadas con nanopartículas al 5% no existieron diferencias significativas, pero si se observan diferencia significativa con respecto a las muestras control sin recubrir. Al día 16 la muestra control reduce su peso en un 36,1%, mientras que las muestras recubiertas presentar un disminución de un 21%. De lo que se deduce que el uso de recubrimientos disminuyen significativamente la pérdida de peso de las muestras durante el tiempo de almacenamiento.
- Utilizar películas comestibles biodegradables resulta beneficioso para extender la vida poscosecha de productos frutícolas. Siendo de suma importancia procurar avanzar con trabajos a escala industrial para poder lograr su transferencia tecnológica.

5 Bibliografía

- Abdelwahed, W., Degobert, G., Stainmesse, S., Fessi, H. (2006). "Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations". *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1688–1713.
- Abugoch, L. E. (2009). "Chapter 1 Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): Composition, Chemistry, Nutritional, and Functional Properties". *Advances in Food and Nutrition Research*, Volume 58. pp. 1-31.
- Abugoch, L. E., Tapia, C., Villamán, M. C., Yazdani-Pedram, M., & Díaz-Dosque, M. (2011). "Characterization of quinoa proteinechitosan blend edible films". *Food Hydrocolloids*, 1-8.
- Aider, M. (2010). "Chitosan application for active bio-based films production and potential in the food industry: Review. *LWT*" - *Food Science and Technology* 43.837–842
- Akbari, B., Pirhadi, M., & M., Z. (2011). "Particle size characterization of nanoparticles: A practical approach". *Iranian Journal Of Material Science and Engineering*, 8(2), 48-56.
- AOAC (1996). "Official Methods of Analysis of AOAC International (16th ed.)". Gaithersburg, USA: AOAC International.
- Araujo, V., Gamboa, A., Caro, N., Abugoch, L., Gotteland, M., Valenzuela, F., Merchant, H. A., Basit, A. W., Tapia, C. (2013). "Release of prednisolone and inulin from a new calcium-alginate chitosan-coated matrix system for colonic delivery". *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volume 102. Issue 8. 2748–2759.
- Arvanitoyannis, I. and Gorris, L. (1999). "Edible and biodegradable polymeric materials for food packaging or coating". In F. Oliveira J. Oliveira M. Hendrickx D. Knorr and L. Gorris (eds), *Processing Foods-Quality Optimization and Process Assessment*. pp 357-370. Boca Raton, FL: CRC Press.
- 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.
- Bourtoom, T. (2008). "Review Article: Edible films and coatings: characteristics and properties". *International Food Research Journal*, 15, 237-248
- Brinegar, C., Goundan, S. (1993). "Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of quinoa (*Chenopodium quinoa*)". *J. Agric. Food Chem.* 41, 182–185.
- 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.
- Chenite, A.; Chaput, C.; Wang, D.; Combes, C.; Buschmann, M.; Hoemann, C.; Leroux, J.; Atkinson, B.; Binette, F. and Selmani, A. (2000). "Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ". *Biomaterials* 21, 21, 2155-2161.
- Chung, Y. C., Su, Y. P., Chen, C. C., Jia, G., Wang, H. I., Wu, J. C. G., & Lin, J. G. (2004). "Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall". *Acta Pharmacologica Sinica*, 25(7), 932-936.
- Davidson, P. M y Branen, A. L. (1993). "Antimicrobials in foods". Marcel Dekker, Inc., New York. pp.95 - 136.
- Debeaufort, F., Quezada-Gallo, J. and Voilley, A. (1998). "Edible films and coatings: tomorrow's packings: A review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38(4), 299-313.
- De Moura, M., Aouada, F., Avena-Bustillos, R., McHugh, T., Krochta, J., & Mattoso, L. (2009). "Improved barrier and mechanical properties of novel hydroxypropyl methylcellulose edible films with chitosan/tripolyphosphate nanoparticles". *Journal of Food Engineering*, 92, 448–453.

