

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

Películas y recubrimientos comestibles (PCs y RCs)

basadas en Quitosano-Agar

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA



Que para obtener el Título de

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presenta:

Brianda Maria Salazar Salas

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

VOTOS APROBATORIOS

Los miembros del jurado calificador del examen profesional de Brianda Maria Salazar Salas hemos revisado detenidamente su trabajo escrito titulado "Películas y recubrimientos comestibles (PCs y RCs) basadas en Quitosano-Agar", y encontramos que cumple con los requisitos para la presentación de su examen profesional. Por tal motivo recomendamos se acepte dicho trabajo como requisito parcial para obtención de título de Químico Biólogo Clínico.

Atentamente:

Dr. Tomás Jesús Madera Santana

Presidente

Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño

Secretario

Dra. Maribel Plascencia Jatomea

Vocal

Dra. Cinthia Jhovanna Pérez Martínez

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo y sincero agradecimiento a la Universidad de Sonora y a todos los maestros que me apoyaron durante el proceso de mi formación académica.

A los miembros del comité, Dra. María Alba Guadalupe Corella Madueño, Dra. Maribel Plascencia Jatomea, Dra. Cinthia Jhovanna Pérez Martínez y Dr. Tomás Jesús Madera Santana, por su valiosa aportación a la realización de este trabajo, así como su disponibilidad y apoyo.

Dr. Tomas Madera, por todo su apoyo y conocimientos que me ha compartido, ha sido una importante guía durante este trabajo y en todos los demás, incluyendo muestras estudiantiles y congresos.

A la Dra. Maribel Plascencia, M.C. Armida Rodríguez y M.C. Judith Ortiz por el apoyo y orientación en el desarrollo de pruebas vitales para este proyecto.

Al Laboratorio Nacional de Nanobiomateriales (LANNBIO) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN Unidad Mérida, por las facilidades brindadas en la caracterización de los materiales de este estudio.

Y especialmente a mis padres, que gracias a su esfuerzo me ha sido posible todo esto. A mis hermanos Javier y Diana. A mis abuelos, que a pesar de la distancia siempre tienen un lugar en mi corazón. Emmanuel por tu apoyo incondicional y cariño.

A mis compañeros de laboratorio y más que compañeros amigos, Heidy Burrola, Cristopeer Busani, Efrén Martínez, Diana Sánchez y Luis Val. Gracias a la cDra Heidy Burrola por ayudarme con los estadísticos.

A mis amigos de toda la vida por estar ahí siempre apoyándome, Adrián Bujanda, Lily Quihui, Verónica Larez, Milagros Bustamante y Fernanda Lizárraga.

A mis amigos de QB, que en tan poco tiempo se han convertido muy importantes para mi Abigail, Gema, Evelyn, Katya, Shema, Ramiro, Teresita, Anna, Freddy, Denisse, Eva, Héctor y Charly.

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres, gracias por creer siempre en mí, por amarme tanto y por no darme siempre lo que quise. Me enseñaron el valor de las cosas. Creo que la palabra gracias se queda corta para expresar todo el agradecimiento que siento por ustedes.

“Si he conseguido ver más lejos, es porque me he aupado en hombros de gigantes”

Isaac Newton

CONTENIDO

VOTOS APROBATORIOS.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIAS.....	4
CONTENIDO.....	5
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
OBJETIVOS.....	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Específicos.....	14
ANTECEDENTES.....	15
Polímeros.....	15
Biopolímeros.....	16
Historia.....	17
Mezcla de polímeros naturales.....	18
Métodos para la preparación de películas de mezclas poliméricas.....	19
Quitosano.....	20
Propiedades fisicoquímicas.....	22
Propiedades biológicas.....	23
Efecto antimicrobiano.....	24
Efecto antifúngico.....	25
Aplicaciones.....	25
Agar.....	30
Aplicaciones.....	31
MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
Materiales.....	34
Métodos.....	34
Preparación de soluciones formadoras de PCs.....	34
Preparación de PCs.....	35
Propiedades ópticas.....	35

Análisis morfológico.....	36
Pruebas mecánicas.....	36
Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).....	36
Grado de hinchamiento, solubilidad y WVTR de películas.....	37
Actividad fungistática.....	38
Análisis morfométrico de hifas y esporas.....	38
Análisis de esporas.....	38
Análisis estadístico.....	39
Aplicación de RCs y almacenamiento.....	40
Calidad interna.....	41
Pérdida de peso.....	41
Color de la piel y pulpa.....	41
Firmeza del fruto.....	41
Análisis subjetivo.....	42
Análisis estadístico.....	42
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	43
Propiedades ópticas.....	43
Análisis morfológico.....	43
Pruebas mecánicas.....	45
Espectroscopia de infrarrojo (FTIR).....	46
Grado de hinchamiento, solubilidad y WVTR de películas.....	47
Actividad fungistática.....	48
Análisis morfométrico de hifas y esporas.....	48
Análisis de esporas.....	48
Calidad interna.....	49
Pérdida de peso.....	51
Color de la piel y pulpa.....	52
Firmeza del fruto.....	57
Análisis subjetivo.....	58
CONCLUSIONES.....	59
RECOMENDACIONES.....	60
BIBLIOGRAFÍA.....	61
ANEXOS.....	71
ANEXO 1. Análisis de Varianza de propiedades de color en PCs.....	72

ANEXO 2. Análisis de Varianza de propiedades mecánicas.....	74
ANEXO 3. Análisis de Varianza de propiedades de barrera.....	75
ANEXO 4. Análisis de Varianza de propiedades de morfométricas de hifas-esporas.....	77
ANEXO 5. Análisis de Varianza de propiedades en la evaluación de la calidad del tomate con RCs.....	78
ANEXO 6. Análisis de Varianza de propiedades de pérdida de peso de los RCs en tomate <i>Var. Saladette</i> a 13 °C y 20 °C.....	83
ANEXO 7. Análisis de Varianza realizado a los parámetros de color externo e interno en tomate <i>Var. Saladette</i> a 13 °C y 20 °C.....	86
ANEXO 8. Análisis de Varianza realizado en el parámetro de firmeza en tomate <i>Var. Saladette</i> a 13 °C y 20 °C.....	101

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Aplicaciones de quitosano en diferentes industrias.....	27
2.	Propiedades ópticas de las películas formuladas	43
3.	Propiedades mecánicas de las películas formuladas.....	46
4.	Valores del grado de hinchamiento, solubilidad, WVTR y permeancia....	48
5.	Valores del diámetro de esporas, diámetro de hifas, esporas germinadas, polarizadas y no germinadas.....	49
6.	Análisis subjetivo.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Representación de las diferentes estructuras de polímeros.....	15
2.	Clasificación de los biopolímeros.....	17
3.	Relación estructural entre quitina, quitosano y quitano.....	21
4.	Proceso de obtención de quitosano.....	22
5.	Principales componentes del agar, garosa y agarpectina.....	31
6.	Proceso de obtención de agar.....	32
7.	Diagrama de flujo de procedimiento en general de la caracterización y formulación de las diferentes PCs.....	34
8.	Diagrama de flujo del procedimiento en general de las diferentes formulaciones de RCs y caracterización.....	40
9.	Morfología de la superficie de las PCs formuladas a una magnificación de 2.5x: Agar, Quitosano y Q+A.....	44
10.	Morfología de la superficie de las PCs formuladas a una magnificación de 200 y 500x: Agar, Quitosano y Q+A.....	44
11.	Espectros de FTIR: (Q) Quitosano, (A) Agar, (Q+A) Quitosano+Agar...	47
12.	Efecto de los recubrimientos pH y AT en fruto de tomate.....	50
13.	Efecto de los recubrimientos en pérdida de peso.....	52

14.	Efecto de los recubrimientos en luminosidad externo e interno en fruto de tomate.....	53
15.	Efecto de los recubrimientos en ángulo de tono externo e interno en fruto de tomate.....	54
16.	Efecto de los recubrimientos en croma externo e interno en fruto de tomate.....	55
17.	Agar día 14 de almacenamiento 13°C.....	56
18.	Efecto de los RCs en firmeza en fruto de tomate durante el almacenamiento.....	57

RESUMEN

Actualmente, el uso desmedido y la alta demanda de los embalajes convencionales a base de petroquímicos, como los plásticos son una preocupación a nivel mundial. Esto ha llevado a causar efectos negativos al medio ambiente después de su utilización, debido a que su descomposición toma un periodo de vida largo (decenas de años), por lo tanto, son una fuente de contaminación importante. Una forma de resolver los problemas anteriores es el uso de biopolímeros biodegradables como el almidón, quitosano, alginato; los cuales representan una alternativa más ecológica y amigable con el medio ambiente por sus características de biodegradabilidad, además por provenir de fuentes renovables y ser relativamente económicos. En el presente trabajo, se estudiaron los efectos de la mezcla de quitosano (Q) y agar (A) en dos formas, como película comestible (PCs) y recubrimiento comestible (RCs). De primera instancia, se realizó la caracterización de la mezcla Q y A en forma de PCs, con la finalidad de conocer si dicha mezcla es funcional para su posterior aplicación en forma de RCs. Por lo cual, se analizaron utilizando varias técnicas como son: ensayo de las propiedades mecánicas, análisis de color y superficie, espectrofotometría de infrarrojo, grado de hinchamiento, solubilidad, velocidad de transporte de agua de las películas, actividad fungistática, análisis morfométrico de hifas y esporas; para su posterior aplicación como RCs en tomate saladette.

Al realizar la aplicación de la mezcla Q y A se observó que la presencia de estos biopolímeros en los RCs es beneficioso para el fruto, ya que prolongó su vida de anaquel, además de presentar sobresalientes resultados en la evaluación de la calidad (análisis de color, pérdida de peso, firmeza, pH, acidez titulable y análisis subjetivo) del fruto que es importante desde el punto de vista del consumidor, así como del proveedor.

INTRODUCCIÓN

Uno de los frutos de alto consumo en Sonora es el tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Saladette. Sin embargo, es un fruto perecedero que presenta grandes pérdidas post-cosecha, estas pérdidas llegan a alcanzar hasta el 50% del total de la producción por deterioro debido tanto a factores físicos como biológicos (Bombelli y Wright, 2006).

Algunos daños que sufre el tomate en post-cosecha son provocados por hongos como *Geotrichum candidum*, responsable de la pudrición ácida también llamada pudrición amarga del tomate, así como *Rhizopus stolonifer* que causa la blanda del tomate; destaca también *Alternaria alternata* que provoca la pudrición de moho negro (Bautista y col., 2004; Benavidez y col., 2014).

La presencia de otros hongos en tomate, provocan enfermedades como el moho gris o pudrición del fruto por *Botrytis cinerea* y la pudrición por *Fusarium oxysporum*, el cual se desarrolla en forma de ramillete algodonado con micelio blanco, que tiene tonalidades que van desde de rosado y anaranjado hasta violeta (Martínez y col., 2012).

Por dichas razones en la actualidad, se busca la aplicación de nuevas tecnologías para la preservación de frutas y vegetales, para controlar la descomposición ya sea por el ataque de hongos, bacterias y virus y además, se busca controlar la maduración del fruto para prolongar la vida de anaquel (Hoeberichts y col., 2002). En este sentido, los RCs son una alternativa viable para la industria alimenticia, ya que reduce las pérdidas económicas.

Además, hoy en día se busca el uso de productos elaborados a base de biopolímeros naturales (polisacáridos, compuestos de naturaleza proteica, lipídica o una mezcla de los mismos) en el proceso de envasado, debido a que contribuyen como una alternativa más amigable para el ambiente, por la disminución de desechos derivados del petróleo, ya que los biopolímeros naturales pueden ser degradados en corto tiempo.

De acuerdo con lo anterior, en el envasado de frutas y vegetales se puede utilizar PCs y RCs a base de biopolímeros degradables, con características de barrera y mecánicas adecuadas (Kanetis y col., 2007; Palou y col., 2008; García-Ramos y col., 2010). Sin duda, los biopolímeros naturales son una buena alternativa, ya que además del beneficio ambiental, también contribuyen en la disminución del riesgo de la salud humana asociado a los residuos de fungicidas (Sadi y col., 2010; Kanetis y col., 2007; Palou y col., 2008).

Las PCs se pueden definir como una matriz preformada y delgada que posteriormente puede ser utilizada en forma de RCs de alimentos o como envase. Un RCs se puede definir como una matriz delgada que se aplica directamente sobre algunos alimentos de interés, mediante inmersión o aspersión del mismo.

Los RCs tienen características que los hacen ideales para la preservación de frutas y verduras, debido a que forman una barrera semipermeable a los gases y al vapor de agua lo

cual retrasa el deterioro del alimento, ayuda a mantener la integridad estructural de la fruta o vegetal que recubre y puede retener los compuestos volátiles (Cisneros y col., 2002). La barrera semipermeable impide el intercambio de O_2 y CO_2 , favoreciendo el parámetro de pérdida de peso; algunos RCs contribuyen en la disminución de pérdida de peso (Fraudes y col., 2015).

El amplio interés en las PCs o RCs elaborados de polímeros naturales, se debe principalmente por la necesidad de reducir el uso de materiales sintéticos y ha impulsado el estudio sobre empaques con un menor impacto ambiental; lo cual representa un reto para los investigadores, ya que se estudia la mezcla de biopolímeros de forma tal, que esta sea más funcional para mantener la calidad de los frutos (característica apreciada por los consumidores), fácil procesamiento, económico y con un buen balance de propiedades. Además, que las mezclas formadas de dos o más biopolímeros surjan como una alternativa de nuevos materiales. Las mezclas biopoliméricas generalmente presentan propiedades diferentes en comparación a sus componentes individuales.

Las PCs biodegradables aún no son destinadas a reemplazar en su totalidad a las películas sintéticas que se utilizan en los diferentes procesos de envasado o empaquetado de productos alimenticios. Sin embargo, tienen un futuro promisorio debido a que limitan la humedad, aroma y migración de lípidos entre los componentes alimenticios. Estas características hacen de las películas biodegradables una alternativa al envasado comercial, con características particulares como son nula toxicidad, amigables con el medio ambiente, además pueden proporcionar protección física, restringir la absorción de oxígeno y reducir la pérdida de humedad (Bourtoom y Chinnan, 2008).

OBJETIVOS

Objetivo General

Formular y caracterizar fisicoquímicamente mezclas de quitosano y agar, para su aplicación como películas y recubrimientos comestibles (PCs y RCs).

Objetivos Específicos

1. Elaborar películas y recubrimientos comestibles a base de quitosano y agar.
2. Determinar las propiedades ópticas, de barrera, mecánicas a tensión, propiedades estructurales y morfológicas de las PCs.
3. Evaluar las propiedades antifúngicas de las PCs.
4. Identificar la mejor PC formulada en base a sus propiedades morfológicas, fisicoquímicas y antifúngicas; para su posterior aplicación en forma de RC en tomate *var. Saladette*.

ANTECEDENTES

Polímeros

El origen de la palabra polímeros es griego, es una combinación de “*polys*” que significa muchos y “*meros*” que significa partes. Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión de muchas moléculas pequeñas llamadas “monómeros”, cuyo componente principal es el carbono. A la reacción química que da como resultado la formación del polímero se le conoce como “polimerización”, pueden presentar una estructura como se muestra en la Figura 1. Finalmente, las diferentes estructuras son debido a la velocidad de la formación de las cadenas y además a la terminación del crecimiento de las cadenas. Existe la probabilidad que al ocurrir las reacciones laterales originen cadenas ramificadas, llegando incluso a casos extremos donde se forman redes tridimensionales por el entrecruzamiento de dos cadenas distintas a través de una misma ramificación (Pardilla, 2007; Pérez, 2013).

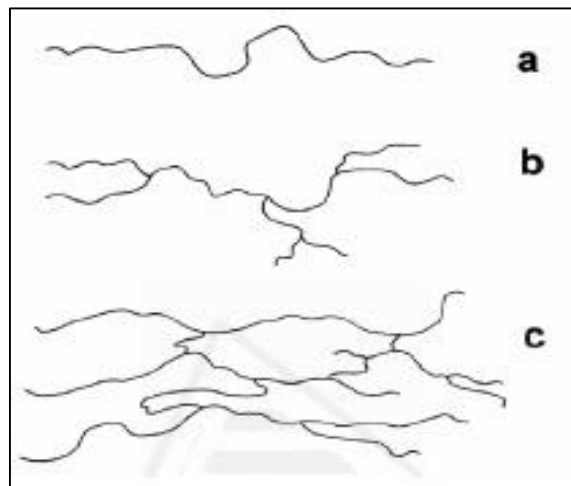


Figura 1. Representación de las diferentes estructuras de polímeros: a) Lineal, b) Ramificado y c) Entrecruzado (Pardilla, 2007).

Los polímeros son de naturaleza química (llamados polímeros sintéticos) o naturales (llamados polímeros naturales o biopolímeros). El peso molecular promedio de los polímeros oscila entre $10,000 \text{ g mol}^{-1}$ hasta más de $10,000 \text{ g mol}^{-1}$ hasta más de $1,000,000 \text{ g mol}^{-1}$ (Burrola, 2014).

La Real Academia Española, define a los polímeros como “un polímero es un compuesto químico, natural o sintético, formado por polimerización y que consiste

esencialmente en unidades estructurales repetidas. Los polímeros tienen un gran papel en la vida diaria, en la naturaleza encontramos polímeros naturales como la seda, lana, caucho, alginato y celulosa; que han sido utilizados desde el principio de los tiempos, incluso sin tener conocimiento de su estructura, composición y propiedades. Por otra parte, el uso de los polímeros sintéticos es más actual, ya que se obtienen mediante reacciones químicas y entre los más utilizados, encontramos las poliolefinas, los poliésteres, las poliamidas, entre otras familias de polímeros.

El uso desmedido de los polímeros sintéticos ha generado un problema ambiental, puesto que su degradación toma más de 500 años en condiciones naturales de intemperismo. En nuestro país 90 millones de toneladas de plásticos sintéticos (envases y embalajes de polietileno tereftalato "PET") son lanzados en vías públicas, carreteras, bosques, ríos, playas y mares. La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) hace mención de que, en nuestro país, el consumo de PET asciende a 722 mil toneladas al año, el 50.4% es reutilizado, sin embargo esto no es suficiente. Para resolver la problemática la investigación actual por un lado apunta a la adición de compuestos que aumentan la degradación de los plásticos sintéticos. Por otro lado, se busca mejorar las propiedades de los polímeros naturales como en el presente trabajo en el que se busca mejorar las propiedades de los polímeros naturales para reemplazar en cierta medida a los polímeros sintéticos y disminuir su producción. Además, es necesario la concientización de la población hacia esta problemática, para que disminuyan el uso de estos materiales; como en el caso de Hermosillo que se ha creado como una campaña al "De decir no al uso de popotes".

Biopolímeros

Los biopolímeros son polímeros formados en la naturaleza durante los ciclos de crecimiento de los organismos o por procesos químicos a partir de monómeros naturales. Ejemplos más comunes del primer tipo de biopolímeros provenientes de organismos vivos son proteínas (colágeno, queratina, gelatina, proteínas de leche o soya), polisacáridos (almidón, derivados de la celulosa, alginatos, pectinas y quitosano), lípidos (ceras y ácidos grasos). En el segundo grupo se encuentran los que requieren ser sintetizados pero su procedencia es de un recurso renovable como el ácido poliláctico (PLA) y un tercer grupo por acción de microorganismos como algunos poliésteres que son producto del metabolismo de bacterias como lo son los polihidroxialcanoatos (PHA), como se muestra en la Figura 2 (Chandra y col., 1998; Burrola, 2014).

Los polímeros biodegradables tienen en su estructura átomos de oxígeno, lo cual los hace susceptible a la hidrólisis enzimática. Son una fuente importante de carbono y energía para muchos microorganismos como bacterias y hongos. Estos microorganismos llevan a

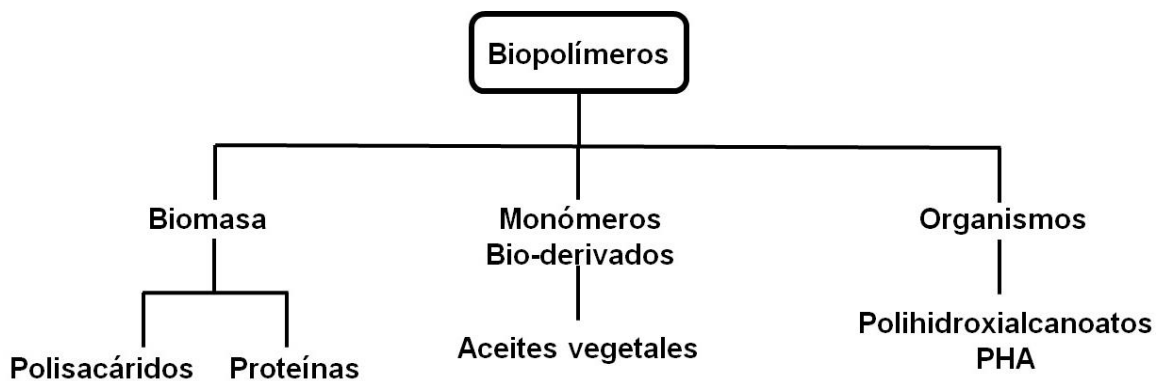
cabo dos procesos de acción en los biopolímeros (Sadi y col., 2010; Mohan y Srivastava, 2011):

❖ **Acción directa:** donde el material es deteriorado y es utilizado como fuente de nutrientes para el crecimiento de microorganismos.

❖ **Acción indirecta:** algunos productos provenientes del metabolismo de microorganismos influyen en el deterioro del material.

La biodegradación de los biopolímeros dependerá mucho de su estructura química, al finalizar su vida útil se pueden integrar directamente al suelo, donde las bacterias pueden transformarlos en dióxido de carbono, metano, agua y biomasa. Es por su degradación rápida y el hecho de ser amigables con el ambiente, lo que ha despertado el gran interés en su investigación, buscando una manera de optimizar sus propiedades químicas, físicas y mecánicas, para lograr sustituir a los polímeros sintéticos (Mostafa y col., 2010).

Figura 2. Clasificación de los biopolímeros.



Historia

Los biopolímeros se han utilizado desde la antigüedad en diversas aplicaciones como la vestimenta de seda, en forma de recubrimiento del papel, en la fabricación de sus herramientas; hasta para fines recreativos como, la pelota maya que era elaborada de caucho.

Los egipcios en el año 2000 a.C utilizaban resinas naturales como el ámbar para moldear figuras, para hacer joyas y para embalsamar a sus muertos. El ámbar lo podemos encontrar como una resina de coníferas, que tras derramarse del árbol, endurece e incluso en

ocasiones atrapa insectos o plantas. Incluso en Europa utilizaban el ámbar, fabricaban objetos cotidianos como cucharas y peines (García, 2009). La goma laca es un polímero natural producido por las secreciones de la hembra de un chinche llamado lac, originario de la india y el sudeste de Asia. Esta resina era utilizada como recubrimiento, por ser brillante, transparente e impermeable.

En el año 3500 a.C. los egipcios utilizaban como pegamento una mezcla de resinas vegetales con “papiro” (celulosa). En el año 5000 a.C. las culturas de Mesopotamia empleaban asfalta y resinas para fijar mosaicos.

Mezcla de polímeros naturales

La mezcla de polímeros naturales es una forma práctica de producir nuevos materiales para mejorar las propiedades, las mezclas de polímeros por lo general poseen propiedades físicas y mecánicas diferentes a su forma individual. Una gran ventaja de usar exclusivamente polímeros naturales es su completa biodegradabilidad, nula toxicidad y además de que pueden estar en contacto directo con los alimentos para su preservación.

El trabajo presentado por Khalifa y col., (2017) muestra claramente como la mezcla de quitosano (CH) al 2% con desechos de aceituna (*Olea europaea* var. *Kronakii*) en diferentes concentraciones al 1 y 2%, los cuales incluían hojas de olivo y el orujo de oliva, ayudaron a la preservación de manzanas (*Malus* doméstica var. *Anna*) durante su almacenamiento en frío a $4\pm 1^{\circ}\text{C}$, donde destacó la mezcla de CH-OLE 2% por reducir la pérdida de peso, demorar la actividad de antioxidantes, flavonoides y clorofila. Estos resultados demuestran que la industria alimenticia puede reemplazar los materiales de recubrimiento químicos con recubrimientos de polímeros naturales.

Otro trabajo interesante sobre mezclas de polímeros naturales es el de Valenzuela y col., (2015), estos autores realizaron un RC de proteína de quinoa con quitosano y otra mezcla de proteína de quinoa, quitosano y aceite de girasol, lo aplicaron en fresa (*Fragaria x ananassa*) para evaluar la calidad durante su almacenamiento. Los frutos se almacenaron a $0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ y 90% HR, en un periodo de 15 d. Los resultados que obtuvieron este grupo de investigadores es que las fresas recubiertas extendieron más su vida útil en comparación a las frutas sin recubrimiento; se atribuye a la actividad antifúngica del quitosano (Valenzuela y col., 2015).