- Duncan, T.V. (2011). "Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors". *Journal of Colloid and Interface Science*. Volume 363. Issue 1, 1–24.
- Engstrom, J. D., Simpson, D. T., Cloonan, C., Lai, E. S., Williams, R. O., Kitto, G. B., & Johnston, K. P. (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.
- 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.
- Falguera, V., Quintero, J.P., Jiménez, A., Muñoz, J.A., Ibarz, A. (2011). "Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use". *Trends Food Sci. Technol.* 22, 292-303.
- Gamboa, A. (2011). "Fabricación de nanopartículas de Quitosano-Triclosán por medio de la técnica SFL Pasantía de posgrado". Universidad de Chile. Santiago-Chile.
- García, M., Martino, M. and Zaritzky, N., (1998). "Plasticized starchbased coatings to improve strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality and stability". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 3758-3767.
- Giovannoni, J. (2001). "Molecular biology of fruit maturation and ripening". *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52, 725-749.
- 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.
- Guarda, A., Rubilar, J., Miltz, J., & Galotto, M. J. (2011). "The antimicrobial Activity of Microencapsulated Thymol and Carvacrol". *International Journal of Food Microbiology* , 7.
- Hagenmaier, R. and Baker, R. (1995). "Layered coatings to control weight loss and preserve gloss of citrus fruit". *HortScience* 30, 296-298.
- Han, C., Zhao, Y., Leonard, S. and Traber, M. (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, 67-78.
- Hanaor, D., Michelazzi, M., Leonelli, C., Sorrell, C.C. (2011). "The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO₂". *Journal of the European Ceramic Society.* 32, 235–244.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Del Valle, V., Velez, D. and Gavara, R. (2008). "Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality during refrigerated storage". *Food Chemistry* 110, 428-435.
- Hernández-Muñoz, P., Almenar, E., Ocio, M. and Gavara, R. (2006). "Effect of calcium dips and chitosan coatings on postharvest life of strawberries (*Fragaria x ananassa*)". *Postharvest Biology and Technology* 39, 247-253.
- Hosseinzadeh, H., Atyabi, F., Dinarvand, R., Ostad S.N. (2012). "Chitosan–Pluronic nanoparticles as oral delivery of anticancer gemcitabine: preparation and in vitro study". *Int. J. Nanomedicine.* 7. 1851–1863.
- Hu, J.H., Johnston, K.P., Williams III, 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. 295–303.
- Jiménez, A., Fabra, M., Talens, P. and 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, 302-310.

- Jiménez, A., Fabra, M., Talens, P. and Chiralt, A. (2010). "Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids". *Carbohydrate Polymers* 82, 585-593.
- Keawchaoon, 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.
- Kim, 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.
- Kim, I-Y., Seo, S-J., Moon, H-S., Yoo, M-K., Park, I-Y., Kim, B-C., Cho, C-S. (2008). "Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications". *Biotechnology Advances*. 26. 1-21.
- Krochta, J. (2002). "Proteins as raw materials for films and coatings: definitions, current status, and opportunities, In A". Gennadios (ed), *Protein Based Films and Coatings*. pp 1-41. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Lacroix, M., Dang Vu, K. (2014). "Innovations in Food Packaging (Second Edition)". 277-304.
- Lara, I., García, P. and Vendrell, M. (2004). "Modifications in cell wall composition after cold storage of calcium-treated strawberry (*Fragaria x ananassa Duch.*) fruit". *Postharvest Biology and Technology* 34, 331-339.
- Lin, D. and Zhao, Y. (2007). "Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6, 20-75.
- Mali, S., Grossmann, V., García, M., Martino, M. and Zaritzky, N. (2002). "Microstructural characterization of yam starch films". *Carbohydrate Polymers* 50, 379-386.
- 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.
- Medina, E. (2014). "1° Avance de Tesis: Diseño y Evaluación de recubrimientos en base a proteínas de Quínoa y Quitosano que comprenden agentes naturales nanoparticulados para su aplicación en berries". Universidad de Chile. Programa Doctorado en Nutrición y Alimentos. Santiago-Chile.
- Min, S. and Krochta, J. (2007). "Ascorbic acid-containing whey protein film coatings for control of oxidation". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2964-2969.
- Mitchell, F., Mitcham, E., Thompson, J. and Welch, N. (1996). "Handling strawberries for fresh Market". In *Special Publication 2442 (eds) California Agricultural Natural Resources*. pp. 14. Oakland, USA
- Morillón, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M. and Voilley, A. (2002). "Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A Review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 42(1), 67-89.
- Müller, 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: 3-19.
- Muzzarelli, R. (1977). "Chitin". Oxford. Pergamon Press. 326 p.
- NC ISO 1842. (2001). "Productos de frutas y vegetales. Determinación del pH". (ISO 1842:1991, IDT).
- NC ISO 750. (2001). "Productos de frutas y vegetales. Determinación de la acidez valorable". (ISO 750:1998, IDT).
- NC ISO 2173. (2001). "Productos de frutas y vegetales. Determinación del contenido de sólidos solubles. Método refractométrico". (ISO 2173: 1978, IDT)