Vieira y col., (2016) formularon RCs a base de sábila (*Aloe vera*) y quitosano para prolongar la vida post-cosecha del arándano (*Vaccinium corymbosum*), la aplicación de los RCs reduce la tasa de pérdida de agua y la contaminación por *B. cinerea*, *P. expansum* y *A. niger*. Además, se ha evaluado el efecto de RCs basados en quitosano enriquecido con extracto de cáscara de granada y alginato por el grupo de investigadores Nair y col., (2018)

con el mismo extracto mencionado con anterioridad, para extender la calidad post-cosecha de la guayaba (*Psidium guajava* L.). La introducción del extracto de cáscara de granada no solo mejoró los atributos visuales de la guayaba, sino que también retiene la degradación del ácido ascórbico, compuestos fenólicos totales y flavonoides.

Las mezclas de polímeros naturales también son ampliamente utilizados en películas biodegradables y se propone hacer uso de ellas en alimentos; un ejemplo de ello son las películas de quitosano con almidón de arroz, ambos a diferentes concentraciones; las concentraciones que utilizaron: almidón-quitosano (2:1, 1.5:1, 1:1 y 0.5:1). Para la evaluación de la miscibilidad molecular entre ambos componentes (Bourtoom y Chinnan, 2008). La presencia del quitosano mejoró las propiedades mecánicas, sin embargo, a una mayor concentración de quitosano provoca separación de fases entre el almidón y el quitosano.

Se ha estudiado los efectos de diferentes combinaciones de aceites esenciales (limón, canela y tomillo) con quitosano al 2% para la formación de películas, proponen su uso como envases de alimentos en forma de embalaje activo (Peng y Li, 2014). Los autores realizaron la caracterización física, mecánica y estructural de las PCs. El uso combinado de dos aceites disminuyó la velocidad de transmisión del vapor de agua y el tamaño de las partículas en comparación a las películas elaboradas con un aceite esencial. Sin embargo, las películas que tenían la combinación de dos aceites equilibraron las propiedades antimicrobianas contra *E. coli* y *S. aureus*; cabe mencionar que las películas de quitosano-tomillo (CH-T) y quitosano-canela (CH-C) exhibieron un mejor efecto antimicrobiano, creando una mayor zona de inhibición. El grupo de investigación de Ojagh y col., (2010) obtuvieron resultados similares con la mezcla de quitosano con aceite esencial de canela, a diferencia del trabajo anterior, estudian el efecto del aceite esencial de canela a diferentes concentraciones 0.4, 0.8, 1.5 y 2 %, la incorporación del aceite esencial mejoró la capacidad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, *L. plantarum*, *L. sakei* y *E. coli*.

Debido a su biocompatibilidad, el polisacárido quitosano, es muy útil para elaborar mezclas de polímeros, en una investigación reciente de Hafsa y col., (2016) hacen uso del quitosano al 2% con diferentes concentraciones del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus*). Los resultados demuestran su potencial para ser utilizadas como empaque activo para alimentos debido a su excelente capacidad antimicrobiana y antifúngica contra *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* y *C. parapsilosis* y la notable disminución de la solubilidad en agua, de humedad y una mayor capacidad antioxidante. La capacidad antimicrobiana y antifúngica mejora a medida que se aumenta la concentración de aceite de eucalipto.

El desarrollo de películas biodegradables de quitosano al 1% con aceite esencial de citronela al 10, 20 y 30% (p/p) y la mezcla de quitosano con aceite esencial de cedro a concentraciones iguales, es interesante y novedoso, debido a que los autores realizaron la primera exploración de las características físicas, térmicas y estructurales (Zhu y Pascal,

2015). En general, el estudio muestra que en mayores concentraciones de los aceites esenciales mejoran las propiedades de barrera; sin embargo, falta investigar la actividad antimicrobiana y antifúngica de las películas, para su uso en alimentos.

Métodos para la preparación de películas de mezclas poliméricas

En la actualidad hay una gran variedad de técnicas para procesar los polímeros como evaporación de solventes (Casting), extrusión, moldeo por compresión y moldeo por inyección. Estas técnicas dependen de la naturaleza del material y en función a su comportamiento térmico, es decir si se trata con un material termoplástico o termoestable. Los termoplásticos se calientan a una elevada temperatura para reblandecerlos, y antes de enfriarlos con la forma final que se pretende dar. Por otro lado, en los termoestables llevan a cabo una reacción síntesis (polimerización y entrecruzamiento), es decir por medio de una reacción química se forma un entrecruce de las cadenas poliméricas dando como resultado un material reticulado, con mayor dureza y resistencia que los termoplásticos, pero en algunos casos son más frágiles.

En el caso de PCs el proceso más utilizado es por evaporación de solventes (Casting), el procedimiento consiste en disolver el polímero de interés en un solvente fácil de evaporar como agua o etanol, entre otros; después se someten a un proceso de secado para la evaporación del solvente. La evaporación del solvente conduce a la alineación de las cadenas del polímero, además de que éstas se compactan, dando como resultado la formación de la película (Dhanapal y col., 2012; Hafsa y col., 2016; Ojagh y col., 2010). El método de casting es de los más antiguos para obtener películas de quitosano, agar, almidón, de proteínas y fue patentado en 1936.

Quitosano

El quitosano es un biopolímero obtenido a partir de la desacetilación parcial de la quitina, la cual se encuentra de forma natural en el exoesqueleto de crustáceos, insectos y la pared celular de los hongos como los ascomicetos, zigomicetos, basidiomicetos y deuteromicetos, y en algas como las diatomeas (Coma y col., 2003). La quitina es el segundo biopolímero más abundante, seguido de la celulosa y está conformado por unidades (N-acetil-D-glucosamina).

La producción a nivel industrial de la quitina se basa principalmente en el tratamiento del exoesqueleto de diversos tipos de crustáceos como camarones, langostas y cangrejos; generalmente son desechados y de fácil acceso, por lo cual el quitosano se puede producir comercialmente a bajo costo. Por otro lado, el quitosano se encuentra de forma natural en la

pared de algunos hongos como *Mucor rouxii*, sin embargo, la mayor fuente de obtención de quitosano lo constituye la quitina.

El quitosano es biológicamente inerte, por lo tanto es seguro para el consumo y seguro para el medio ambiente. Estas razones lo hacen ideal para la fabricación de películas para envases o empaques, se le atribuyen propiedades antibacterianas, antifúngicas, de biodegradabilidad y biocompatibilidad (Wang, 1992; Aider, 2010). Debido a que es un polisacárido biocompatible tiene la capacidad de unirse a polímeros aniónicos, proteínas, aminoácidos, células, colorantes y plastificantes. Estas propiedades, lo colocan como un buen candidato para la industria alimenticia ya que es capaz de intervenir en la preservación de alimentos.

Estructuralmente, quitosano es un polisacárido catiónico de alto peso molecular que está conformado en mayor proporción de grupos D-glucosamina y en menor proporción N-acetil glucosamina como se muestra en la Figura 3, este biopolímero presenta solubilidad en ácidos orgánicos diluidos como el ácido acético y ácido fórmico, la quitina contiene grupos funcionales acetamidas, cuando a la quitina se le eliminan esos grupos mediante procesos de desacetilación en condiciones muy alcalinas y de altas temperaturas, se obtiene el quitosano como se muestra: en la Figura 4, el proceso de la obtención de quitina y quitosano.

Para obtener la quitina presente en las cáscaras de moluscos y crustáceos se debe acceder eliminando los otros constituyentes como proteínas, lípidos, minerales y pigmentos. Si bien, existe una amplia investigación en los sistemas para obtener la quitina, actualmente se sigue estudiando para obtener quitina con una mayor pureza y un menor daño en la integridad de la cadena de este biopolímero. Los procesos de obtención de la quitina principalmente se basan en la desproteización; durante este proceso se hace uso principalmente del NaOH, seguido de un tratamiento alcalino para la eliminación de la mayoría de los componentes indeseables como proteínas o un tratamiento ácido para eliminar los metales presentes en la muestra. Adicionalmente, se hace uso de procesos para despigmentar o blanquear la quitina cruda (Ming-Tsung y col., 2009).

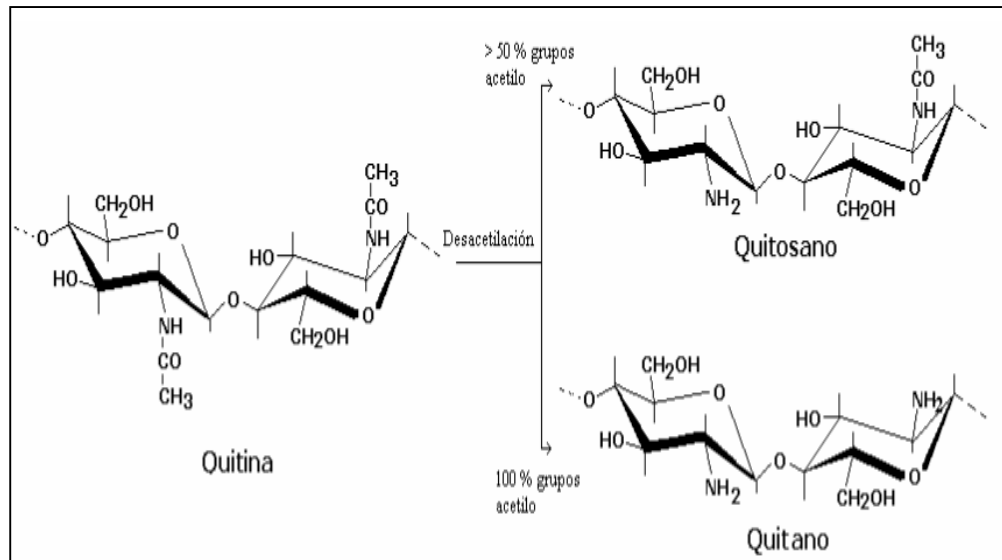


Figura 3. Relación estructural entre quitina, quitosano y quitano (Lárez, 2006).

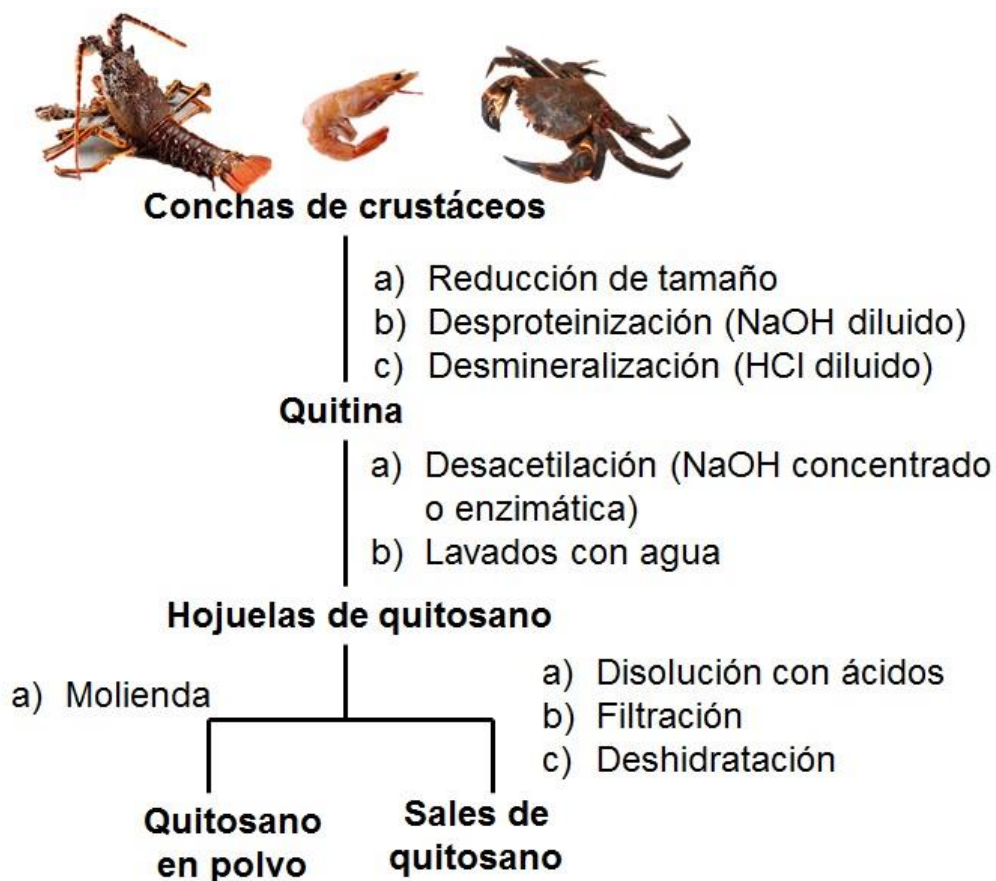


Figura 4. Proceso de obtención de quitosano

Propiedades Fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas principales del quitosano son el grado de desacetilación, peso molecular, viscosidad y solubilidad. Las propiedades mencionadas con anterioridad se pueden ver afectadas por el medio de obtención de la quitina, que abarca desde el método utilizado para la obtención de la quitina y el método utilizado en la determinación de las características fisicoquímicas.

1. Peso molecular

El peso molecular del quitosano determina en mayor medida, la viscosidad y la solubilidad del mismo. Afecta como un espesante, regulador de la viscosidad, antifúngico, agente ligante de color y grasa. Debido al amplio rango de peso molecular, que va de los 100 a 1500 kDa, se suele reportar como bajo, medio y alto peso molecular (Camacho, 2009).

2. Grado de desacetilación

En quitosano se basa en el porcentaje de grupos aminos libres, por lo cual el quitosano se define como el porcentaje de desacetilación de la quitina en un 60-75% o más. Es uno de los factores más importantes que influyen en las propiedades de solubilidad, ya que al incrementar el % desacetilación del quitosano el intervalo de pH en el que puede ser soluble en ácidos orgánicos aumenta, por la variación del pKa (Shahidi y Abuzaytoun, 2005).

Esta propiedad depende del contenido, el acomodo de los residuos de los grupos N-acetil y de las condiciones de desacetilación, es decir el método y la fuente de origen de la quitina (Kurita, 2006).

3. Viscosidad

La viscosidad del quitosano como se mencionó anteriormente está relacionado con el peso molecular, además la viscosidad del quitosano es dependiente del % de desacetilación, concentración, temperatura y procesos de obtención (Rabea y col., 2003). El quitosano forma soluciones viscosas con algunos ácidos orgánicos como ácido acético, ácido láctico, entre otros.

4. Solubilidad

El quitosano es soluble en ácidos débiles y soluciones acuosas diluidas de ácidos orgánicos y minerales, e insoluble en agua y solventes orgánicos. El comportamiento del quitosano en solución se ve influenciado por las cargas positivas presentes, la distribución de los grupos amino en conjunto al peso molecular y el % de desacetilación. Existen otros factores que influyen como el proceso de obtención (tipo de solvente y temperatura empleada), el pH, la fuerza iónica y la concentración del ácido donde se disuelva.

Propiedades Biológicas del Quitosano

La calidad y seguridad microbiana de las frutas y verduras se ha vuelto cada vez más importante, por una parte por las pérdidas económicas para tiendas comerciales y productores; y por otra parte, debido al deterioro, mal olor, marchitez y pérdida de peso que causa la presencia de un microorganismo en las frutas y verduras. Por estas razones, en la actualidad se buscan nuevas tecnologías para la preservación de los frutas y verduras, una alternativa son los recubrimientos comestibles elaborados con polisacáridos como el quitosano.

Es importante resaltar que el efecto antimicrobiano, antifúngico y antiviral del quitosano va depender (Kong y col., 2010):

a) **De la especie y fase de desarrollo del microorganismo.** Varía conforme al microorganismo a estudiar, siendo diferente para hongos, bacterias Gram positivas y Gram negativas. Esto se puede explicar debido a que cada microorganismo tiene diferente estructura externa, con características particulares que los diferencian.

b) **El peso molecular, grado de desacetilación, densidad de la carga positiva y capacidad quelante del quitosano.** El efecto de los diferentes concentraciones de quitosano en películas, donde se mostró que la actividad antifúngica del quitosano a diferentes concentraciones sobre la germinación de esporas y la elongación del tubo germinal de *B. cinerea* y *P. expansum*. los resultados que obtuvieron durante el estudio fue que en la germinación de esporas de *B. cinerea*, la inhibición fue mayor a mayores concentraciones de quitosano (Liu y col., 2007). Además, se ha comprobado que la viscosidad y los diferentes pesos moleculares de películas de quitosano se ha reportado por (Park y col., 2002; Kyung y col., 2011).

c) **El estado físico en el que se encuentre el quitosano.**

d) **Factores ambientales como temperatura, humedad relativa y pH.** Por ejemplo, la investigación de Kinghaew y col., (2014) demostró la relación de los diferentes pesos moleculares y el pH del quitosano, los autores evaluaron la actividad antifúngica y

antimicrobiana (*A. niger* y *E. coli*, *S. aureus*) de películas compuestas de celulosa impregnadas de quitosano.

Efecto Antimicrobiano

La actividad antimicrobiana del quitosano, en gran medida se debe a su naturaleza policatiónica. El mecanismo del quitosano en bacterias Gram negativas, es por la interacción de las cargas positivas (provenientes de los grupos aminos en las cadenas poliméricas de quitosano) con las cargas negativas (presentes en las membranas) de las macromoléculas de lipopolisacáridos y proteínas; provocando cambios en la integridad de la membrana externa, comprometiendo el intercambio de nutrientes y la liberación de material intracelular, seguido de la muerte celular (Rodríguez y col., 2005). En cambio en bacterias Gram positivas, es mediante la densidad de las cargas positivas; las bacterias Gram positivas tienen diversos polímeros con cargas negativas (ácido lipoteicoico y pectidoglicanos) en sus estructuras externas las cuales pueden interactuar con los grupos amino del quitosano.

La capacidad quelante del quitosano, puede ser un segundo mecanismo contra la inhibición de bacterias. Se menciona que el quitosano puede actuar como un agente quelante, creando compuestos con metales que son esenciales para la célula, inhibiendo así la producción de toxinas.

Se ha estudiado la acción de contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* y Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, entre otras (Martínez-Camacho y col., 2010; Tan y col., 1996; Knorr, 1984; Chung y col., 2004).

Efecto Antifúngico

El mecanismo en hongos, se propone que es posterior a la lisis celular, en donde el quitosano de bajo peso molecular es capaz de inhibir enzimas. Esto se debe a que el quitosano de bajo peso molecular es capaz de ingresar al ADN para interferir con la síntesis del ARN mensajero. Además, el quitosano puede afectar la síntesis de proteínas, inhibición de la formación de esporulación y formación de esporas.

La explicación de la actividad fungicida del quitosano es la relación directa con el peso molecular del mismo. De igual modo existen evidencias de que la sensibilidad del quitosano contra los hongos patógenos puede cambiar en los diferentes estadios de desarrollo. Por ejemplo, Liu y col., (2007) reportaron que el quitosano en el control de enfermedades post-cosecha de tomate, es mejor inhibidor de la germinación de *Penicillium expansum* en

comparación al efecto que tiene sobre *Botrytis cinerea*. Sin embargo, en la fase de crecimiento micelial de estas especies el quitosano mostró un mayor efecto inhibitorio en *Botrytis cinerea*.

Se ha comprobado que este biopolímero regula el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloesporioides* en papaya (Bautista-baños y col., 2003). Además, se ha estudiado la actividad antifúngica del quitosano con la combinación de aceites esenciales en *Rhizopus stolonifer*, agente causal de la blanda del tomate y otras especies como *Aspergillus niger* (Hernandez y col., 2011; El Ghaouth y col., 1992).

Aplicaciones del Quitosano

Las películas comestibles a base de quitosano han sido estudiadas, se ha investigado la aplicación de quitosano como RCs para retrasar la maduración de la papaya Eksotika II (*Carica papaya* L.) en diferentes concentraciones de 0.5, 1, 1.5 y 2%, donde sugiere el uso de quitosano como RCs ya que no solo mantiene la firmeza sino que también mejora la calidad post-cosecha durante el almacenamiento en frío (Ali y col., 2011). Resultados similares obtuvieron Zhu y col., (2008), en la aplicación de quitosano en diferentes concentraciones para la preservación de mango (*Mangifera indica* L.) durante su almacenamiento en frío; destacó el RC de quitosano al 2%, el cual controló de manera más eficiente la pérdida de firmeza, la tasa de respiración y el cambio de color. En guayaba (*Psidium guajava* L.) se observó el mismo comportamiento con recubrimientos de diferentes concentraciones de quitosano, durante el almacenamiento en frío (Hong y col., 2012).

El quitosano tiene un gran número de aplicaciones como se muestra en la Tabla 1 desde la agricultura en el recubrimiento de semillas para su protección, en recubrimientos de frutas y vegetales como en tomate, manzana, cítricos, contribuye en la liberación controlada de fertilizantes, protección antimicrobiana y en el tratamiento de aguas residuales como coagulante primario para aguas de alta turbidez y alcalinidad (El-Ghaouth y col., 1992; El-Ghaouth y col., 2000; Dong y col., 2004).

Otras aplicaciones del quitosano son, como aditivo bactericida en jabones, pasta dental y crema para afeitarse. En cosmetología es utilizado como agente hidratante para piel, tratamiento del acné y disminuir las líneas de expresión. En la industria textil para mejorar la viscosidad y tintas en telas, para mejorar la estabilidad y resistencia del color en telas. En la industria del papel es utilizado para mejorar el brillo, la resistencia y para mejorar la impermeabilidad del papel, entre otros.

Por lo tanto, este biopolímero tiene gran potencial para ser utilizado como PCs debido a su actividad antimicrobiana, nula toxicidad y biodegradabilidad. Los aspectos que se tienen que considerar para la prolongar la vida de anaquel de frutas y verduras mediante RCs de quitosano son: El grado de acetilación, peso molecular, disolvente y pH.

Sin embargo, debido a la baja resistencia a la tensión y elasticidad que presenta el quitosano para formar tanto un RCs como una PCs, se propone que la mezcla de quitosano con el agar contribuirá a mejorar las propiedades mecánicas y la flexibilidad. El agar, es un ficocoloide que forma recubrimientos comestibles con propiedades de alta resistencia mecánica y flexibilidad (Kanmani y Rhim, 2014).

Tabla 1. Aplicaciones de quitosano en diferentes industrias

Industria	Efecto	Aplicación	Referencia
Alimenticia	Barrera de intercambio de CO₂ y O₂	RC de quitosano(Q) para la preservación de papaya	Ali y col., 2011
		RC de Q para la preservación de tomate	El-Ghaout y col., 1992
		RC de Q para la preservación de guayaba	Hong y col., 2012
		RC de Q para la preservación de mango	Zhu y col., 2008
	Antifúngico	RC de Q-Aloe vera para la preservación de arándano	Vieira y col., 2016
		RC de Q y Q-con extractos de plantas para la preservación de papaya	Bautista-Baños y col., 2003
		RC de Q para la preservación de fresa	Park y col., 2005
		PC de Q para un posible uso de empaque activo	Martínez-Camacho y col., 2010
	Liberación controlada de antioxidantes, fenoles y flavonoides	RC de Q-extracto de aloe para la preservación de manzana	Khalifa y col., 2017
		RC de Q para la preservación de cerezas y fresas	Kerch y col., 2011
		RC de Q-aceite esencial de granada para la preservación de guayaba	Nair y col., 2018
	Antimicrobiano	RC de Q para la preservación de lechuga y fresa	Devlieghere y col., 2004
		RC de Q y Q-aceites esenciales para la preservación del tomate	Hernández y col., 2011

		PC de Q -aceites esenciales (tomillo, limón y canela) para un posible uso de empaque activo	Peng y Li., 2014
		PC de Q- aceite de eucalipto para un posible uso de empaque activo	Hafsa y col., 2016
	Antiviral	Efecto de Q contra el virus mosaico de alfalfa de frijol	Pospieszny y Atabekov, 1989
		Efecto de Q contra el virus de tabaco (TNV)	Iriti y col., 2015
		Micro y Nanopartículas de Q-Acliclovir para la administración tópica antiviral	Calderón y col., 2013
		Nanopartículas de Q para la protección del cangrejo de río <i>Procambarus clarkii</i> contra la infección por virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)	Sun y col., 2016
	Clarificante y purificante	Uso de Q para la purificación de jugo de caña (guarapo y jugo claro)	Durán-Olivera y col., 2016
		Uso de Q para la aclaración del jugo de maracuyá	Castro y col., 2012
		Uso de Q para la aclaración del jugo de granada	Tastan y col., 2015
		Uso de Q para la aclaración de diferentes jugos (manzana, naranja, limón y uva)	Chatterjee y col., 2004
	Bioactivo	Uso de Q como bioconservador de carne	Tayel y col., 2014
		Uso de Q-aceite de clavo como recubrimiento para la preservación de carne de ave	Mukhtar y col., 2018
		Uso de Q, Q-albahaca y Q-tomillo como película comestible para la preservación de carne de cerdo	Bonilla y col., 2014

	Prolongación de la vida útil	Nano partículas de diferentes pesos moleculares de quitosano para la preservación de queso	O'Callaghan y Kerry., 2016
		Q a diferentes concentraciones con y sin atmósfera modificada para la preservación de queso Stracciatella	Gammariello y col., 2011
		Q para inhibir el crecimiento de microorganismos y deterioro de queso mozzarella	Altieri y col., 2005
Depuradora de aguas residuales	Coagulación-floculación	Remoción de cromo en aguas residuales de curtiembres con el uso de Q como bioadsorbente	Duarte y col., 2009
		Remoción de cromo en aguas residuales con el uso de Q	Nieto y Orellana., 2011
		Q como coagulante durante el tratamiento de las aguas de producción de petróleo (APP) para remover la turbidez e hidrocarburos	Caldera y col., 2009
Agricultura	Baja toxicidad	Microesferas de Q para la administración controlada de brasinoesteroides (estimulante de crecimiento de plantas) con actividad biológica como agroquímicos	Quiñones y col., 2010
		Microesferas de Q para la administración controlada de auxinas (reguladoras de crecimiento) como agroquímicos	Fan y col., 2012
		Recubrimiento a base de Q de semillas de maíz, como protector antifúngico en plantas de maíz	Lizárraga-Paulín y col., 2011
		Hidrogel de Q como inhibidor de nitrificación del suelo como la ditiandiamida	Minet y col., 2013
Medic		Microesferas de Q-hidroxiapatita como un posible uso en la administración de	Ding y col., 2012

Baja toxicidad y biocompatibilidad	fármacos y como potencial regenerador de tejido óseo	
	Microesferas de hidrogel biodegradable a base de Q para la liberación controlada de un medicamento contra el VIH	Mallikarjuna y col., 2013
	Biofilm de Q y Q-colágeno como soporte para aplicaciones en ingeniería de tejidos	Zamora-Mora y col., 2010
	Microesferas de Q y Q-curcumina con acción antimicrobiana, con potencial de uso en infecciones de piel	Saranya y col., 2018
	Hidrogel y nanocápsulas de Q para el aumento de adherencia de los capsaicinoides (Capsaicina y dihidrocapsaicina, que se utilizan como analgésicos) a la superficie de la piel	Contri y col., 2014

Agar

El agar es un ficocoloide de origen muy antiguo, se considera que fue descubierto en Japón por Minoya Tarozaemon en 1658. Se vendía y se fabricaba como extracto en forma de gel (frío) o en solución (caliente). El agar es un polisacárido que es ampliamente utilizado en alimentos por su alta capacidad gelificante, además sobresale por la sencillez en su proceso de extracción y obtención. Se extrae de algas marinas rojas como *Gelidium sp.* y *Gracilaria sp.*, el agar se encuentra dentro de la matriz celular del alga. Las algas rojas del género *Gracilaria sp.* son el tercer grupo más grande dentro de las rodofitas (algas rojas), de rápido crecimiento y se distribuyen en aguas someras de regiones tropicales, templadas y frías. Pero principalmente habita en aguas someras de mar abierto en estuarios y lagunas costeras. Por otro lado, el género *Gelidium sp.* es la que utiliza para la obtención de agar a nivel comercial en México.

El agar es un polisacárido que está compuesto principalmente por agarosa y agaropectina, como se presenta en la Figura 5. La agarosa es un polisacárido neutro de estructura lineal de unidades repetidas de agarobiosa formadas por 1,3-β-D-galactosa y 1,4-α-3,6-anhidro-L-galactosa; la agaropectina es un polisacárido ácido que contiene grupos sulfato, ácido pirúvico y ácido D-glucoronico conjugado con agarabinosa (Yarnpakdee y col.,

2015). Este disacárido puede ser sustituido por ésteres de sulfato, ésteres metílicos, metoxilo y residuos de ácido pirúvico. El agar es soluble en agua a temperaturas mayores de 60°C. Debido a su capacidad gelificante y la sencillez en el proceso de extracción Figura 6, se ha señalado el agar como un buen candidato para su uso en materiales plásticos.

El proceso de producción de agar depende del género de alga que se utilice, si se trata del género *Gracilaria* se debe tratar con una solución alcalina el más utilizado para este proceso es NaOH, dando como resultado un agar con mayor resistencia. Para extraer agar del género *Gelidium* se utiliza agua caliente con ácido diluido. Durante el proceso de extracción se requiere de condiciones adecuadas de pH para aumentar la solubilidad del ficocoloide. Una vez que se ha extraído el agar, el proceso de congelación y descongelación, se utiliza para remover la mayor parte de agua presente.

Además, el agar es un polisacárido biodegradable y biocompatible, con alta resistencia mecánica (Madera-Santana y col., 2014). Capaz de formar recubrimiento comestible con propiedades de barrera a la humedad moderada (Kanmani y col., 2014).

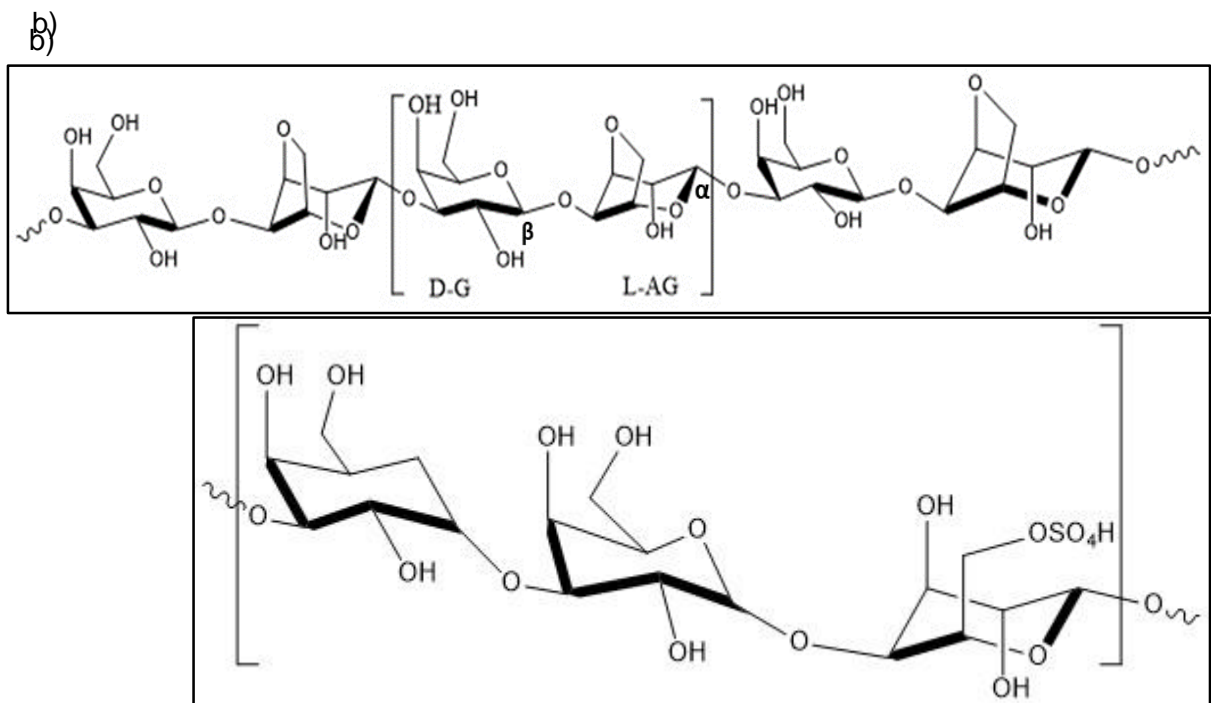
Aplicaciones

El uso industrial de *Gracilaria*, es principalmente como materia prima para la producción de agar, pero además tiene otros usos como fertilizante en la agricultura y además es utilizado para consumirse directamente en diferentes platillos y ensaladas. Las PCs a base de agar es reciente, el agar es capaz de formar PCs transparentes, flexibles y bajo contenido de humedad. Investigaciones sugieren que el agar es capaz de proporcionar una matriz cohesiva y contribuye a mejorar las propiedades mecánicas (Phan y col., 2009). Pruebas de difusión y desorción que se realizaron en películas de agar con extracto de nuez pecana, abre el camino a su posible uso como películas biodegradables con liberación controlada de agentes activos (Madera-Santana y col., 2014).

Se ha utilizado en mezclas de otros biopolímeros tales como almidón, soya, proteínas de leche, arcilla y extracto de pomelo para mejorar las propiedades de barrera y mecánicas (Tian y col., 2011; Wu y col., 2009; Letendre y col., 2002; Rhim, 2011; Kanmani y Rhim, 2014). Además, se ha estudiado la mezcla de agar con nanopartículas de plata y agar-plátano-nanopartículas de plata, para un posible uso como materiales de empaque para prolongar la vida útil (Shankar y Rhim, 2015; Kanmani y Rhim, 2014). Investigaciones realizadas por Phan y col., (2005), probaron que el agar es un buen candidato para aplicarlo en forma de RC o como envase. Sin embargo, pocos trabajos han descrito las propiedades fisicoquímicas de las películas de agar y quitosano, pero se desconoce la acción de la mezcla de estos biopolímeros como RCs y PCs.

Es importante mencionar que el agar bacteriológico es diferente al agar alimenticio, para la elaboración del agar bacteriológico es necesario controlar propiedades fisicoquímicas, además debe ser libre de sustancias hemolíticas y tener ausencia de agentes inhibidores bacterianos; el agar funciona como agente gelificante para los medios sólidos, cuya función principal es evitar interacciones con el resto de los componentes de los medios (peptonas, proteínas, azúcares).

a) Figura 5. Principales componentes del agar: a) la agarosa y b) agaropectina.



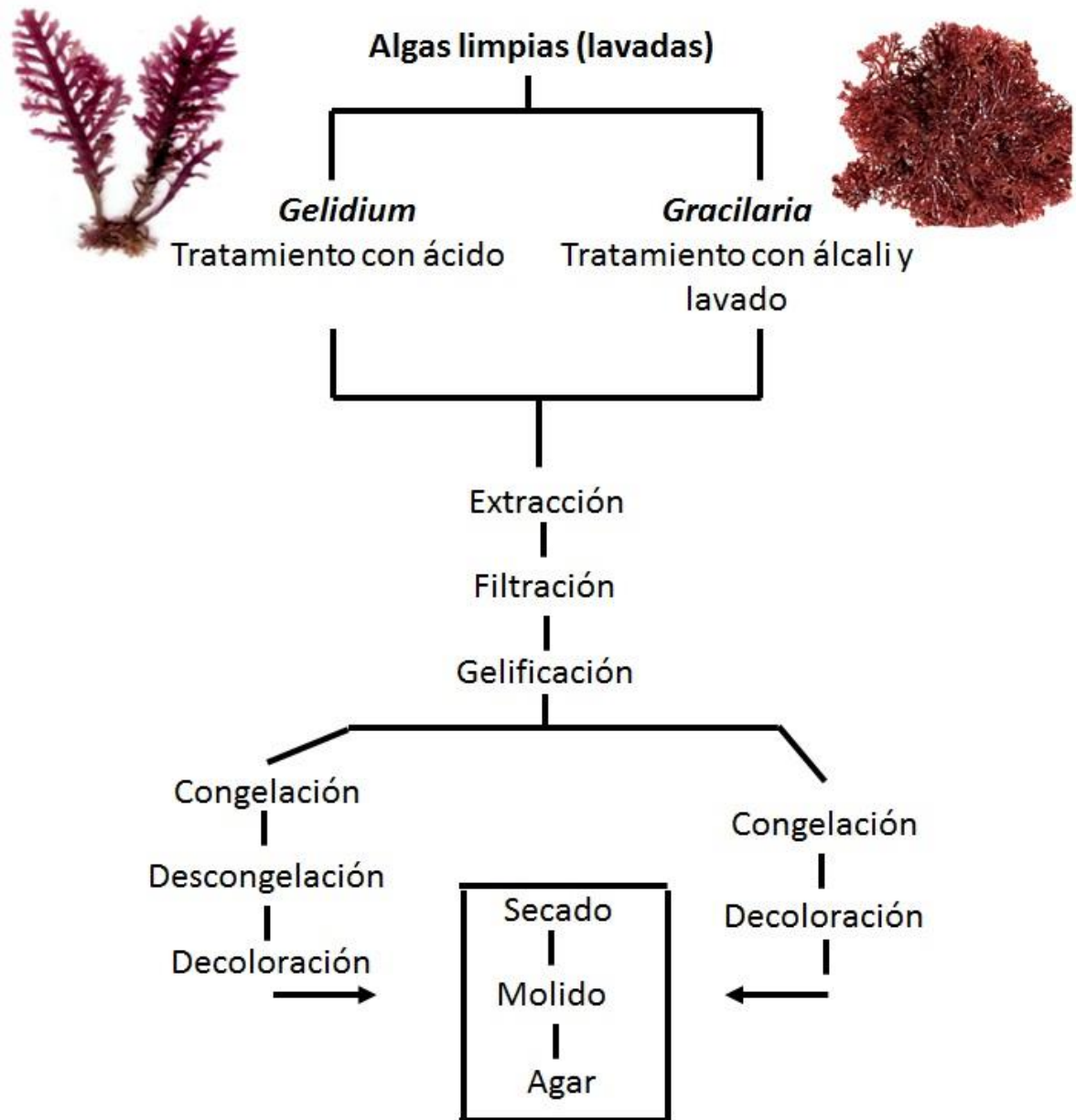


Figura 6. Proceso de obtención de agar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Tomate saladette (*Solanum lycopersicum*) 160 frutos, en su etapa de madurez verde, color uniforme y tamaño, libre de defectos se obtuvieron del mercado local. Los tomates se lavaron y secaron a la superficie.

Quitosano adquirido de Sigma Aldrich Corp. grado desacetilación 75% y Agar se obtuvo de Agarmex, S.A. (México).

Métodos

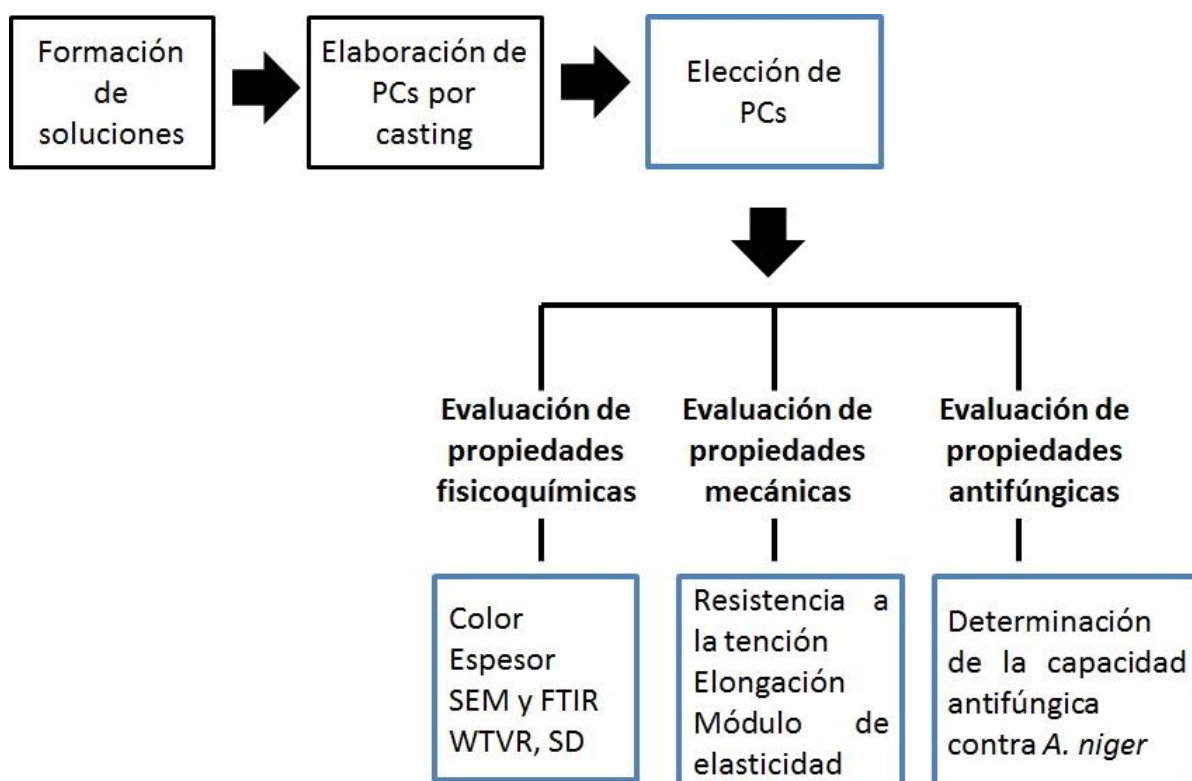


Figura 7. Diagrama de flujo de procedimiento en general de la caracterización y formulación de las diferentes PCs.

Preparación de las soluciones

El agar (A) se preparó en solución acuosa 1% p/p, se disolvió 3 g en 300 mL de agua destilada, a una temperatura de 60°C y en agitación constante durante dos horas. La solución de quitosano (Q) se preparó disolviendo 3 g en ácido acético al 2 % v/v, manteniendo al inicio

una temperatura de 60°C y con agitación constante durante dos horas. Para la mezcla de Q+A se adicionó las soluciones previamente preparadas de Q y A en proporción (50:50). Posteriormente, se sometieron a agitación constante durante 15 min.

Preparación de PCs

Para la preparación de PCs se siguió el método de Casting, con algunas modificaciones. Se distribuyó 150 mL de las soluciones en recipientes de polietileno, se procedió a secar a 60°C por 48 h y con una humedad relativa (HR) de 30%, después se procedió a separar las PCs de los recipientes.

Propiedades ópticas

La transparencia de las películas se determinó con un espectrofotómetro UV-visible (Varian, Cary 50 Bio, EE.UU.). Las muestras de las películas se cortaron en forma rectangular y se colocaron en el lado interno de la celda de medición del espectrofotómetro; se registró el espectro de absorbancia (200-800 nm) de cada probeta. La transparencia de las películas se determinó midiendo la absorbancia a 600 nm (A_{600}). La transparencia en la longitud de la trayectoria de luz unidad se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$Transparencia = \frac{A_{600}}{T}$$

Donde T es el espesor de la película (mm) y A_{600} es la absorbancia 600 nm. La medición se repitió tres veces para cada una de las películas y se calculó el valor medio.

El color de la superficie de las PCs se determinó con un colorímetro MetroCal International Minolta (modelo CR300, Minolta, Tokio, Japón). La escala de color que se empleó es CIE-Lab. Los parámetros que se obtuvieron son luminosidad (L^*), parámetros de color siendo a^* (rojo a verde) y b^* (amarillo a azul). El color se midió tomando en cinco puntos de la parte media de la película comestible. Se empleó un mosaico estándar para calibrar el colorímetro ($Y=92.4$, $X=0.3162$, $y=0.3324$).

Los parámetros para la determinación de la diferencia de color (ΔE) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2}$$

$$\text{Donde } \Delta L^* = L^* - L^*_0, \Delta a^* = a^* - a^*_0, \Delta b^* = b^* - b^*_0$$

Siendo L^*_0 , a^*_0 y b^*_0 representan los valores del parámetro del color del estándar y L^* , a^* y b^* representan los parámetros del color de la muestra.

Análisis morfológico

El análisis morfológico a la superficie se realizó a cada formulación. Para el análisis se utilizó un estereoscopio AmScope modelo MD600E del Laboratorio de Ecología Química de la Coordinación de Ciencias de los Alimentos del CIAD. Las muestras se colocaron sobre una superficie blanca como contraste; las imágenes de la superficie de las muestras se registraron a dos magnificaciones (2.5x), para cada formulación.

Además se realizó un análisis de la morfología de la superficie mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), con la finalidad de observar en las PCs la uniformidad o la incompatibilidad de los biocompuestos. Se utilizó un microscopio electrónico de barrido marca Philips modelo XL30, en su modo ambiental, a diferentes magnificaciones (200x y 500x) que se encuentra en el Laboratorio Nacional de Nano Biomateriales (LANNBIO) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Mérida.

Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se determinaron utilizando probetas rectangulares de 7x1 cm de las diferentes formulaciones de las películas comestibles. Se ensayaron a tensión utilizando un texturómetro de la marca Texture Analyzers Inc. Modelo TX-2 con una celda de carga de 5 kg del Laboratorio de Cereales de la Coordinación de Vegetales del CIAD. Los ensayos se realizaron con una velocidad de cabezal de 0.2 mm/s y se calculó el esfuerzo a tensión mediante fuerza aplicada entre el área de la sección transversal de la muestra. Esta área se calculó del producto del ancho y el espesor de una de las muestras ensayadas. El espesor de cada muestra se midió utilizando un micrómetro Digital Mitutoyo MDC-1"SB. Se determinaron tres parámetros mecánicos para el estudio: resistencia a la tensión, módulo de elasticidad y elongación a la ruptura.

Espectroscopia de infrarrojo (FTIR)

Se utilizaran muestras de PCs con un espesor de 1 mm y se colocarán en un generador de fondo cero (15 rpm) en un porta muestras de Si para evitar la interferencia. Las mediciones se realizaron en ángulos de dispersión (2Θ) que variarán en rangos de tres grados a 60° a

1.2°/ min. Los patrones de XRD de las PCs se registraron usando un difractómetro Siemens D-5000 (Cu K α longitud de onda de 1.5418 Å) operado a 35 kV y 25 mA. Los espectros IR de las PCs se registraron usando un espectrómetro Nicolet Nexus 670 (Madison, WI, EE. UU.). Los espectros se registrarán de 4000 a 400 cm^{-1} con una resolución de 4 cm^{-1} , una velocidad de escaneo de 0.475 cm s^{-1} y 100 escaneos.

Grado de hinchamiento, solubilidad y WVTR de películas

El grado de hinchamiento (DS) y solubilidad (SW) en agua, de las películas se determinaron a partir de probetas de 5x1 cm, las cuales se sumergieron en agua destilada a temperatura ambiente, de acuerdo al método reportado por (Rodríguez-Núñez y col., 2014). Después de obtener el equilibrio (una hora) se retiró la humedad en la superficie de las películas y se midió el peso. El porcentaje de grado de hinchamiento (% DS) de las películas se calculó utilizando la ecuación:

$$\%DS = \frac{w_e - w_o}{w_o} \times 100$$

Donde w_e es el peso de las películas en la absorción de equilibrio, w_o es el peso seco inicial de las películas.

Las PCs se secaron de nuevo durante 24 h a 60 °C, para determinar los porcentajes de solubilidad en agua (% SW), mediante la siguiente ecuación:

$$\%SW = \frac{w_o - w_d}{w_o} \times 100$$

Donde w_o es el peso seco inicial y w_d es el peso seco de las películas después del proceso de secado. Los porcentajes de DS y SW se determinaron por triplicado para cada formulación.

La velocidad de transmisión del vapor de agua (WVTR) y la permeancia al vapor de agua de las películas, se realizó por triplicado de acuerdo al método reportado de la norma ASTM E96/E96M-16 (2016) con ligeras modificaciones. A cada muestra se le midió el área, el peso y el espesor; para posteriormente colocarse en un desecador (con gel de sílice seco) a 25 °C, que mantiene un gradiente de humedad relativa (HR) a través de las películas y agua destilada contenida en cada porta muestra. Una vez que se alcanzaron las condiciones de estado

estable (48 h), se calculó la WVTR a partir de la pendiente de cada muestra, a través de una regresión lineal ($r^2 > 0.99$) usando la ecuación:

$$WVTR = \frac{w}{t \cdot A}$$

Donde t es el tiempo en horas, w es la pendiente y A es el área de la sección de transporte de la celda ($A=2.85 \times 10^{-4} \text{ m}^2$).

Otro parámetro de transporte que se calculó es permeancia al vapor de agua, a partir del cálculo de la WVTR y del gradiente de la presión de vapor existente durante la prueba:

$$\text{Permeancia} = \frac{WVTR}{\Delta P}$$

Donde es ΔP la presión de vapor en mm Hg, WVTR es la velocidad de transmisión del vapor de agua g/h.

Actividad fungistática

Una vez preparadas las películas, se cortaron en trozos de 2.5 cm de diámetro y se esterilizaron por exposición a la luz ultravioleta durante 5 min por cada lado. Posteriormente, se inocularon con una concentración de 1×10^5 esporas de *Aspergillus niger* y se incubaron por cinco horas a 28 °C. Se determinó el diámetro de esporas e hifas.

Análisis morfométrico de hifas y esporas

El diámetro de las esporas y las hifas de *A. niger* se determinó de acuerdo al método descrito por (Martínez-Camacho y col., 2010) utilizando un microscopio óptico (Olympus CX31, Japón) con el objetivo de 40x conectado a una cámara Infinity 1 (Media Cybernetics, EE.UU.), mediante análisis de imagen utilizando el software Image-Pro Plus versión 6.3 (2008 Media Cybernetics Inc., EE. UU.).

Análisis de esporas

Las muestras se tomaron y se contaron 200 esporas (germinadas, polarizadas y no germinadas) se contaron al azar usando microscopio óptico. Se determinó el número de

esporas germinadas por placa; una espora se consideró germinada cuando la longitud de su tubo germinal alcanzó la mitad de los diámetros de las esporas, las esporas polarizadas son aquellas que pierden la forma redonda característica (Martínez-Camacho col., 2010). Se calculó el índice fungistático a 28 °C empleando la ecuación:

$$\% \text{Germinación} = \frac{\text{esporas germinadas}}{200} \times 100$$

Donde las *esporas germinadas* es el total de esporas contadas germinadas, 200 es el total de esporas contadas (germinadas, polarizadas y no germinadas).

$$\% \text{Polarización} = \frac{\text{esporas polarizadas}}{200} \times 100$$

Donde las *esporas polarizadas* es el total de esporas contadas polarizadas, 200 es el total de esporas contadas (germinadas, polarizadas y no germinadas).

$$\% \text{Esporas no germinadas} = \frac{\text{esporas no germinadas}}{200} \times 100$$

Donde las *esporas no germinadas* es el total de esporas contadas no germinadas, 200 es el total de esporas contadas (germinadas, polarizadas y no germinadas).