- NC ISO 7954. (2002). "Microbiología de alimentos de consumo humano y animal. Guía general para la enumeración de levaduras y mohos. Técnica de placa vertida a 25°C". (ISO 7954:1987, IDT).
- 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.
- NORMA CHILENA OFICIAL NCh1151.Of1976. (1990). "Láminas y películas plásticas – Determinación de las propiedades de tracción". 13 p.
- NORMA CHILENA OFICIAL NCh2098.Of2000. (2000). "Películas de recubrimiento orgánico – Determinación de la transmisión de vapor de agua". 13 p.
- NORMA CHILENA OFICIAL NCh2734.Of2002. (2002). "Determinación de Hongos y Levaduras - Método de Recuento en Placas".
- ODEPA. Oficina de estudios y políticas agrarias. (2014). [En línea: <<http://www.odepa.gob.cl>>] [Consulta: Marzo del 2014]
- Olivas, G.I., Barbosa-Canovas, G.V., (2008). "Alginate–calcium films: water vapor permeability and mechanical properties as affected by plasticizer and relative humidity". *LWT-Food Science and Technology* 41, 359–366.
- Oshodi, A. A., Ogungbenle, H. N., & Oladimeji, M. O. (1999). "Chemical composition, nutritionally valuable minerals and functional properties of benniseed (*Sesamum radiatum*), pearl millet (*Pennisetum typhoides*) and quínoa (*Chenopodium quinoa*) flours". *International journal of food sciences and nutrition*, 50(5), 325-331.
- Peyron, A. (1991). "L'enrobage et les produits filmogènes: un nouveau mode de emballage". *Viandes Prod. Cares.* 12 (2), 41-46.
- Phan The, D., Debeaufort, F., Voilley, A. and Luu, D. (2009). "Influence of hydrocolloid nature on the structure and functional properties of emulsified edible films". *Food Hydrocolloids* 23, 691-699.
- Ranhotra, G., Gelroth, J., Glaser, B., Lorenz, K. and Johnson, D. (1993). "Composition and protein nutritional quality of quinoa". *Cereal Chemistry* 70(3), 303-305.
- Ribeiro, C., Vicente, A., Teixeira, J. and Miranda, C. (2007). "Optimization of edible coating composition to retard strawberry fruit senescence". *Postharvest Biology and Technology* 44, 63-70.
- R.S.A, (2014). "Nuevo Reglamento Sanitario de los Alimentos N°977/96". Ed. Publiley. Ministerio de Salud, Chile.
- Savé, P. (2011). "Elaboración de nanopartículas de quitosano e incorporación en películas quitosano-quínoa Tesis de Pregrado". Universidad de Chile: Universidad de Chile. Santiago-Chile.
- 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.
- 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, 531-537.
- Valenzuela, C. (2012). "Bio-películas comestibles en base a mezclas entre proteínas de quínoa y quitosano: elaboración, caracterización y su aplicación en frutillas". Universidad de Chile. Programa Doctorado en Nutrición y Alimentos. Santiago-Chile.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. and González-Martínez, C. (2006). "Quality of cold-stored strawberries as affected by chitosan-oleic acid edible coatings". *Postharvest Biology and Technology* 41, 164-171.

- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. and González-Martínez, C. (2009). "Characterization of chitosan–oleic acid composite films". *Food Hydrocolloids* 23, 536-547.
- Wattanasatcha, A., Rengpipat, S., & Wanichwecharungruang, S. (2012). "Thymol nanospheres as an effective anti-bacterial agent". *International Journal of Pharmaceutics*, 434(1-2), 360-365.
- Wazed, A., Rajendran, S., Joshi, M. (2011). Synthesis and characterization of chitosan and silver loaded chitosan nanoparticles for bioactive polyester. *Carbohydrate Polymers* 83: 438–446.