Análisis estadístico

Las variables ópticas, de barrera, mecánicas, térmicas y antifúngicas de cada película se analizaron con el programa Microcal Origin versión 8.0 de Microcal Software. Los datos se estudiaron con el análisis de la varianza, ANOVA de una vía en un diseño completamente al azar para encontrar diferencias significativas, con un nivel de significancia de 5%.

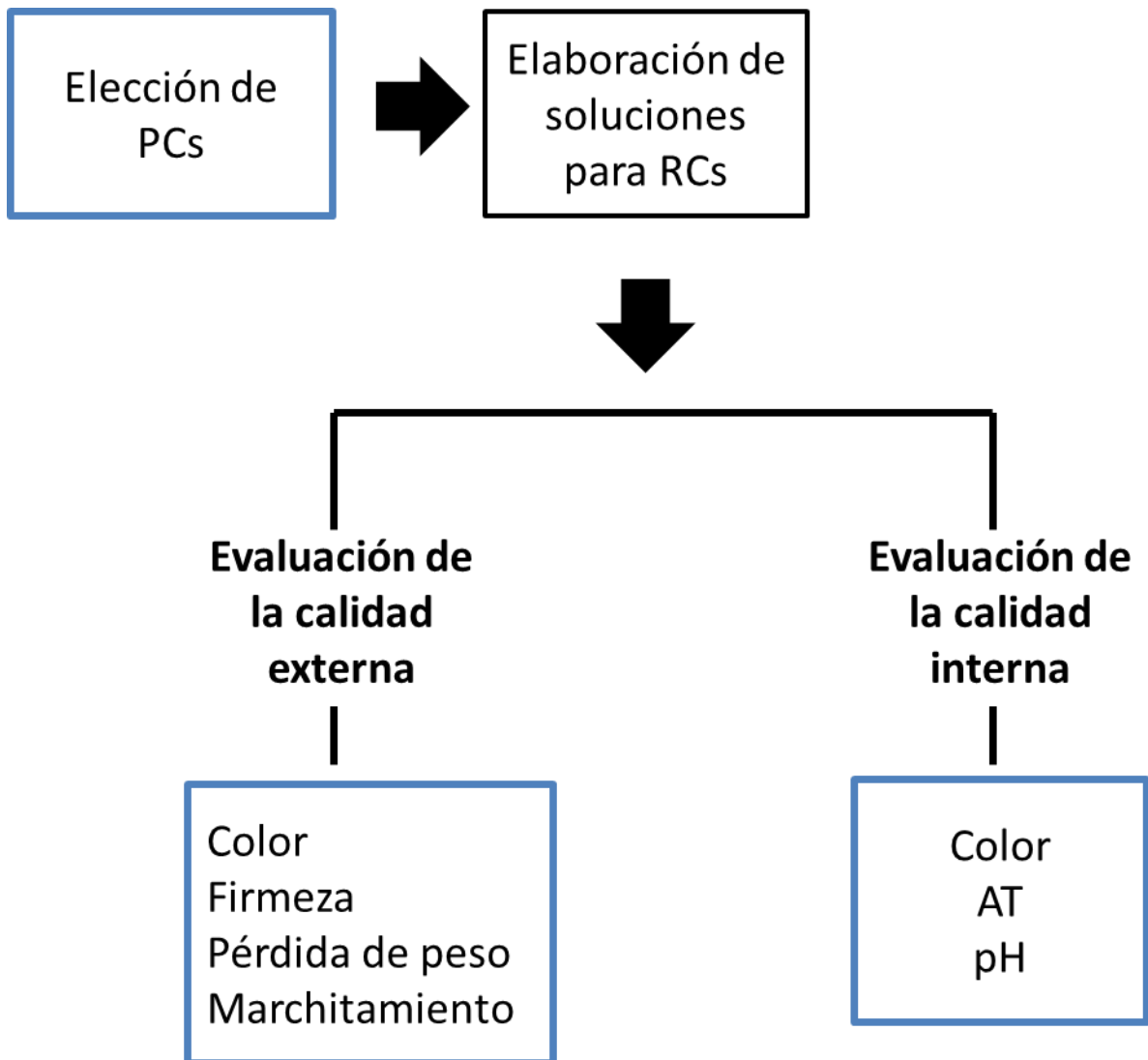


Figura 8. Diagrama de flujo del procedimiento en general de las diferentes formulaciones de RCs y caracterización.

Aplicación de RCs y almacenamiento

Se seleccionó 160 frutos de tomate Saladette (*Solanum lycopersicum*), en su etapa de madurez verde, color uniforme y tamaño. Se lavaron con detergente biodegradable, se desinfectaron con hipoclorito de calcio 200 ppm y se secaron a temperatura ambiente. Después de la selección y clasificación se recubrió, y se dejó secar a temperatura ambiente. Fruta sin revestir se utilizó como control, se colocó cuatro grupos de 40 frutos cada uno, que corresponden a los tres tratamientos de RCs y un control (Fruta sin revestir) en bandejas de plástico se desinfectaron previamente y se almacenó los frutos recubiertos y sin revestir hasta

14 días a 13 °C con 90-95% de humedad relativa, seguido de siete días a 20 °C con 90-95% de humedad relativa.

Calidad interna

Los atributos de calidad interna que se evaluaron son acidez titulable (AT) y pH del jugo de tomate. Estos análisis se determinaron en un titulador automático Mettler DL21. Se preparó un extracto de 10 g de tomate con 50 mL de agua destilada. Se filtró el extracto y se tomó una alícuota de 50 mL del extracto, se valoró con una solución de NaOH 0.1 N hasta un punto final de pH 8.2. El resultado de acidez titulable se expresó como el porcentaje de ácido cítrico presente en la muestra y el de pH en unidades de pH. Para cada tratamiento se prepararon tres muestras de jugo y se realizó tres lecturas diferentes el día cero y al final del almacenamiento a 13 °C y 20 °C.

Pérdida de peso

Lotes de 10 frutos por cada tratamiento se utilizaron para medir la pérdida de peso. Los mismos frutos marcados, se pesaron el día cero y al final del almacenamiento a 13 °C y 20 °C. Los resultados se expresaron como el porcentaje del peso inicial perdido.

$$\% \text{ de pérdida de peso} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100$$

Color de la piel y pulpa

Color de la piel y pulpa de los tomates *Saladette* se midió con un colorímetro Minolta (Modelo CR300, Tokio, Japón) en 10 frutos por tratamiento. La escala que se utilizará es CIE parámetros de color luminosidad (L^*), croma (C) y ángulo de tono (h°). El color en cáscara se midió tomando en tres puntos de la parte media de cada tomate *var. Saladette* el día cero y al final del almacenamiento a 13 °C y 20 °C. El color de pulpa se midió en la zona transversal del fruto el día cero y al final del almacenamiento a 13 °C y 20 °C. Un mosaico estándar ($Y=92.4$, $X=0.3162$, $y=0.3324$) se empleó para calibrar el colorímetro.

Firmeza de la fruta

La firmeza de la fruta se determinó a 4 frutos por muestreo, a partir del día cero y al final del almacenamiento a 13 °C y 20 °C utilizando un penetrómetro Chatillon (Modelo DFM-50) equipado con punzón cónico de 8 mm de diámetro. La medición se realizó en 2 puntos de la zona ecuatorial del fruto. Los resultados se expresaron en Newtons (N).

Análisis subjetivo

Se evaluó daños mecánicos, pudriciones y marchitamiento, a los mismos frutos de pérdida de peso y color, el día cero y al final del almacenamiento a 13 °C y 20 °C. Se utilizó la escala Adel Kader para la evaluación de daño mecánico de uno a cinco, donde 1= sin daño, 2= daño ligero (10%), 3= daño moderado (25%) y 4= daño severo (50%) y 5= daño extremo (75%). En pudriciones se utilizó la escala de cero a uno, donde 0= sin pudrición (0%) y 1= con pudrición (>0%). En marchitamiento se utilizó la escala de uno a cinco, donde 1= sin deshidratación (0%), 2= deshidratación ligera (10%), 3= deshidratación moderada (25%), 4= deshidratación moderadamente grave (50%) y 5= deshidratación grave (75%) en base a la escala Marita Cantwell.

Análisis estadístico

Las variables ópticas, de pérdida de peso, AT, pH, color externo, color interno y firmeza del tomate recubierto y sin recubrir, durante su almacenamiento a 13 °C se analizaron con el programa Microcal Origin versión 8.0 de Microcal Software. Los datos se estudiaron con el análisis de la varianza, ANOVA con un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x4 con dos factores: factor tiempo (0 días y 14 días) y factor tratamiento (Testigo, Agar (A), Quitosano (Q) y Q+A) para encontrar diferencias significativas.

Las variables ópticas, de pérdida de peso, AT, pH, color externo, color interno y firmeza del tomate recubierto y sin recubrir, durante su almacenamiento a 20 °C se analizaron con el programa Microcal Origin versión 8.0 de Microcal Software. Los datos se estudiaron con el análisis de la varianza, ANOVA de una vía en un diseño completamente al azar para encontrar diferencias significativas.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Propiedades ópticas

Con respecto a las propiedades ópticas, la mezcla de Q+A mostró un incremento en los valores de luminosidad (L^*), a^* y de b^* con respecto a las PCs de sólo Q y A, como se muestra en la Tabla 2. Esto indica que la mezcla Q+A muestra un color más amarillo (b^*) en comparación a los biopolímeros individuales y una tendencia a verde (a^*) al igual que las otras PCs; sin embargo, en la mezcla se observa en una mayor proporción. En el parámetro de ΔE , la PC de A y Q+A muestra un aumento significativo en comparación a las películas de Q. Por otra parte, la transparencia en la película de Q fue superior al de las otras PCs que incluyeron agar en su formulación, se puede atribuir a que el agar es ligeramente opaco.

Tabla 2. Propiedades ópticas de las películas formuladas[†].

Tratamiento	L^*	a^*	b^*	ΔE	Transparencia
Quitosano (Q)	92.8 ± 0.5 ^{b, c}	-1.3 ± 0.2 ^{c, b}	$8.9 \pm .1$ ^{b, c}	5.8 ± 0.4 ^{b, c}	1.8 ± 0.1 ^b
Agar (A)	91.6 ± 1.2 ^{a, c}	-2.7 ± 0.1 ^{c, a}	1.6 ± 0.08 ^{a, c}	8.06 ± 0.9 ^a	1.3 ± 0.1 ^a
Q+A	94.8 ± 0.2 ^{b, a}	-6.4 ± 0.2 ^{b, a}	14.5 ± 0.6 ^{b, a}	8.1 ± 0.6 ^a	1.4 ± 0.1 ^a

[†] Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En el Anexo 1 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado a los diferentes parámetros que se presentan en la Tabla 2.

Análisis morfológico

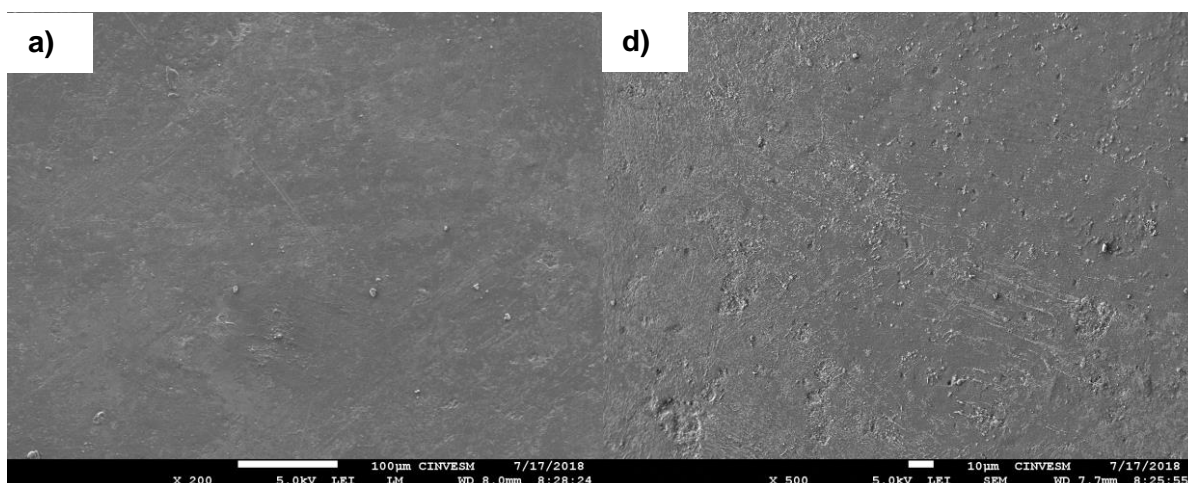
En la Figura 9 se muestran las imágenes de la superficie de las películas formuladas a la magnificación de 2.5x. Las PCs de A y de la mezcla Q+A presentan una superficie más homogénea. Es importante señalar, que en el caso de quitosano debido a su transparencia, fue difícil realizar esta observación. Como se muestra en la imagen de la Figura 9 se observan marcas blancas debido al reflejo de la luz del estereoscopio.



Figura 9. Morfología de la superficie de las películas formuladas a una magnificación de 2.5x: (a) Agar, (b) Quitosano, (c) Q+A.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La morfología superficial de las PCs de Q, Figura 10(a,d) muestra una superficie lisa sin embargo, a una mayor magnificación se observan algunas irregularidades, como son microporos y adyacentes a superficies lisas. Por otro lado, en las PCs de A, Figura 10(b,e) se muestra uniformidad en la superficie, la cual es lisa sin hendiduras y poros. En contraste, en la Figura 10(c,f), se muestra la mezcla Q+A, en donde la superficie indica que tanto el Q como el A se mezclaron a nivel microestructural ya que no se ven evidencias de separación de fases; se observan algunas irregularidades, como son los poros en la superficie. Estos poros se puede deber a la evaporación del solvente del quitosano (ácido acético) que posee una menor presión de evaporación con el agua. Las PCs muestran cierto grado uniformidad, por lo cual hace posible su uso como envase de alimentos.



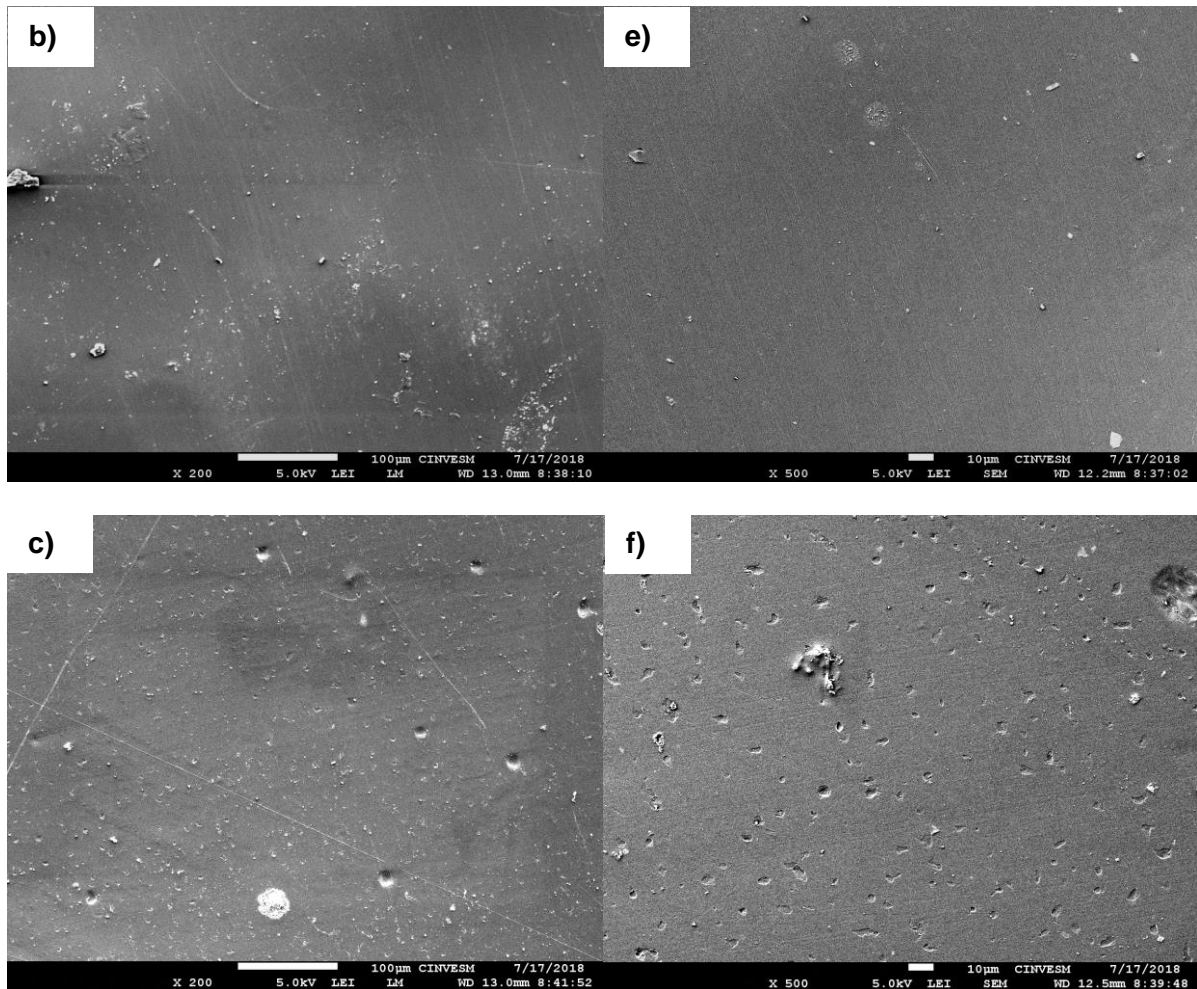


Figura 10. Morfología de la superficie de las películas formuladas a una magnificación de 200x (a) Quitosano, (b) Agar, (c) Q+A y 500x: (d) Quitosano, (e) Agar, (f) Q+A.

Propiedades mecánicas

Los resultados de las propiedades mecánicas de las películas se muestran en la Tabla 3. La mezcla de Q+A presentó las mejores propiedades mecánicas en comparación a los biopolímeros individuales, ya presentan mayores valores de esfuerzo máximo y elongación a la ruptura. Esto indica que la mezcla de ambos biopolímeros posee una sinergia en estos parámetros mecánicos. En cuanto al módulo de elasticidad, la PC de Q+A fue menor en comparación a los biopolímeros en su forma individual, lo cual indica que la mezcla disminuye la rigidez de las películas y por tanto incrementa su flexibilidad. Lo anterior permite que la mezcla tenga utilidad para una posterior aplicación en forma de RCs, ya que la flexibilidad ayudará a mejorar la adherencia en las frutas y verduras.

Tabla 3. Propiedades mecánicas de las películas formuladas[†].

† Tratamiento	Esfuerzo máximo (MPa)	Elongación a la ruptura (%)	Módulo de elasticidad (MPa)
Qitosano (Q)	2,722 ± 399 ^c	2.20 ± 0.81 ^a	2,330 ± 932 ^a
Agar (A)	3,556 ± 394 ^c	2.11 ± 0.28 ^b	3,047 ± 856 ^c
Q+A	6,905 ± 1,738 ^{a, b}	3.79 ± 1.46 ^c	1,537 ± 362 ^b

Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En el Anexo 2, se presenta los resultados de los análisis de varianza realizados a los datos correspondientes de la Tabla 3.

Espectrometría de infrarrojo (FTIR)

Los espectros de IR de las PCs de Q se presentan en la Figura 11, en estos espectros se observa una banda de absorción en la región entre 3600 y 3000 cm^{-1} , la cual corresponde al enlace del grupo hidroxilo (O-H), así como al estiramiento asimétrico y simétrico de enlaces N-H en el grupo amino; ambos grupos funcionales presentan una señal primaria en esta región. Las bandas presentes en las regiones de 2350, 1650, 1420 y 1200 cm^{-1} , corresponden a vibraciones asimétricas del CH_2 pertenecientes del anillo de hidratos de carbono (carbohidratos). Las PCs de Q+A muestra una banda de absorción en la región entre 3700 y 3500 cm^{-1} , que como se mencionó anteriormente corresponden a los enlaces de grupos hidroxilo (O-H) y al estiramiento asimétrico y simétrico de enlaces N-H en el grupo amino. Por otro lado, las bandas presentes en las regiones de 2450 cm^{-1} y 1376 cm^{-1} se deben a los enlaces (C-C) y a las vibraciones asimétricas del CH_2 pertenecientes del anillo de los carbohidratos. En las PCs de A se puede apreciar una banda intensiva a 1640 cm^{-1} debido al estiramiento del péptido conjugado formado por el grupo amina (NH) y carbonilo (C = O). Se observó un comportamiento similar para el pico a 1370 cm^{-1} , que está asociado con éster sulfato.

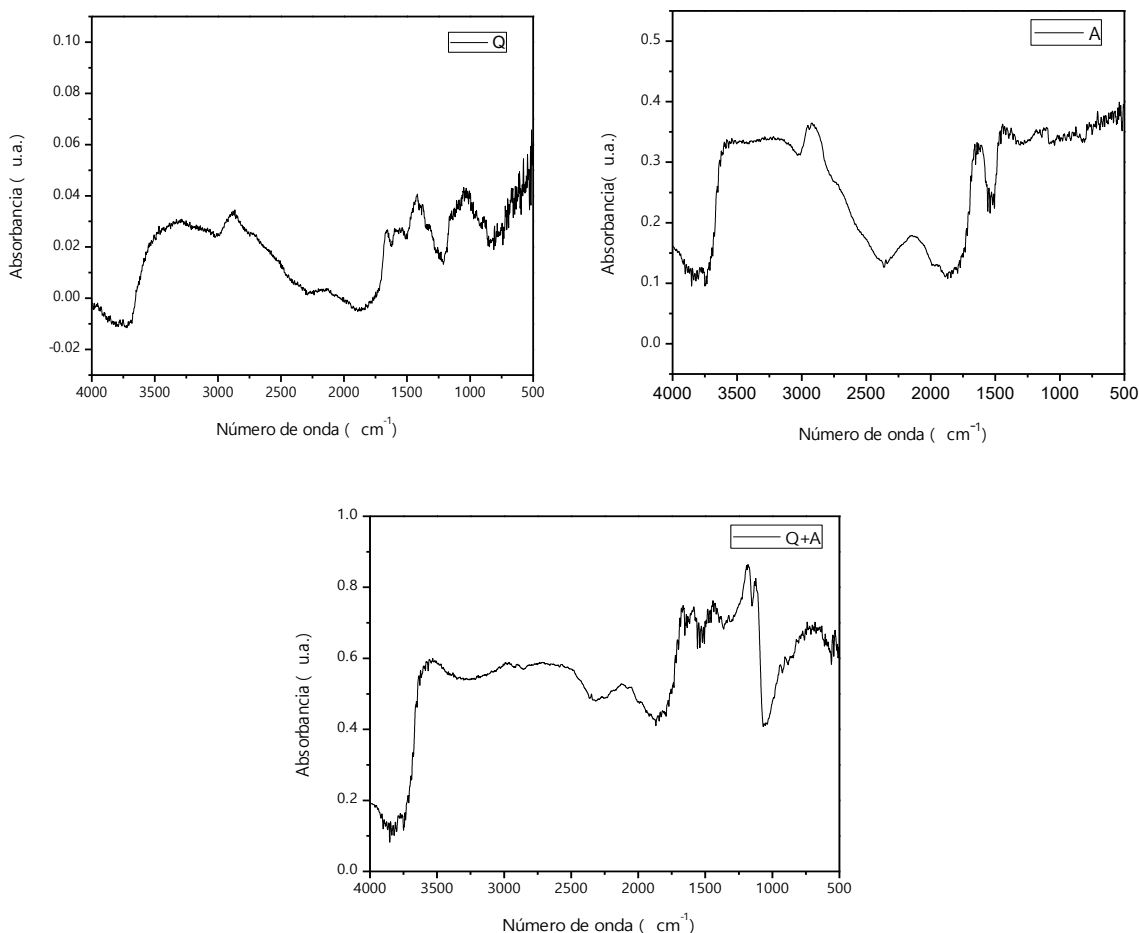


Figura 11. Espectros de FTIR: (Q) Qitosano, (A) Agar, (Q+A) Qitosano+Agar.

Grado de hinchamiento, solubilidad y WVTR de películas

Las PCs de Q y Q+A exhibieron menores valores de grado de hinchamiento (%DS), como se observa en la Tabla 4, en comparación con las películas de A. Lo anterior, se puede explicar debido a la presencia del quitosano, la cual tiene un menor carácter hidrofílico en comparación con el agar. La película de Q+A presentó un incremento en los valores de solubilidad en agua (%SW) con respecto a las PCs Q y A, tal característica indica que los componentes de la película se disuelven con mayor facilidad, pudiéndose ser aprovechada en la aplicación de RCs. Por otra parte, en cuanto a los valores de permeancia y WVTR en películas de Q+A y Q mostraron menores valores, en comparación con la PC de agar. La presencia del quitosano en la mezcla Q+A es beneficioso ya que disminuye los valores de WVTR, resultado de la reticulación entre las moléculas de quitosano con agar, transformando una molécula hidrofílica en una más hidrófoba. Esta característica la convierte en una película o recubrimiento

apropiado para una posible aplicación en empaque, en especial en un entorno altamente húmedo, lo cual sería funcional en la industria alimenticia para mantener la integridad de frutas o verduras. Resultados similares fueron reportados por Rodríguez-Núñez y col., (2014); Xu y col., (2005); Escárcega-Galaz y col., (2018).

Tabla 4. Valores del grado de hinchamiento, solubilidad, WVTR y permeancia[†].

Tratamiento	%DS	%SW	WVTR (g/m ² h)	Permeancia (g/m ² h mm Hg)
Quitosano (Q)	217.4 ± 53.6 ^a	19.7 ± 1.7 ^a	57.0 ± 0.7 ^b	3.0 ± 0.2 ^b
Agar (A)	235.0 ± 17.3 ^a	14.8 ± 2.6 ^a	68.5 ± 4.8 ^{a,c}	3.6 ± 0.1 ^{b,c}
Q+A	196.5 ± 63.4 ^a	31.3 ± 2.2 ^a	58.0 ± 0.6 ^b	3.1 ± 0.1 ^b

[†] Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa (p<0.05).

En el Anexo 3 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado a los diferentes parámetros que se presentan en la Tabla 4.

Análisis morfométrico de hifas-esporas y de germinación de esporas

El efecto inhibitorio de Q hacia *A. niger* ha sido objeto de estudio en otras investigaciones (Martínez-Camacho y col., 2010; Plascencia-Jatomea y col., 2003; Yien y col., 2012; Li y col., 2008). Los resultados del análisis morfométrico de las hifa-esporas se muestran en la Tabla 5, donde la mezcla de Q+A y Q mostró un buen efecto inhibitorio en germinación de esporas en comparación con la de A. El efecto inhibitorio de la germinación de esporas de Q fue de un 100% y en el caso de la mezcla Q+A fue de un 90%. Los resultados indican que si bien hubo desarrollo de *A. niger* en las PCs que contenían Q, sin embargo se observó que el Q tuvo efecto inhibitorio durante la etapa de germinación. La razón del efecto inhibitorio se puede deber al peso molecular, temperatura y concentración del quitosano utilizado, ya que en investigaciones anteriores demostraron que entre menor sea el peso molecular de Q tiene mayor efecto inhibitorio, por tal razón durante este estudio se utilizó Q de peso molecular medio. Además, otras investigaciones realizadas por Sebti y col., (2005) mostraron que Q al 1% p/v tenía buen efecto inhibitorio contra *A. niger*. El efecto inhibitorio de Q podría aplicarse para el uso de RCs y PCs, un ejemplo de ello es en el uso de Q como PCs como lo reporta Jeon y col., (2002).

Tabla 5. Valores del diámetro de esporas, diámetro de hifas, esporas germinadas, polarizadas y no germinadas.

Tratamiento	Diámetro de esporas (μm) a 5 h	Diámetro de hifas (μm) a 5 h	%Germinación	%Polarización	% Esporas no germinadas
Quitosano (Q)	6.10 \pm 0.61 ^b	N.D.	N.D.	N.D.	100%
Agar (A)	6.81 \pm 0.86 ^a	3.61 \pm 0.66 ^a	27%	33%	40%
Q+A	5.94 \pm 0.89 ^b	3.62 \pm 0.61 ^a	3%	7%	90%

† Literales diferentes en la misma columna indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

En el Anexo 4 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado a los diferentes parámetros que se presentan en la Tabla 5.

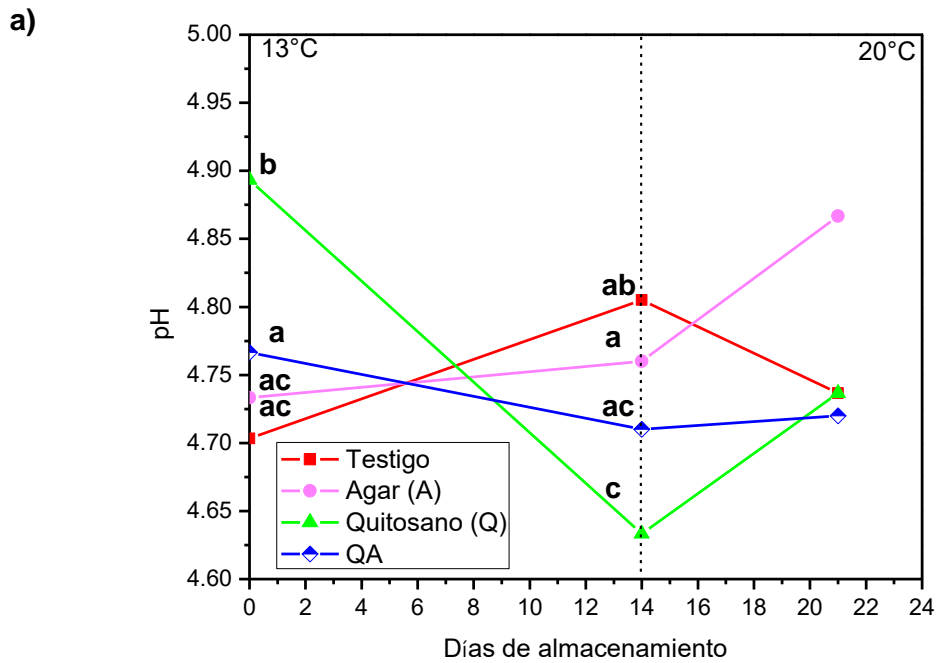
Calidad interna

A continuación se presentan los resultados y la discusión de la evaluación de los recubrimientos comestibles (RCs) en el tomate (*Solanum lycopersicum*) var. Saladette. Los recubrimientos A, Q, Q+A no produjeron un gran cambio de pH y la acidez titulable (AT) hasta los 21 días, pero si produjeron cambios significativos durante el almacenamiento a 13 °C, los RCs mostraron un menor valor de AT y pH en tomate var. Saladette Figura 12. En las muestras Testigo y las recubiertas con Agar, se observa que el pH aumenta mínimamente durante el almacenamiento a 13 °C y 20 °C; mientras que la AT disminuye con durante el almacenamiento a 20 °C. Los RCs de Q y Q+A presentaron una disminución aumenta mínimamente durante el almacenamiento a 13 °C el almacenamiento. Esto indica, que el aumento en el contenido de azúcares solubles y provoca una disminución en la cantidad de ácidos orgánicos.

Los cambios que se presentan en la calidad interna de los frutos dependen del recubrimiento comestible, no obstante algunos autores no han encontrado diferencias en los parámetros (Baldwin y col., 1995; Obenland y col., 2008), después de haber aplicado el revestimiento a diferentes cítricos. Fraudes y col., (2015) reportan una disminución en AT y aumento sólidos solubles totales (SSC) en la aplicación de recubrimiento con benzoato de sodio aplicado en tomate cherry. Otros autores que han trabajado con tomate (Ali y col., 2010;

Yaman y Bayoindirli, 2002) reportan que la aplicación de un RC, provoca una reducción en SSC (Togrul y Arslan, 2004), estos autores reportaron que obtuvieron reducciones mínimas en los parámetros SSC y AT en mandarina en comparación del testigo fruto sin revestir.

En el Anexo 5 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado a estos parámetros (pH y AT) a 13 °C y 20 °C.



b)

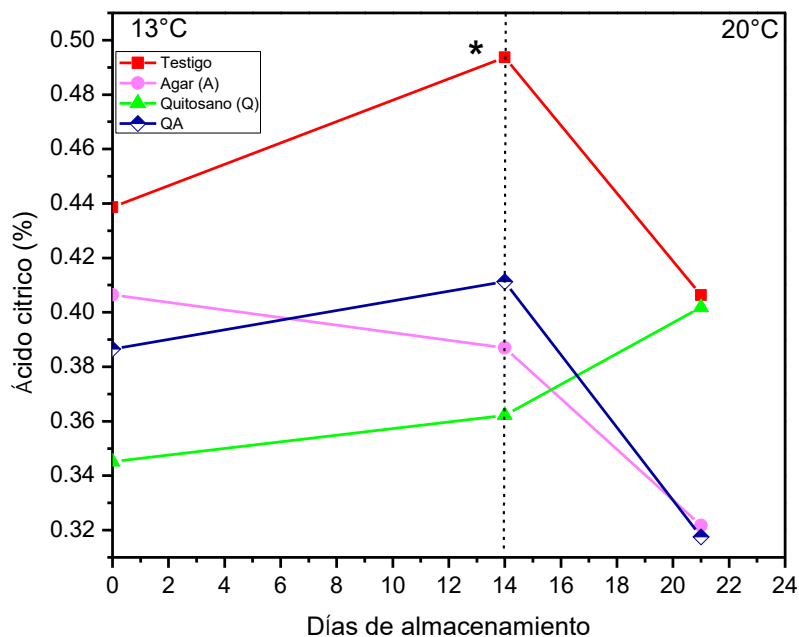


Figura 12. Efecto de los recubrimientos (a) pH y (b) AT en fruto de tomate durante el almacenamiento (14 días 13 °C + 7 días a 20 °C, 90-95% de humedad relativa).

Pérdida de peso

Los recubrimientos redujeron la pérdida de peso en comparación con el control (fruto sin revestir), durante el almacenamiento a 13°C 14 días+ 7 días a 20°C, los resultados son presentados en la Figura 13. Se observó que la pérdida de peso en los tratamientos fue aumentando gradualmente con los días de almacenamiento. Se ha reportado, que la pérdida de peso en los productos vegetales es por el proceso de respiración, es decir, se debe a la transpiración y la pérdida de átomo de carbono de la fruta en cada ciclo de la respiración (Bhowmik y Pan, 1992). De los resultados de la Figura 13, donde la mezcla Q+A redujo un 2.3% la pérdida de peso durante el almacenamiento en comparación al testigo (fruto sin revestir). El tratamiento que obtuvo menor pérdida de peso fue el Q, el cual logró disminuir en un 3.3% en comparación a control. En el Anexo 6 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado a la pérdida de peso de las muestras a 13 °C y 20 °C.

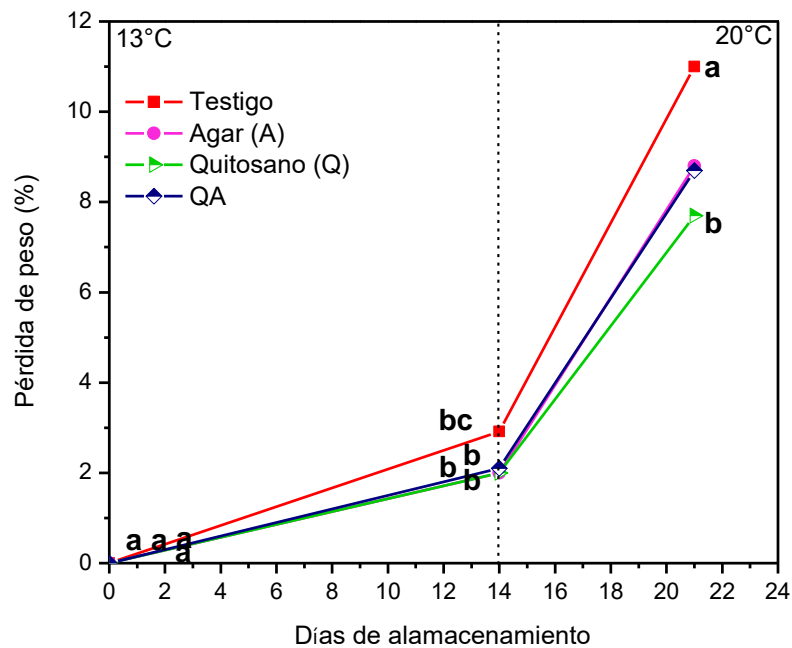


Figura 13. Efecto de los recubrimientos en la pérdida de peso (%) en fruto de tomate durante el almacenamiento (14 días 13 °C + 7 días a 20 °C, 90-95% de humedad relativa).

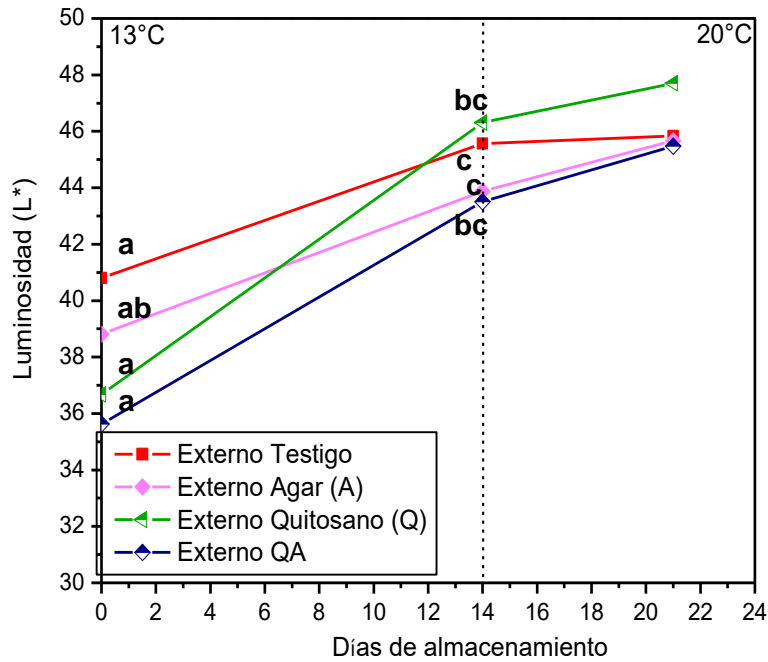
Color de la piel y pulpa

El color es uno de los principales atributos de los frutos que muestran la calidad, el cambio de color perdura después de la cosecha, puede ser deseable o indeseable para el consumidor. En tomates, en particular el de la *var. Saladette*, el color rojo es el aspecto más importante en la calidad de comercialización. Este color es el resultado de una mezcla de pigmentos carotenoides, donde el más abundante es el licopeno (rojo), seguido de carotenos (amarillo a naranja) y xantofilas (amarillo) (López-Vidal y col., 2001). En frutos como el tomate la pérdida de clorofila (color verde) es deseable. Las Figuras 14, 15 y 16 representan los parámetros de color CIE-Lab de las muestras de tomate *var. Saladette* con recubrimiento y sin recubrimiento después de 21 días de almacenamiento. En muestras sin revestir se observa una disminución de h° , en L^* color externo e interno durante el almacenamiento y un aumento en C° . Los recubrimientos ayudaron a retrasar la disminución del ángulo de tono a 13 °C, durante el almacenamiento a 20 °C el recubrimiento Q+A presentó menor disminución ángulo de tono en cáscara. El RC de agar presenta un comportamiento anormal en el día 14 Figura 17, los frutos

tenían un color rojo en piel y en pulpa un color verde, esto se debe aún defecto del fruto, que era difícil de predecir, ya que al inicio del experimento están en un estado de madurez verde.

En el Anexo 7 se presentan los resultados del análisis de varianza realizado a los parámetros de color externo e interno en tomate *var. Saladette* a 13 °C y 20 °C

a)



b)

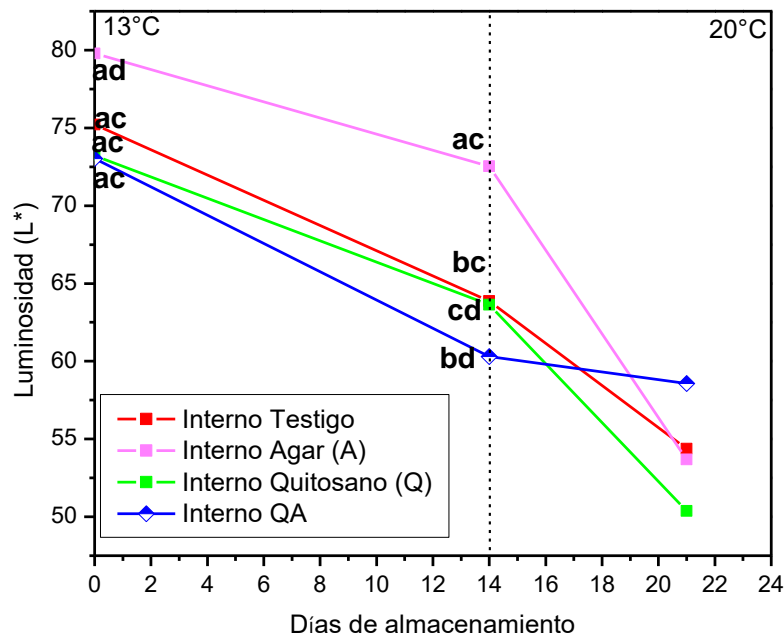
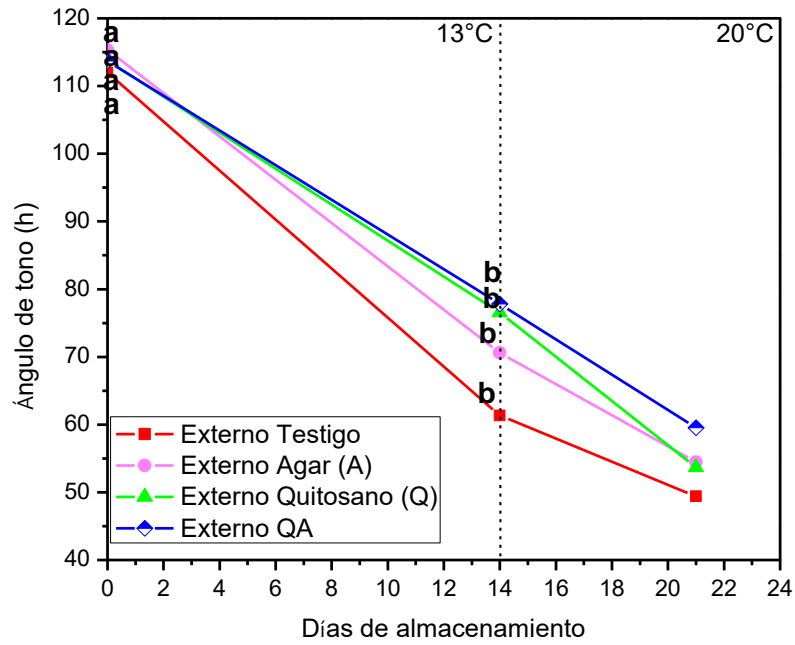


Figura 14. Efecto de los recubrimientos en luminosidad externo (a) e interno (b) en fruto de tomate durante el almacenamiento (14 días 13 °C + 7 días a 20 °C, 90-95% de humedad relativa).

a)



b)

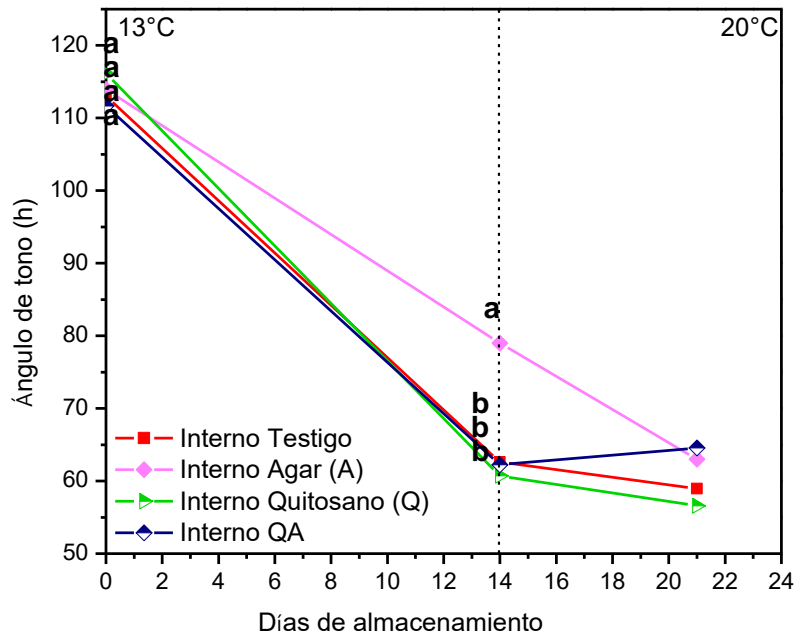
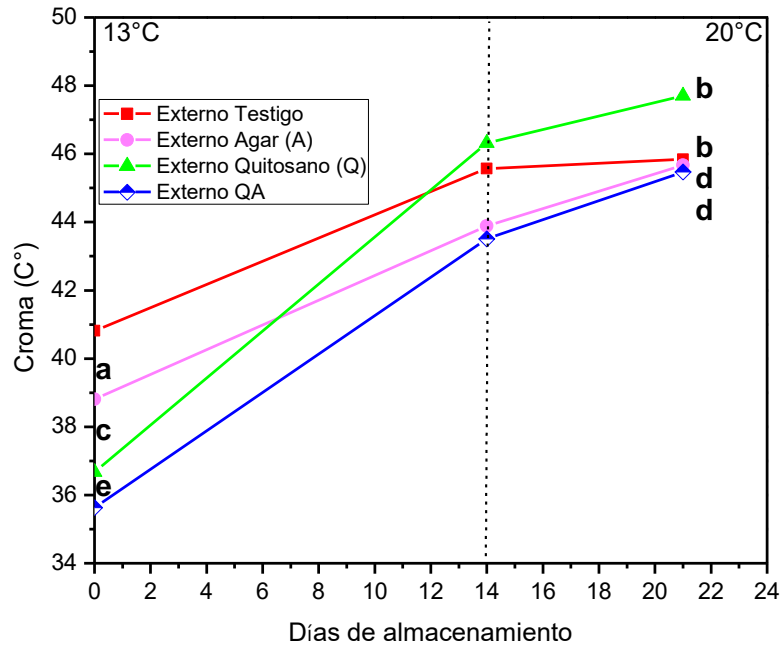


Figura 15. Efecto de los recubrimientos en ángulo de tono externo (a) e interno (b) en fruto de tomate durante el almacenamiento (14 días 13 °C + 7 días a 20 °C, 90-95% de humedad relativa).

a)



b)

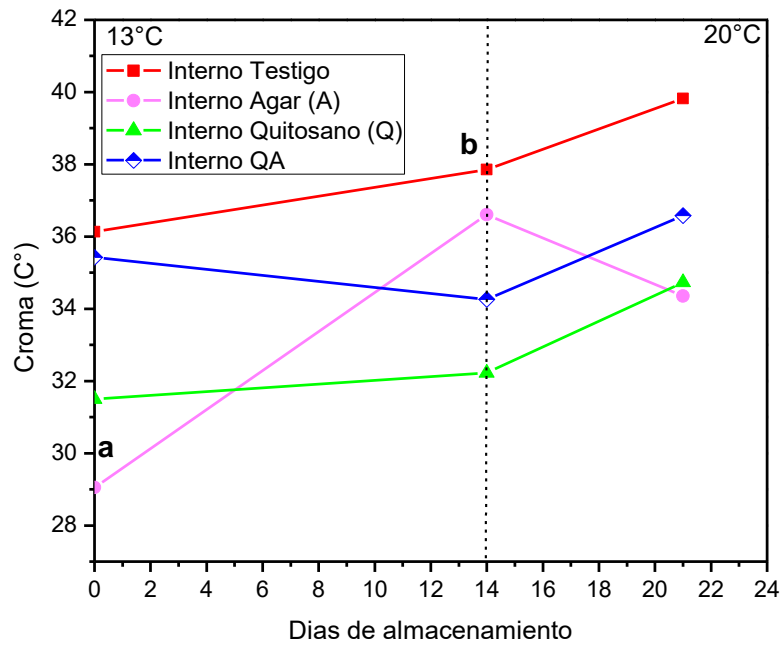


Figura 16. Efecto de los recubrimientos en croma externo (a) e interno (b) en fruto de tomate durante el almacenamiento (14 días 13 °C + 7 días a 20 °C, 90-95% de humedad relativa).

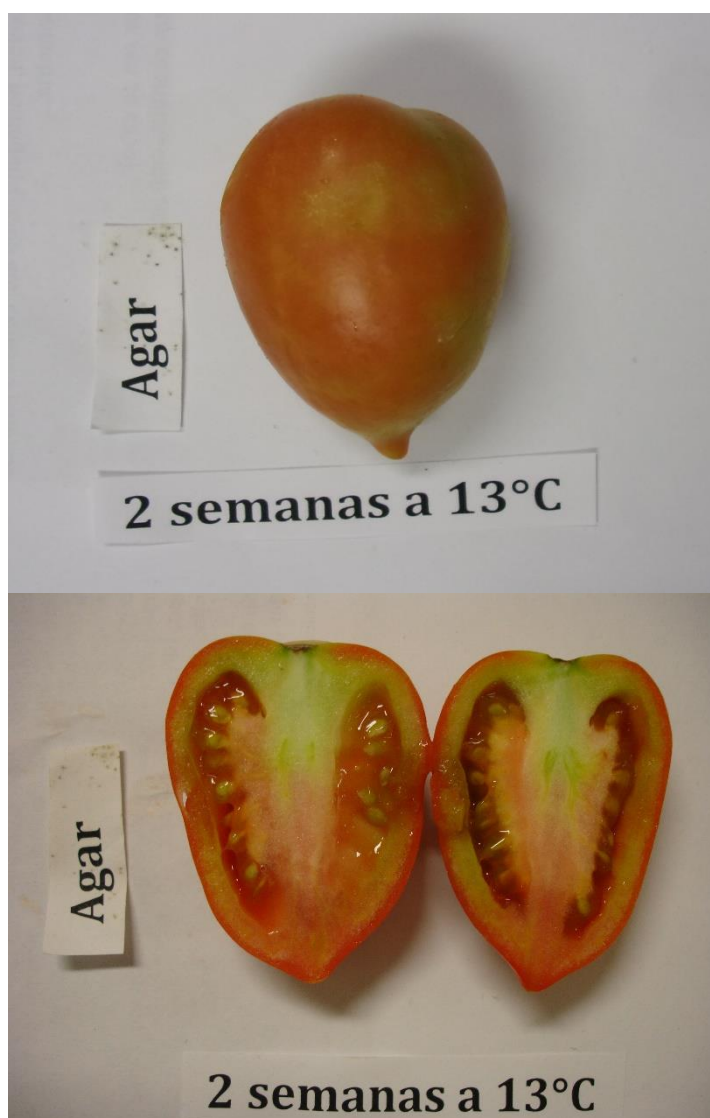


Figura 17.

Agar día 14 de

almacenamiento 13°C.

Firmeza

La firmeza de la fruta disminuyó con el tiempo de almacenamiento a 13 °C y 20 °C, los valores de firmeza son expresados en Newtons (N), representados en la Figura 18. El valor máximo de firmeza en tomate recubierto recubrimiento ha sido para los tratamientos con A y Q+A, este

comportamiento se mantiene hasta el día 14, posteriormente no se encontraron diferencias significativas entre el tomate recubierto y el testigo sin recubrir.

Los cambios texturales que experimenta el fruto durante la maduración se acompaña de importantes modificaciones en la composición y estructura de las paredes celulares y particularmente de la degradación de los polisacáridos que la constituyen. El debilitamiento de las paredes celulares asociado con la maduración se correlaciona con un incremento en la actividad celulasa y poligalacturonasa, que catalizan la hidrólisis de la celulosa y la pectina, los principales componentes de la pared celular de fruto de tomate (Reinders y Thier, 1999).

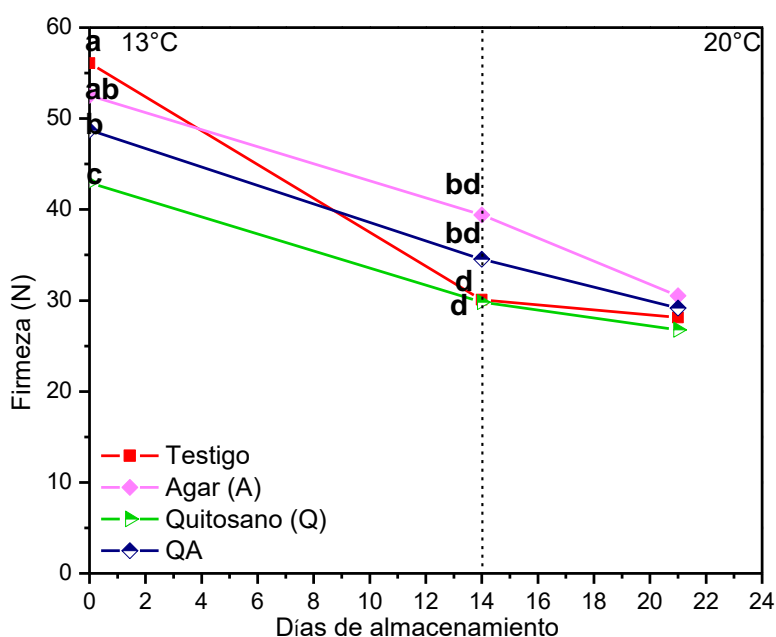


Figura 18. Efecto de los recubrimientos en la firmeza en fruto de tomate durante el almacenamiento (14 días 13 °C + 7 días a 20 °C, 90-95% de humedad relativa).

Análisis subjetivo

Las muestras de tomate sometidas a los diferentes tratamientos se ensayaron por medio de un análisis subjetivo. Se considera alimento dañado, aquel que tenga un daño visible ya sea por evento mecánico, daño fisiológico, por enfermedades causados por hongos, bacterias y virus. Estos daños hacen que el alimento no sea apto para el consumo humano. Los

parámetros evaluados en este análisis han sido el marchitamiento, el % de pudrición y el daño mecánico; las escalas para la evaluación de estos parámetros se han presentado en la parte de Materiales y Métodos de este trabajo.

Los RCs contribuyeron a disminuir marchitamiento, pudrición y daño mecánico, en los frutos de tomate. El recubrimiento que obtuvo mejores resultados en los tres parámetros fue Q+A como se muestra los resultados en la Tabla 6. Se observa que las muestras con este recubrimiento no tubo daños por pudriciones (valor más bajo), parámetro de gran importancia y valor para el consumidor; además el recubrimiento de Q+A mostró un valor mínimo daño así como de marchitamiento.

Tabla 6. Análisis subjetivo de la calidad de tomate *var.* Saladette sometido a diferentes tratamientos de RCs.

Tratamiento	Marchitamiento		Pudrición (%)		Mecánico	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
Testigo	0	5	0	40	1	3
Agar (A)	0	4	0	20	1	2
Quitosano (Q)	0	3	0	36	1	2
Q+A	0	2	0	0	1	2

CONCLUSIONES

Se preparó una mezcla de quitosano y agar para la formación de PCs, las cuales destacan por sus propiedades de color, ya que tienen buena transparencia, ideal para hacer uso de ella en forma de RCs, para que el consumidor no detecte su presencia como se observa en la morfología superficial una buena adhesión entre los componentes ya que no se observaron separación entre fases. Además, los resultados mecánicos de las PCs de Q+A mostró una menor rigidez y una mayor flexibilidad. Los resultados obtenidos en las pruebas de barrera indican que la mezcla es un buen candidato para aplicarlo en forma de RC, ya que se puede disolver con mayor facilidad, lo cual se ve reflejado en el parámetro %SW, que mostró un mayor porcentaje en comparación a los biopolímeros individuales. Las PC de Q+A mostró efecto inhibitorio en la germinación de esporas de *A. niger*, si bien se observó desarrollo de *A. niger*, sin embargo se observó bajo porcentaje de esporas germinadas.

Los RCs aplicados en el producto vegetal disminuyeron la pérdida de peso del tomate almacenado durante 21 días, este parámetro es importante para los comerciantes ya que contribuye, en disminuir las pérdidas económicas. Además, el RC de Q+A retrasó el cambio de color interno y externo del tomate durante el almacenamiento. Por otra parte, es importante mencionar que los RCs no provocaron cambios en firmeza hasta los 21 días, pero sí durante los primeros 14 días de almacenamiento. El marchitamiento fue menor en los tomates RC con Q+A. La firmeza y el marchitamiento son muy apreciados por los consumidores, ya que los consumidores prefieren aquellos frutos con una mayor firmeza y menor presencia de marchitez. Los RCs ayudaron a conservar la apariencia, calidad del tomate var. Saladette, la cual es muy apreciada por los consumidores.

RECOMENDACIONES

- ❖ Realizar pruebas térmicas como TGA para establecer las temperaturas de descomposición de los componentes presentes en las diferentes formulaciones de PCs.
- ❖ Realizar el análisis morfológico por microscopia electrónica de barrido (SEM) de sección transversal en las diferentes PCs.
- ❖ Realizar más pruebas para evaluar la calidad interna del tomate *var. Saladette* como sólidos solubles totales (SSC), tasa de respiración de etileno, cuantificación de antioxidantes, de los productos con y sin recubrimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Ali A, Maqbool M, Ramachandran S, Alderson PG. 2010. Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 58(1): 42-47.
- Ali A, Muhammad MT, Sijam K, Siddiqui Y. 2011. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. *Food Chemistry* 124(2): 620-626.
- Altieri C, Scrocco C, Sinigaglia M, Del Nobile MA. 2005. Use of chitosan to prolong mozzarella cheese shelf life. *Journal of Dairy Science* 88(8): 2683-2688.
- Baldwin EA, Nisperos-Carriedo M, Shaw PE, Burns JK. 1995. Effect of coatings and prolonged storage conditions on fresh oranges flavor volatiles, degrees brix, and ascorbic acid levels. *Journal of Agricultural Food and Chemistry* 43(5): 1321-1331.
- Bautista-Bañosa S, Hernández-López M, Bosquez-Molina E, Wilson CL. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092.
- Bautista-Baños S, Bravo. 2004. Evaluación del quitosano en el desarrollo de la pudrición blanda del tomate durante el almacenamiento. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha* 6(1): 63-67.
- Benavidez ME, Patriarca A, Cabrera G, Fernández VE. 2014. Determinación de perfiles de producción de metabolitos secundarios característicos de especies del género *Alternaria* aisladas de tomate. *Revista Iberoamericana de Micología* 31(2): 119-124.
- Bhowmik SR, Pan JC. 1992. Shelf life of mature green tomatoes stored in controlled atmosphere and high humidity. *Journal of Food Science* 57(4): 948-953.
- Bombelli W, Wright E. 2006. Tomato fruit quality conservation during post-harvest by application of potassium bicarbonate and its effect on *Botrytis cinerea*. *Ciencia e Investigación Agraria* 33: 167-172.

- Bonilla J, Vargas M, Atarés L, Chiralt A. 2014. Effect of chitosan essential oil films on the storage-keeping quality of pork meat products. *Food and Bioprocess Technology* 7(8): 2443-2450.
- Bourtoom T, Chinnan MS. 2008. Preparation and properties of rice starch-chitosan blend biodegradable film. *LWT. Food Science and Technology* 41: 1633-1641.
- Burrola H. 2014. Preparación de películas extruidas de poli (ácido láctico) y quitosano. Tesis. Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales. 19,20,21,22 pp.
- Calderón L, Harris R, Cordoba-Diaz M, Elorza M, Elorza B, Lenoir J, Adriaens E, Remon JP, Heras A, Cordoba-Diaz D. 2013. Nano and microparticulate chitosan-based systems for antiviral topical delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 48: 216-222.
- Camacho AP. 2009. Propiedades estructurales y fungistáticas de biopelículas de quitosano obtenido de ensilados de desecho de camarón. Tesis. Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos. 16,17,18 pp.
- Castro DC, Faria JB, Silva BR, Luiz CV, Miranda RH. 2012. Clarification of passion fruit juice with chitosan: Effects of coagulation process variables and comparison with centrifugation and enzymatic treatments. *Process Biochemistry* 47: 467-471.
- Chatterjee S, Chatterjee S, Chatterjee BP, Guha AK. 2004. Clarification of fruit juice with chitosan. *Process Biochemistry* 39: 2229-2232.
- Cisneros Z, Krochta L. 2002. Internal modified atmospheres of coated fresh fruits and vegetables: understanding relative humidity effects. *Journal of Food Science* 67(8): 2792-2797.
- Coma V, Deschamps A, Martial-Gros A. 2003. Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer-antimicrobial activity assessment on dairy-Related Contaminants. *Journal of Food Science* 68(9): 2788-2792.
- Comisión de Medio Ambiente y Recursos Naturales (2017). Cifras oficiales del consumo de PET en México. Cámara de diputados. México, 2017. Disponible en: <http://www5.diputados.gob.mx/index.php/esl/Comunicacion/Boletines/2017/Abril/13/3469-En-Mexico-90-millones-de-botellas-de-plastico-de-refrescos-y-agua-son-lanzados-a-la-via-publica-rios-y-mares>.
- Contri RV, Katzer T, Ourique AF, Silva ALM, Beck RCR, Pohlmann AR, Guterres SS. 2014. Combined effect of polymeric nanocapsules and chitosan hydrogel on the increase of

capsaicinoids adhesion to the skin surface. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 10: 820-830.

Chandra R, Rustgi R. 1998. Biodegradable polymers. *Progress in Polymer Science* 23(7): 1273-1335.

Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HL, Wu JCG, Lin JG. 2004. Relationship between antibacterial activity of chitosans and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacologica Sinica* 25: 932-936.

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

Dong H, Cheng L, Tan J, Zheng K, Jiang Y. 2004. Effect of chitosan coating on quality and shelf life of peeled litchi fruit. *Journal of Food Engineering* 64(3): 355-358.

Dhanapal A, Sasikala P, Rajamani L, Kavitha V, Yazhini G, Banu SM. 2012. Edible films from Polysaccharides. *Food Science and Quality Management* 3: 9-17.

Ding C, Teng S, Pan H. 2012. In-situ generation of chitosan/hydroxyapatite composite microspheres for biomedical application. *Materials Letters* 79: 72-74.

El-Ghaouth A, Ponnampalam R, Castaigne F, Arul J. 1992. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *Hortscience* 27(9): 1016-1018.

El-Ghaouth A, Smilanick JL, Wilson CL. 2000. Enhancement of the performance of *Candida saitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19(1): 103-110.

Escárcega-Galaz AA, Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, Sanches-Silva A, Madera-Santana TJ, Paseiro-Losada P. 2018. Mechanical, structural and physical aspects of chitosan-based films as antimicrobial dressings. *International Journal of Biological Macromolecules* 116: 472-481.

Fan L, Jin R, Le X, Zhou X, Chen S, Liu H, Xiong Y. 2012. Chitosan microspheres for controlled delivery of auxins as agrochemicals. *Microchimica Acta* 176(3): 381-387.

Fraudes C, Palou L, Monteiro AR, Pérez-Gago MB. 2015. Hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings formulated with antifungal food additives to reduce alternaria black spot and maintain postharvest quality of cold-stored cherry tomatoes. *Scientia Horticulturae* 193: 249-257.

- García-Ramos ML, Bautista-Baños S, Barrera-Necha L. 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28(1): 44-57.
- García S. 2009. Referencias históricas y evolución de los plásticos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 10(1): 71-80.
- Gammariello D, Conte A, Attanasio M, Del nobile MA. 2011. A study on the synergy of modified atmosphere packaging and chitosan on stracciatella shelf life. *Journal of Food Process Engineering* 34(5): 1394-1407.
- Hafsa J, Smach M, Ben Khedher MR, Charfeddine B, Limem K, Majdoub H, Rouatbi S. 2016. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT- Food Science and Technology* 68: 356-364.
- Hernández AM, Necha LB, Lauzardo AN, Del Valle MG. 2011. Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología* 13(2): 127-134.
- Hoerberichts FA, Linus HW, Plas LH, Woltering EJ. 2002. Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biology and Technology* 26: 125-133.
- Hong K, Xie J, Zhang L, Sun D, Gong D. 2012. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of guava (*Psidium guajava* L.) fruit during cold storage. *Scientia Horticulturae* 144: 172-178.
- Iriti M, Varoni EM. 2015. Chitosan-induced antiviral activity and innate immunity in plants. *Environmental Science and Pollution Research* 22(4): 2935-2944.
- Jeon Y, Kamil JYVA, Shahidi F. 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(18): 5167-5178.
- Kanetis L, Förster H, Adaskaveg JE. 2007. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil and pyrimethanil for managing citrus green mould. *Plant Disease* 91: 1502-1511.
- Kanmani P, Rhim JW. 2014. Antimicrobial and physical- mechanical properties of agar- based films incorporated with grapefruit seed extract. *Carbohydrate Polymers* 102: 708-716.

- Kerch G, Sabovics M, Kruma Z, Kampuse S, Straumite E. 2011. Effect of chitosan and chitooligosaccharide on vitamin C and polyphenols contents in cherries and strawberries during refrigerated storage. *European Food Research and Technology* 233(2): 351-358.
- Khalifa I, Barakat H, El-mansy HA, Soliman SA. 2017. Preserving apple (*Malus domestica* var Anna) fruit bioactive substances using olive wastes extract-chitosan film coating. *Information Processing In Agriculture* 4(1): 90-99.
- Kingkaew J, Kirdponpattara S, Sanchavanakit N, Pavasant P, Phisalaphong M. 2014. Effect of molecular weight of chitosan on antimicrobial properties and tissue compatibility of chitosan-impregnated bacterial cellulose films. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 19(3): 534-544.
- Knorr D, 1984. Use of chitinous polymers in food: A challenge for food research and development. *Food Technology* 38(2): 85-97.
- Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal Food Microbiology* 144: 51-63.
- Kurita K. 2006. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustacean. *Marine Biotechnology* 8: 203-226.
- Kyung W, Min BJ, Young-Teck K, Kimmel RM, Cooksey K, Park SI. 2011. Antimicrobial activity against foodborne pathogens of chitosan biopolymer films of different molecular weights. *LWT - Food Science and Technology* 44: 565-569.
- Madera-Santana TJ, Freile-Pekegrín Y, Azamar-Barrios JA. 2014. Physicochemical and morphological properties of plasticized poly(vinyl alcohol)-agar biodegradable films. *International Journal of Biological Macromolecules* 69: 176-184.
- Mallikarjuna B, Madhusudana RK, Sudhakar P, Chowdoji RK, Subha MCS. 2013. Chitosan Based Biodegradable Hydrogel Microspheres for Controlled Release of an Anti HIV Drug. *Indian Journal of Advances in Chemical Science* 1(3): 144-151.
- Martínez-Camacho AP, Cortez-Rocha MO, Ezquerro-Brauer JM, Graciano-Verdugo AZ, Rodríguez-Félix F, Castillo-Ortega MM, Gómez YM, Plascencia-Jatomea M. 2010. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers* 82(2): 305-315.

- Martínez RJ, Vicente AA, Saenz MJ, Herrera RR, González AC. 2012. Un tesoro percedero en México: el tomate, tecnologías para prolongar su vida de anaquel. Universidad Autónoma de Aguascalientes 54: 57-63.
- Mohan SK, Srivastava T. 2011. Microbial deterioration and degradation of polymeric materials. Journal of Biochemical Technology 2(4): 210-215.
- Minet EP, O'Carroll C, Rooney D, Breslin C, McCarthy CP, Gallagher L, Richards KG. 2013. Slow delivery of a nitrification inhibitor (dicyandiamide) to soil using a biodegradable hydrogel of chitosan. Chemosphere 93(11): 2854-2858.
- Ming-Tsung Y, Yang J, Mau J. 2009. Physicochemical characterization of chitin and chitosan from crab shells. Carbohydrate Polymers 75(1): 15-21.
- Mostafa HM, Sourell H, Bockisch FJ. 2010. Mechanical properties of some bioplastics under different soil types used as biodegradable drip tubes. Agricultural Engineering International: CIGR Journal 12(1): 12-21.
- Mukhtar S, Zahoor T, Randhawa MA, Iqbal R, Shabbir A, Liaqat A, Ahsan S. 2018. Synergistic effect of chitosan and clove oil on raw poultry meat. Journal of Food Processing and Technology 9(6): 737-741.
- Nair MS, Saxenaa A, Kaurb C. 2018. Effect of chitosan and alginate based coatings enriched with pomegranate peel extract to extend the postharvest quality of guava (*Psidium guajava* L.). Food Chemistry 240: 245-252.
- Letendre M, D'Aprano G, Lacroix M, Salmieri S, St-Gelais D. 2002. Physicochemical properties and bacterial resistance of biodegradable milk protein films containing agar and pectin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 6017-6022.
- Li XF, Feng XQ, Yang S, Wang TP, Su ZX. 2008. Effects of molecular weight and concentration of chitosan on antifungal activity against *Aspergillus niger*. Iranian Polymer Journal. 17: 843-852.
- Liu J, Tian S, Menga X, Xu Y. 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. Postharvest Biology and Technology 44: 300-306.
- Lizárraga-Paulín EG, Torres-Pacheco I, Moreno-Martínez E, Miranda-Castro SP. 2011. Protección contra estrés biótico inducida por quitosán en plántulas de maíz (*Zea mays* L.). Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 2(6): 813-827.

- López-Vidal O, Escalona-Buendía H, Pelayo-Zaldivar C, Cruz-Salazar J, Villa-Hernández JM, Rivera-cabrera F, Villegas Torres O, Alia-Tejacal I, Pérez-Flores LJ, León-Sánchez D. Carotenoides, capacidad antioxidante y compuestos volátiles del aroma durante la maduración del jitomate. *Phyton (B. Aires)* 83(1): 185-192.
- Obenland D, Collin S, Sievert J, Fjeld K, Doctor J, Arpaia M.L. 2008. Commercial packing and storage of navel oranges alters aroma volatiles and reduces flavor quality. *Postharvest Biology and Technol.* 47(2): 159-167.
- O'Callaghan KAM, Kerry JP. 2016. Preparation of low- and medium-molecular weight chitosan nanoparticles and their antimicrobial evaluation against a panel of microorganisms, including cheese-derived cultures. *Food Control* 69: 256-261.
- Ojagh SM, Rezaei M, Razavi SH, Hosseini SM. 2010. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. *Food Chemistry* 122(1):161-166.
- Palou L, Smilanick J, Droby S. 2008. Alternatives to conventional fungicides for the control of citrus postharvest green and blue molds. *Stewart Postharvest Review* 4(2): 1-16.
- Pardilla J. 2007. Síntesis y caracterización de polímeros conductores basados en anilinas sustituidas y su aplicación electrocatalisis. Tesis. Departamento de Química Física. 5,6 pp.
- Park SY, Marsh KS, Rhim JW. 2002. Characteristics of different molecular weight chitosan films affected by the type of organic solvents. *Journal of Food Science* 67(1): 194-197.
- Park S, Stan SD, Daeschel MA, Zhao Y. 2005. Antifungal coatings on fresh strawberries (*Fragaria × ananassa*) to control mold growth during cold storage. *Journal of Food Science* 70(4): 202-207.
- Peng Y, Li Y. 2014. Combined effects of two kinds of essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids* 36: 287-293.
- Pérez C. 2013. Preparación y caracterización de películas flexibles compuestas por micro-nano partículas de polímeros conductores incorporados en una matriz elastomérica de poli (estireno-etileno/ butileno-estireno). Tesis. Departamento de Ingeniería Química (IQ). 10,11,12 pp.

- Phan D, Debeaufort F, Luu D, Voilley A. 2005. Functional properties of edible agar-based and starch-based films for food quality preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 973-981.
- Phan D, Debeaufort F, Voilley A, Luu D. 2009. Biopolymer interactions affect the functional properties of edible films based on agar, cassava and arabinoxylan blends. *Journal of Food Engineering* 90: 548-558.
- Plascencia-Jatomea M, Viniegra G, Olayo R, Castillo-Ortega MM, Shirai K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination on *Aspergillus niger*. *Macromolecular BioScience* 3: 582-586.
- Pospieszny N, Atabekov JK. 1989. Effect of chitosan on the hypersensitive reaction of bean to alfalfa mosaic virus. *Plant Science* 62: 29-31.
- Quiñones PJ, García CY, Curiel H, Covas PC. 2010. Microspheres of chitosan for controlled delivery of brassinosteroids with biological activity as agrochemicals. *Carbohydrate Polymers* 80: 915-921.
- Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 4(6): 1457-1465.
- Reinders G, Thier HP. 1999. Non-starch polysaccharides of tomatoes I. Characterizing pectins and hemicelluloses. *European Food Research and Technology* 209(1): 43-46.
- Rhim J. 2011. Effect of clay contents on mechanical and water vapor barrier properties of agar-based nanocomposite films. *Carbohydrate Polymers* 86: 691-699.
- Rodríguez MS, Albertengo L, Debbaudt A, Agulló E. 2005. Uso del quitosano en alimentos. *Nuevas tecnologías de conservación de productos frescos cortados*. Ed. González AG, Gardea AA, Cuamea NF. México (Sonora): Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. 558 p.
- Rodríguez-Núñez JR, Madera-Santana TJ, Sánchez-Machado DI, López-Cervantes J, Valdez HS. 2014. Chitosan/Hydrophilic plasticizer-based films: preparation, physicochemical and antimicrobial properties. *Journal of Polymers and the Environment* 22(1): 41-51.
- Sadi RK, Fehine GJ, Demarquette NR. 2010. Photodegradation of poly (3-hydroxybutyrate). *Polymer Degradation and Stability* 95(12): 2318-2327.

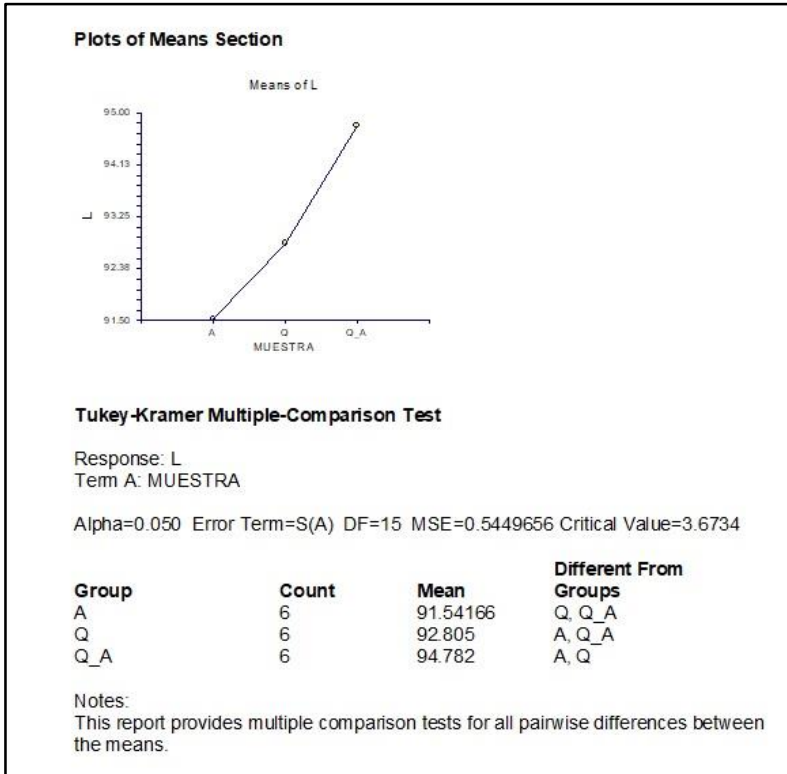
- Saranya TS, Rajan VK, Biswas R, Jayakumar R, Sathianarayananana S. 2018. Synthesis, characterisation and biomedical applications of curcuminconjugated chitosan microspheres. *International Journal of Biological Macromolecules* 110: 227-233.
- Sebti I, Martial-Gros A, Carnet-Pantiez A, Grelier S, Coma V. 2005. Chitosan polymer as bioactive coating and film against *Aspergillus niger* contamination. *Journal of Food Science* 70(2): M100-M104.
- Shahidi, F, Abuzaytoun R. 2005. Chitin, chitosan, and co-products: chemistry production applications and health effects. *Advances in Food and Nutrition Research* 49: 93-135.
- Shankar S, Rhim J. 2015. Amino acid mediated synthesis of silver nanoparticles and preparation of antimicrobial agar/silver nanoparticles composite films. *Carbohydrate Polymers* 130: 353-363.
- Sun B, Quan H, Zhu F. 2016. Dietary chitosan nanoparticles protect crayfish *Procambarus clarkii* against white spot syndrome virus (WSSV) infection. *Fish and Shellfish Immunology* 54: 241-246.
- Tan SC, Tan TK, Wong SM, Khor E. 1996. The chitosan yield of Zygomycetes at their optimum harvesting time. *Carbohydrate Polymers* 30(4) 239-242.
- Tastan O, Taner B. 2015. Clarification of pomegranate juice with chitosan: Changes on quality characteristics during storage. *Food Chemistry* 180: 211-218.
- Tayel AA, Ibrahima S, Al-Samana M, Moussaa S. 2014. Production of fungal chitosan from date wastes and its application as a biopreservative for minced meat. *International Journal of Biological Macromolecules* 69: 471-475.
- Tian H, Xu G, Yang B, Guo G. 2011. Microstructure and mechanical properties of soy protein/agar blend films: effect of composition and processing methods. *Journal of Food Engineering* 107: 21-26.
- Togrul H, Arslan N. 2004. Carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose as a hydrophilic polymer in coating of mandarin. *Journal of Food Engineering*. 62(3): 271-279.
- Valenzuela C, Tapia C, López L, Bunger A, Escalona V, Abugoch L. 2015. Effect of edible quinoa protein-chitosan based films on refrigerated strawberry (*Fragaria x ananassa*) quality. *Electronic Journal of Biotechnology* 18(6): 406-411.

- Vieira JM, Flores-López ML, Jasso de Rodríguez D, Sousa MC, Vicente AA, Martins JT. 2016. Effect of chitosan–Aloe vera coating on postharvest quality of blueberry (*Vaccinium corymbosum*) fruit. *Postharvest Biology and Technology* 116: 88-97.
- Wang G. 1992. Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection* 55(2): 916-919.
- Wu Y, Geng F, Chang P.R, Yu J, Ma X. 2009. Effect of agar on the microstructure and performance of potato starch film. *Carbohydrate Polymers* 76(2): 299-304.
- Xu YX, Kim KM, Hanna MA, Nag D. 2005. Chitosan–starch composite film: preparation and characterization. *Industrial Crops and Products* 21: 185-192.
- Yaman O, Bayoindirli L. 2002. Effects of an edible coating and cold storage on shelf-life and quality of cherries. *LWT- Food Science and Technology* 35(2): 146-150.
- Yarnpakdee S, Benjakul S, Kingwascharapong P. 2015. Physico-chemical and gel properties of agar from *Gracilaria tenuistipitata* from the lake of Songkhla, Thailand. *Food Hydrocolloids* 51: 217-226.
- Yien LI, Zin N, Sarwar A, Katas H. 2012. Antifungal activity of chitosan nanoparticles and correlation with their physical properties. *International Journal of Biomaterials* 1-9.
- Zamora-Mora V, Sibaja M, Vega-Baudrit J. 2010. Diseño de un biofilm a partir de colágeno de pieles de tilapia y de quitosano de camarón como soporte para aplicaciones en ingeniería de tejidos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 11(7): 607-619.
- Zhu S, Pascal KD. 2015. Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules* 74: 289-296.
- Zhu X, Wang QM, Cao JK, Jiang WB. 2008. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango (*Mangifera indica* L.cv. Tainong) fruits. *Journal of Food Processing and Preservation* 32: 770-784.

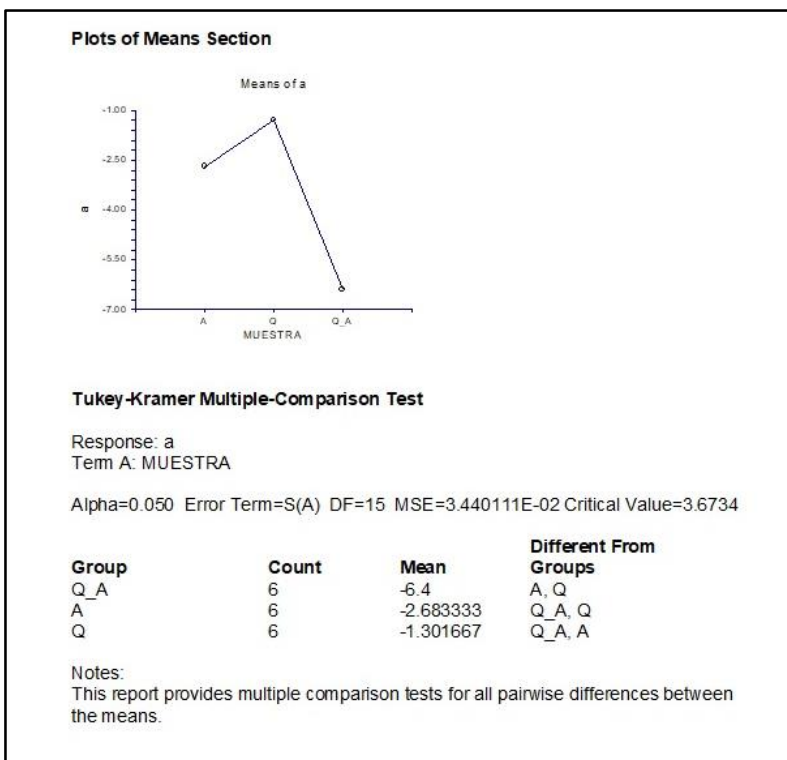
ANEXOS

ANEXO 1. Análisis de varianza de Propiedades Ópticas

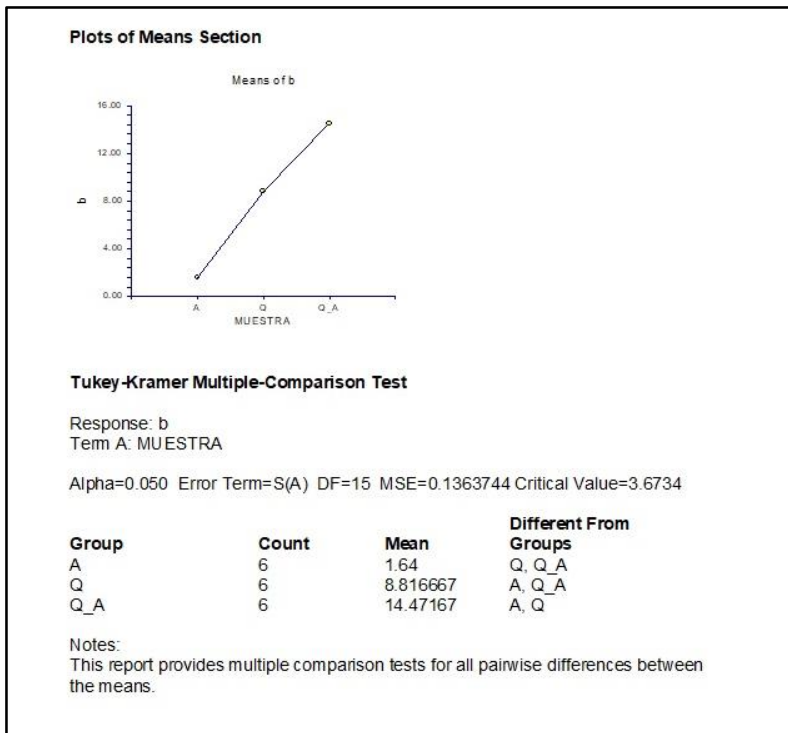
1. Luminosidad (L^*) en muestras de diferentes formulaciones de PCs.



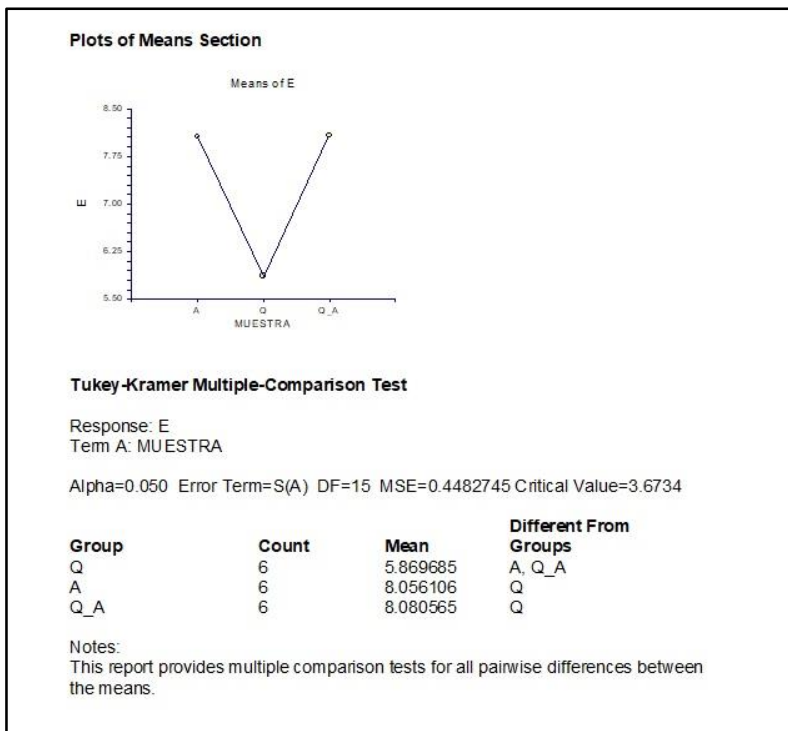
2. Parámetro de color (a^*) en muestras de diferentes formulaciones de PCs.



3. Parámetro de color (b^*) en muestras de diferentes formulaciones de PCs.

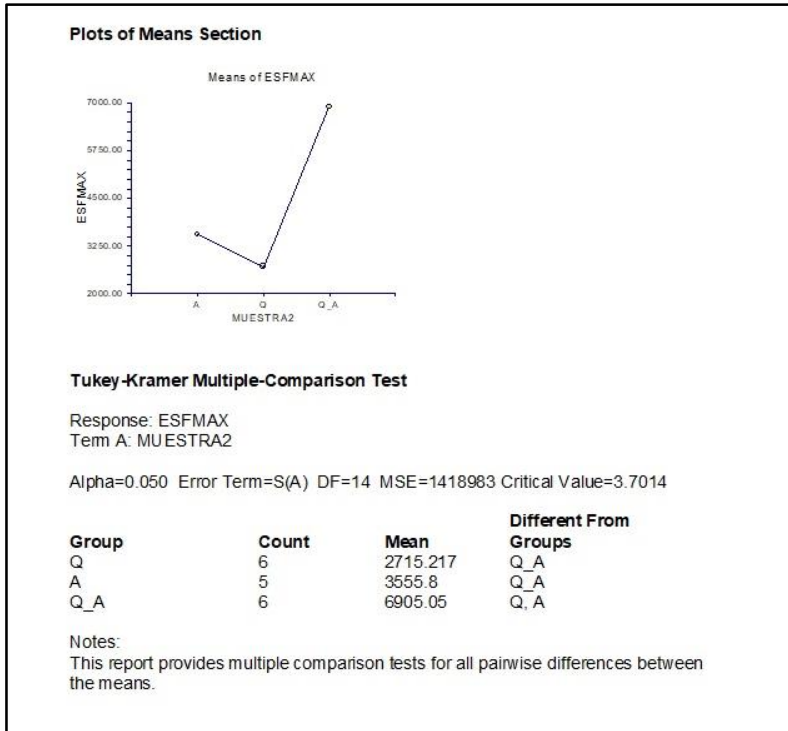


4. Parámetro de diferencia de color (ΔE) en muestras de diferentes formulaciones de PCs.

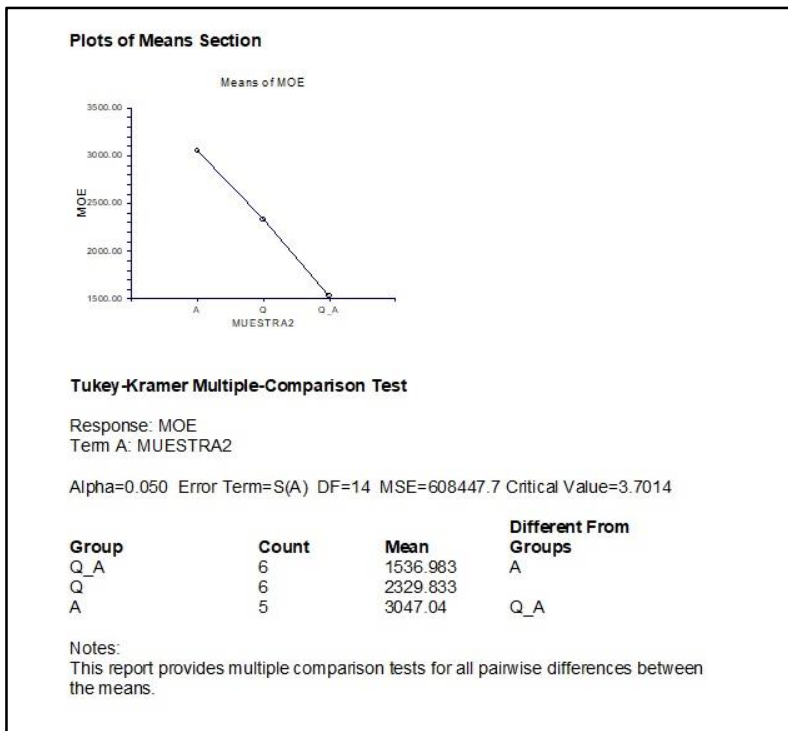


ANEXO 2. Análisis de varianza de propiedades mecánicas

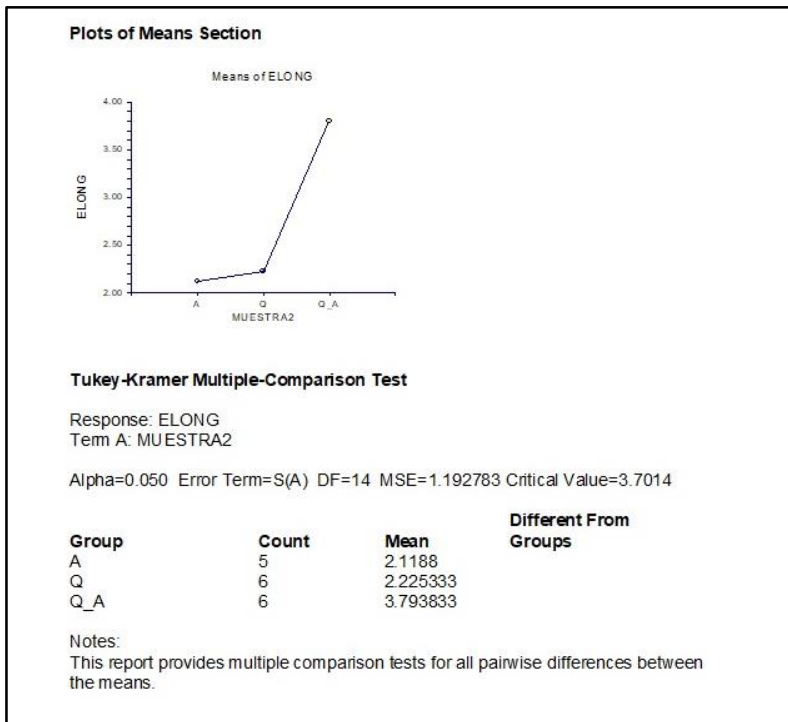
1. Esfuerzo máximo (MPa) en muestras de diferentes formulaciones de PCs.



2. Módulo de elasticidad (MPa) en muestras de diferentes formulaciones de PCs.

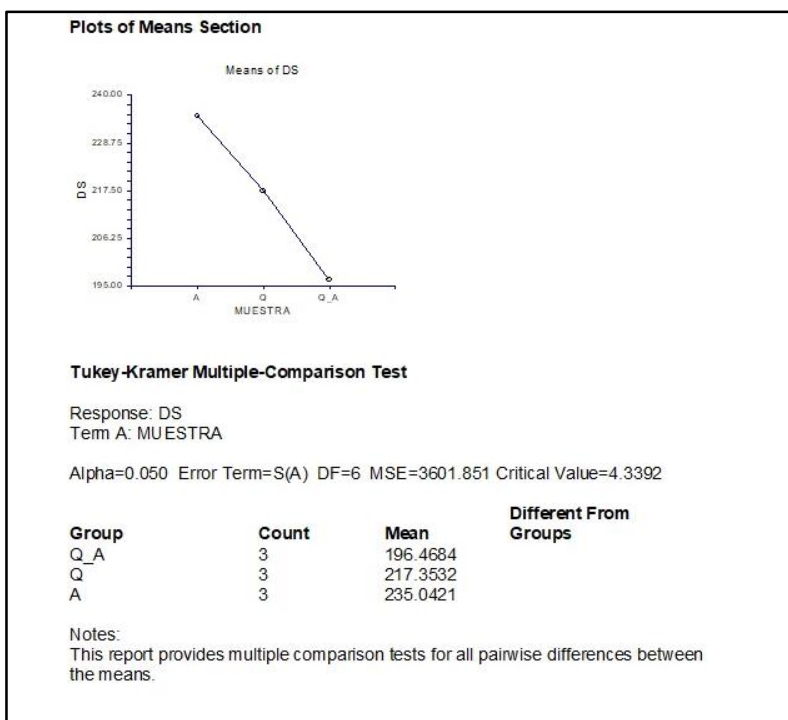


3. % Elongación a la ruptura en muestras de diferentes formulaciones de PCs.

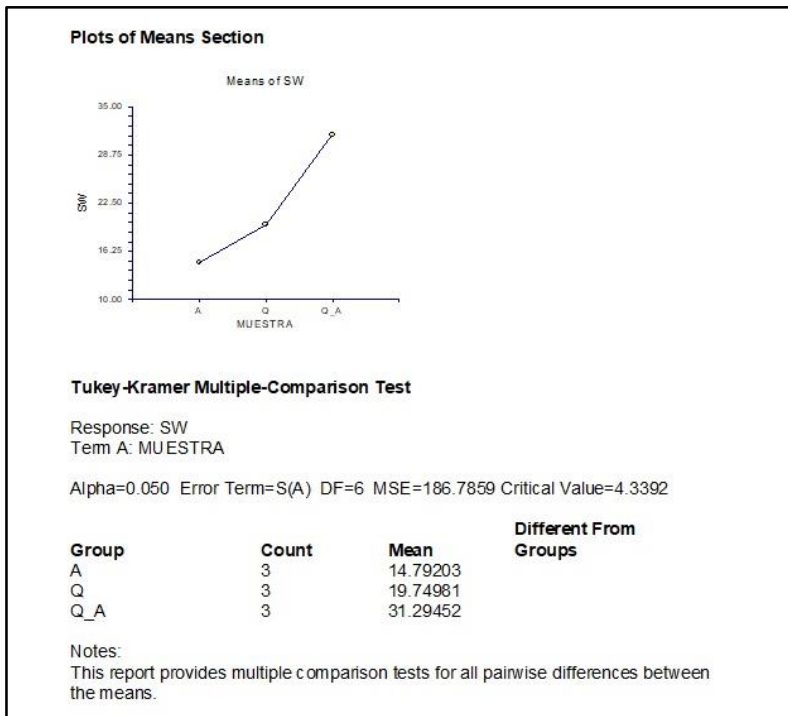


ANEXO 3. Análisis de Varianza de Propiedades de Barrera

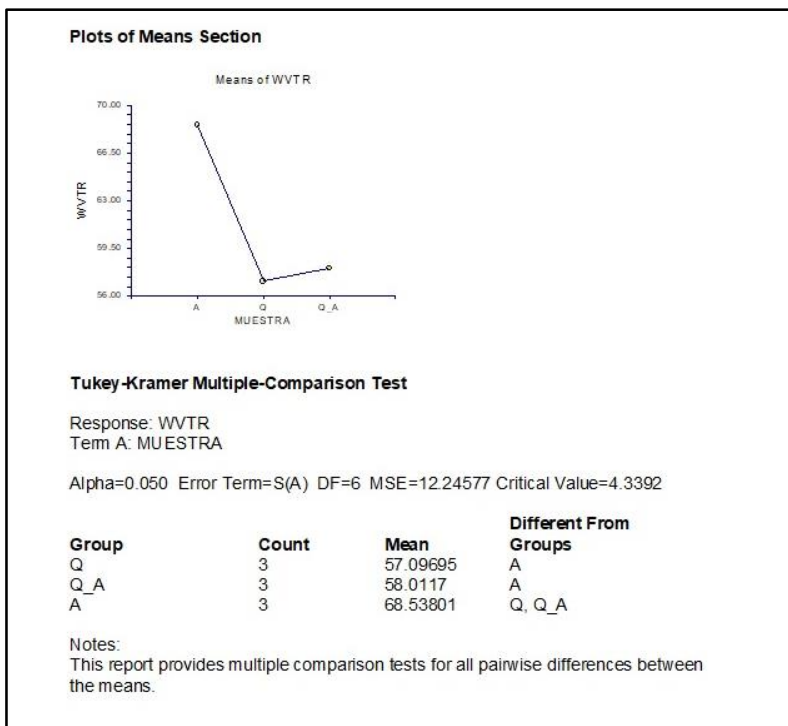
1. Grado de hinchamiento (%DS) en muestras de diferentes formulaciones de PCs.



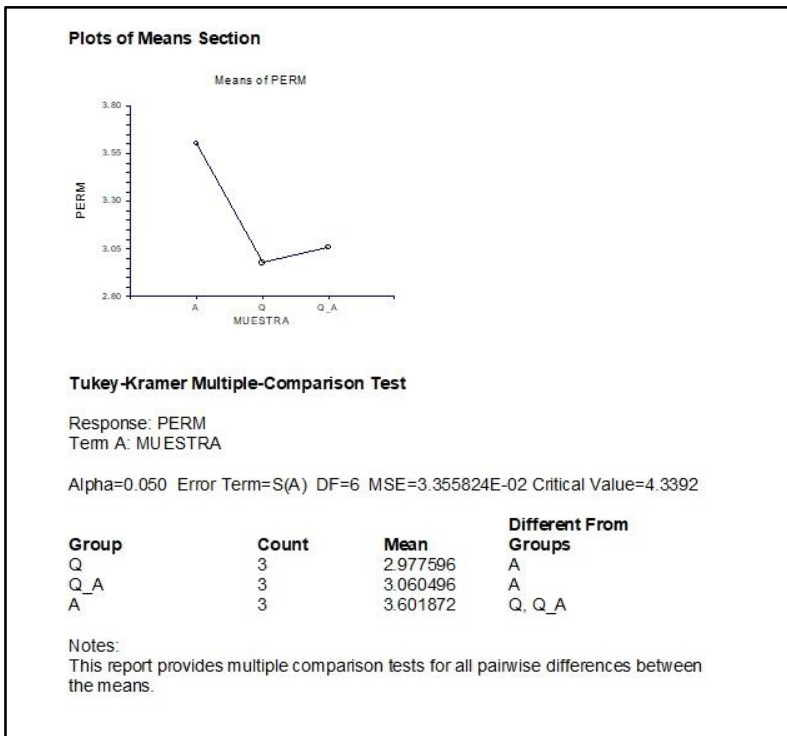
2. Solubilidad (%SW) en muestras de diferentes formulaciones de PCs.



3. Velocidad de transmisión de vapor de agua (WVTR) en muestras de diferentes formulaciones de PCs.

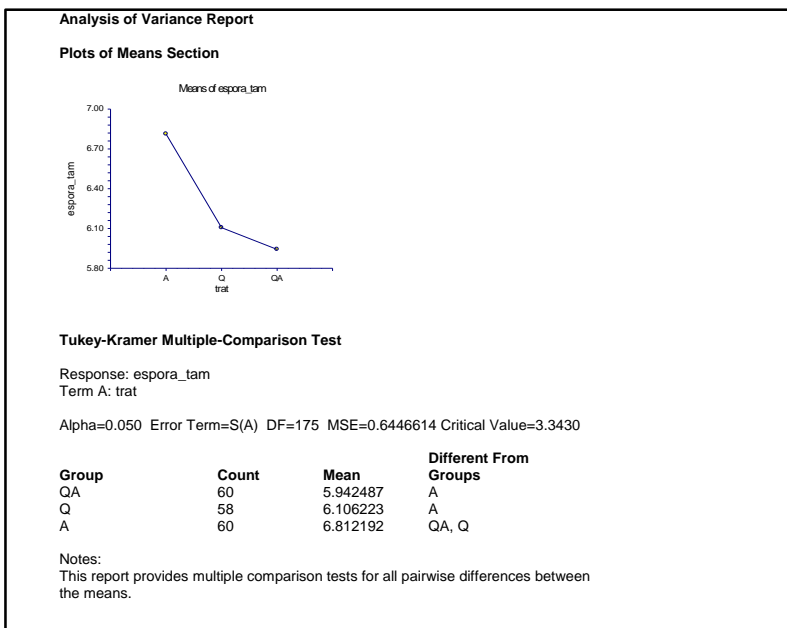


4. Permeancia en muestras de diferentes formulaciones de PCs.

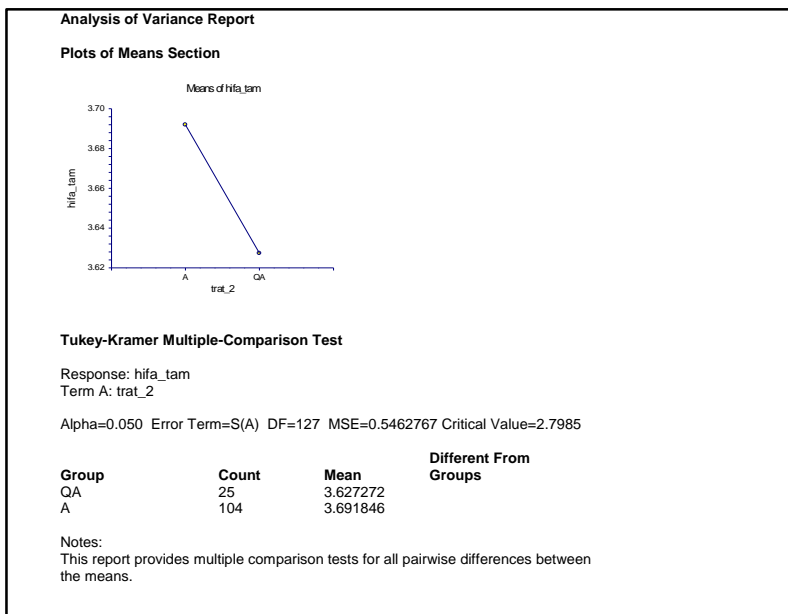


ANEXO 4. Análisis de Varianza de Propiedades Morfométricas de Hifas-Esporas

1. Diámetro de esporas en muestras de diferentes formulaciones de PCs.



2. Diámetro de hifas en muestras de diferentes formulaciones de PCs.



ANEXO 5. Análisis de Varianza de Propiedades en la Evaluación de la Calidad del Tomate con RCs

1. pH en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13°C.

Analysis of Variance Report

Expected Mean Squares Section

Source Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: tiempo_5	1	Yes	S(AB)	S+bsA
B: trat_5	3	Yes	S(AB)	S+asB
AB	3	Yes	S(AB)	S+sAB
S(AB)	15	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: tiempo_5	1	1.251863E-02	1.251863E-02	8.10	0.012265*	0.758120
B: trat_5	3	2.028947E-03	6.763158E-04	0.44	0.729372	0.117496
AB	3	0.1024991	3.416637E-02	22.11	0.000009*	0.999996
S	15	2.318333E-02	1.545556E-03			
Total (Adjusted)	22	0.1449304				
Total	23					

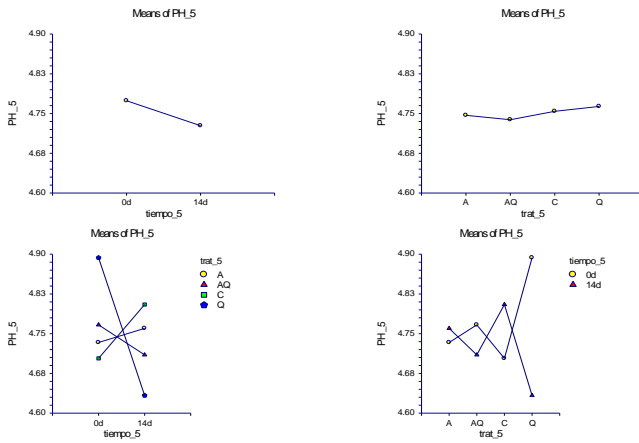
* Term significant at alpha = 0.05

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	23	4.750625	
A: tiempo_5			
0d	12	4.774167	1.134885E-02
14d	11	4.727083	1.185348E-02
B: trat_5			
A	6	4.746666	1.604969E-02
AQ	6	4.738333	1.604969E-02
C	5	4.754167	1.758156E-02
Q	6	4.763333	1.604969E-02
AB: tiempo_5, trat_5			
0d,A	3	4.733333	2.269769E-02
0d,AQ	3	4.766667	2.269769E-02
0d,C	3	4.703333	2.269769E-02
0d,Q	3	4.893333	2.269769E-02
14d,A	3	4.76	2.269769E-02
14d,AQ	3	4.71	2.269769E-02
14d,C	2	4.805	2.779888E-02
14d,Q	3	4.633333	2.269769E-02

Analysis of Variance Report

Plots Section



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: PH_5
Term A: tiempo_5

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=15 MSE=1.545556E-03 Critical Value=3.0143

Group	Count	Mean	Different From Groups
14d	11	4.727083	0d
0d	12	4.774167	14d

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Analysis of Variance Report

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: PH_5
Term B: trat_5

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=15 MSE=1.545556E-03 Critical Value=4.0760

Group	Count	Mean	Different From Groups
AQ	6	4.738333	
A	6	4.746666	
C	5	4.754167	
Q	6	4.763333	

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

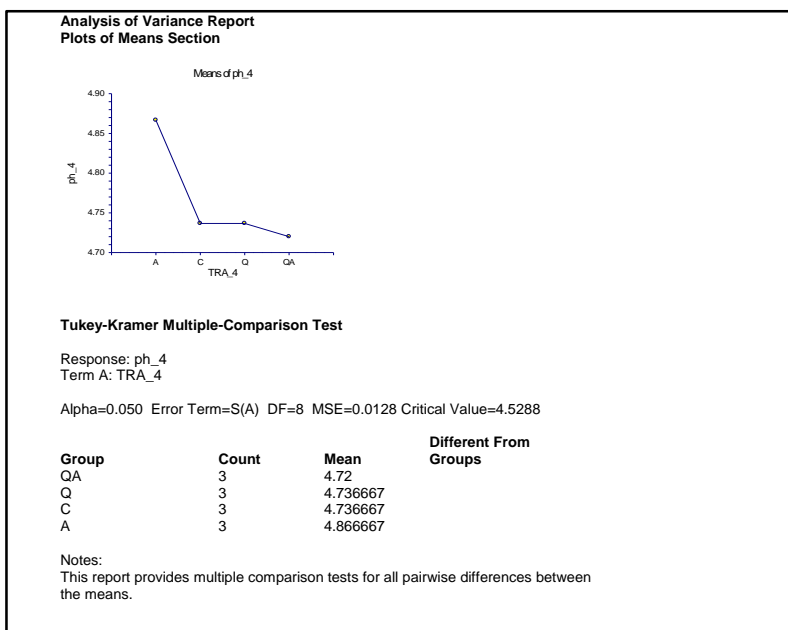
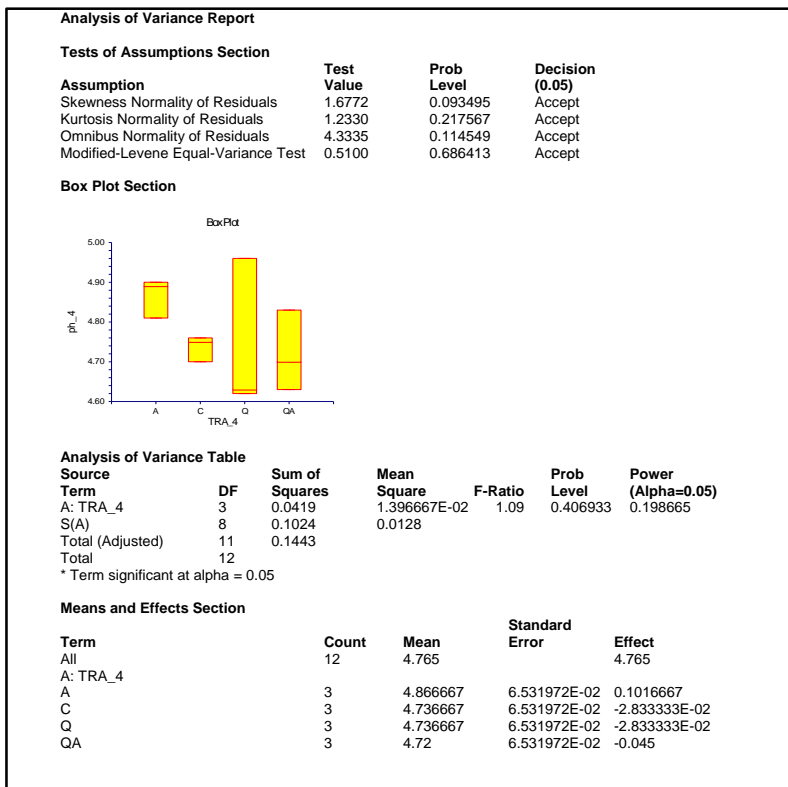
Response: PH_5
Term AB: tiempo_5, trat_5

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=15 MSE=1.545556E-03 Critical Value=4.9399

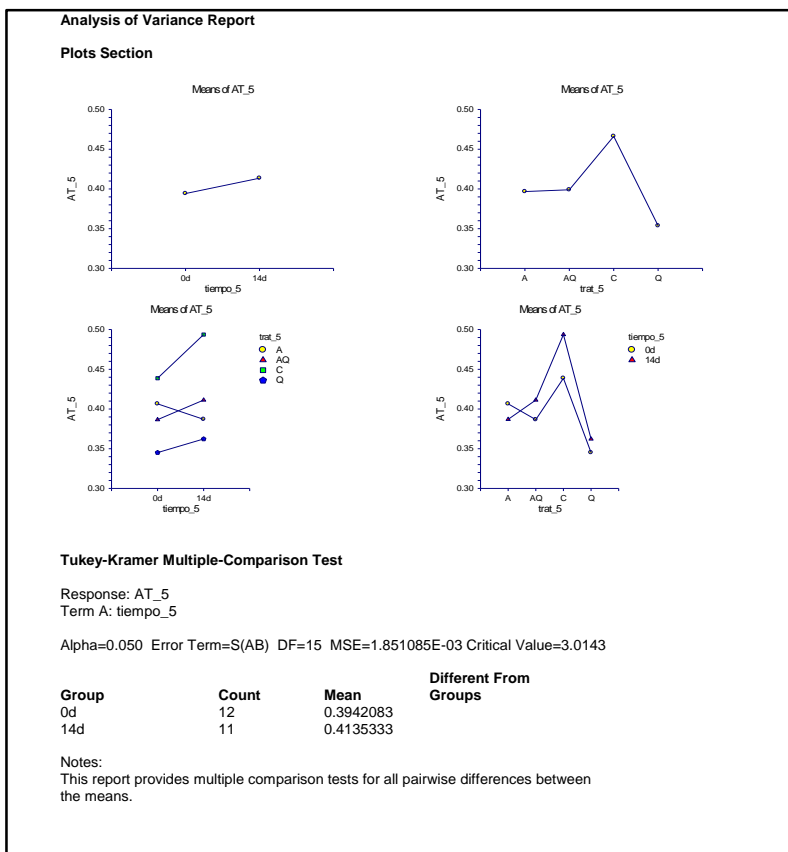
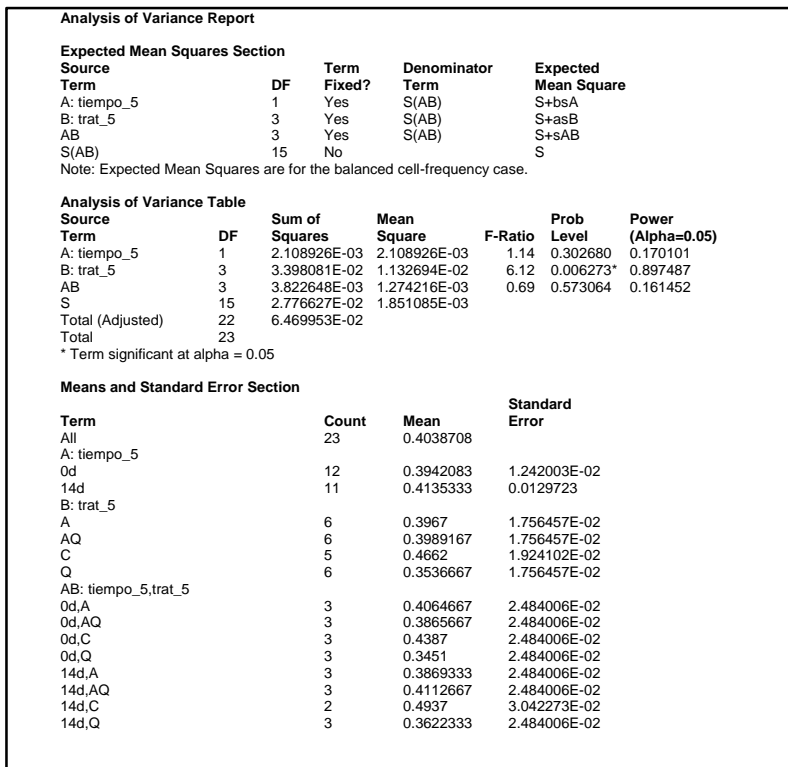
Group	Count	Mean	Different From Groups
14d,Q	3	4.633333	(14d,A), (0d,AQ), (14d,C), (0d,Q)
0d,C	3	4.703333	(0d,Q)
14d,AQ	3	4.71	(0d,Q)
0d,A	3	4.733333	(0d,Q)
14d,A	3	4.76	(14d,Q), (0d,Q)
0d,AQ	3	4.766667	(14d,Q), (0d,Q)
14d,C	2	4.805	(14d,Q)
0d,Q	3	4.893333	(14d,Q), (0d,C), (14d,AQ), (0d,A), (14d,A), (0d,AQ)

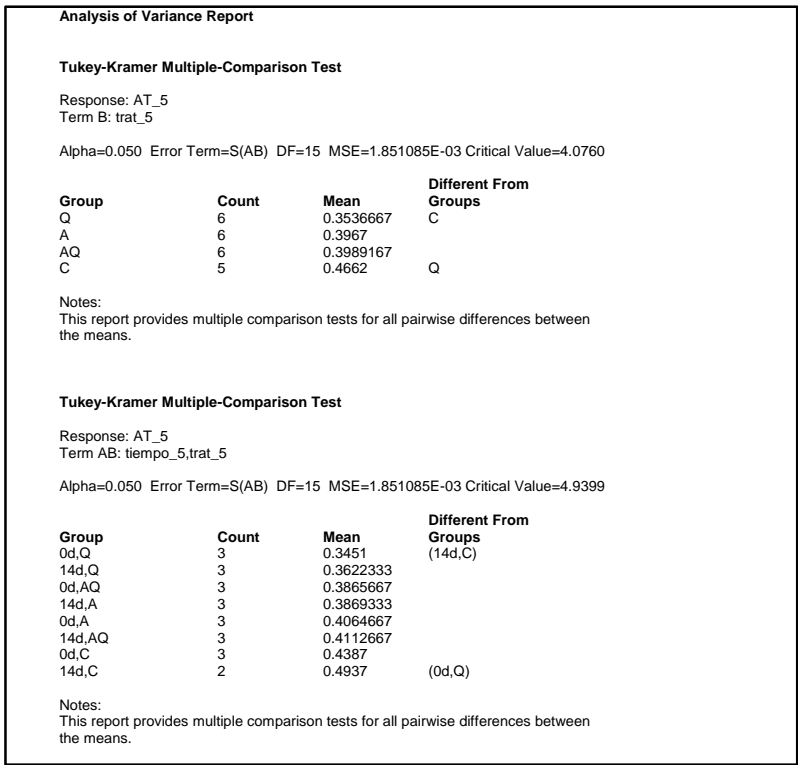
Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

2. pH en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20°C.

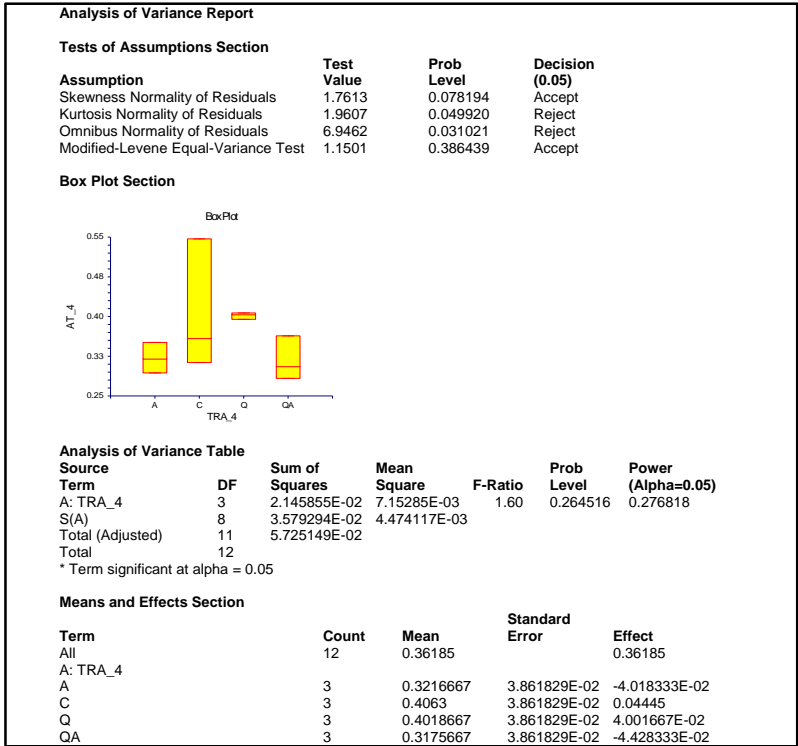


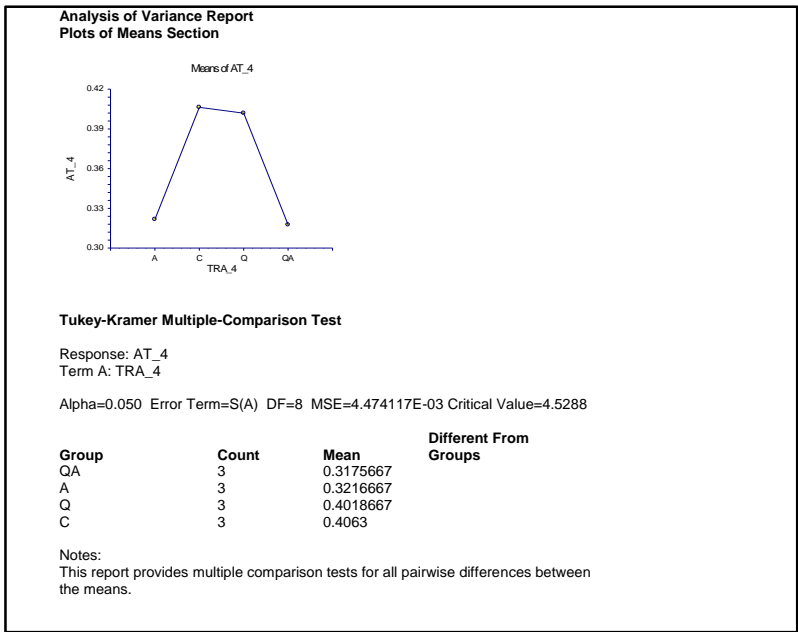
3. AT en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13°C.





4. AT en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20°C.





ANEXO 6. Análisis de Varianza de Propiedades de Pérdida de Peso de los RCs en Tomate Var. Saladette a 13 °C y 20 °C

1. Porcentaje de pérdida de peso en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13 °C.

Analysis of Variance Report

Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term	Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: tiempo_4	A	1	S(AB)	Yes	S(AB)	S+bsA
B: trat_4	B	3	S(AB)	Yes	S(AB)	S+asB
AB	AB	3	S(AB)	Yes	S(AB)	S+sAB
S(AB)	S(AB)	70		No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: tiempo_4	A	1	97.81422	97.81422	1009.11	0.000000*	1.000000
B: trat_4	B	3	3.083466	1.027822	10.60	0.000008*	0.998363
AB	AB	3	3.083466	1.027822	10.60	0.000008*	0.998363
S	S	70	6.785158	9.693082E-02			
Total (Adjusted)		77	109.7306				
Total		78					

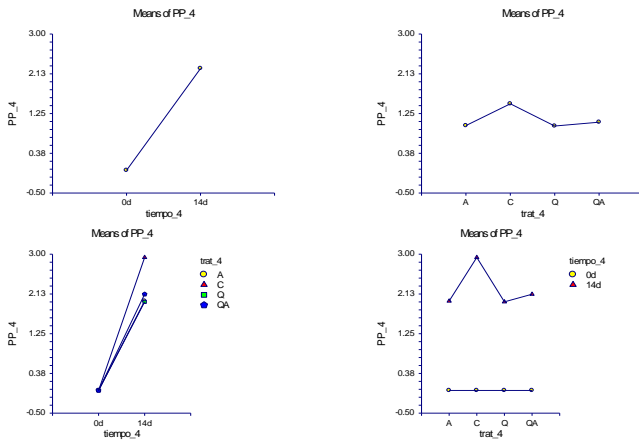
* Term significant at alpha = 0.05

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	78	1.121	
A: tiempo_4			
Od	40	2.442491E-15	4.922673E-02
14d	38	2.242	5.050556E-02
B: trat_4			
A	20	0.9845	6.961711E-02
C	19	1.464444	7.142564E-02
Q	19	0.9755555	7.142564E-02
QA	20	1.0595	6.961711E-02
AB: tiempo_4, trat_4			
Od,A	10	3.63598E-15	9.845345E-02
Od,C	10	-1.221245E-15	9.845345E-02
Od,Q	10	3.358425E-15	9.845345E-02
Od,QA	10	3.996803E-15	9.845345E-02
14d,A	10	1.969	9.845345E-02
14d,C	9	2.928889	0.1037791
14d,Q	9	1.951111	0.1037791
14d,QA	10	2.119	9.845345E-02

Analysis of Variance Report

Plots Section



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: PP_4
Term A: tiempo_4

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=9.693082E-02 Critical Value=2.8206

Group	Count	Mean	Different From Groups
0d	40	2.442491E-15	14d
14d	38	2.242	0d

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Analysis of Variance Report

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: PP_4
Term B: trat_4

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=9.693082E-02 Critical Value=3.7220

Group	Count	Mean	Different From Groups
Q	19	0.9755555	C
A	20	0.9845	C
QA	20	1.0595	C
C	19	1.464444	Q, A, QA

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

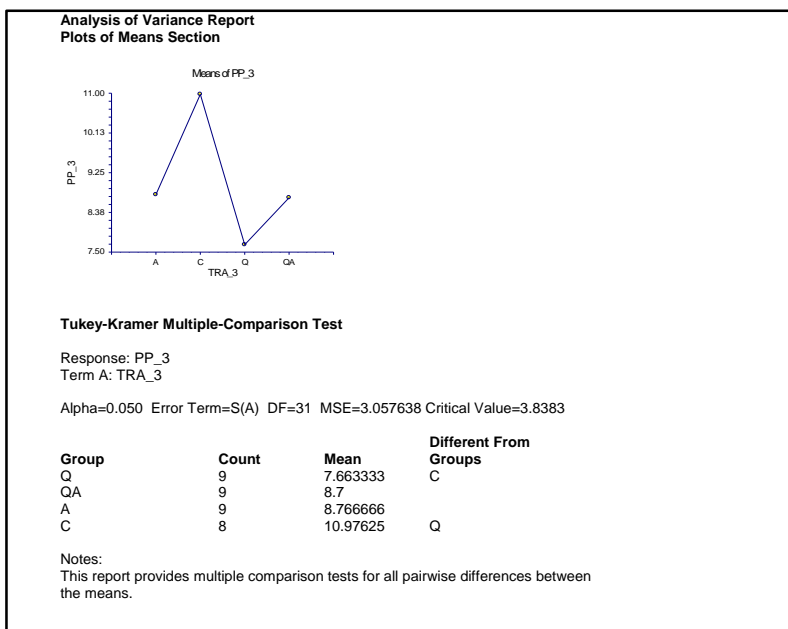
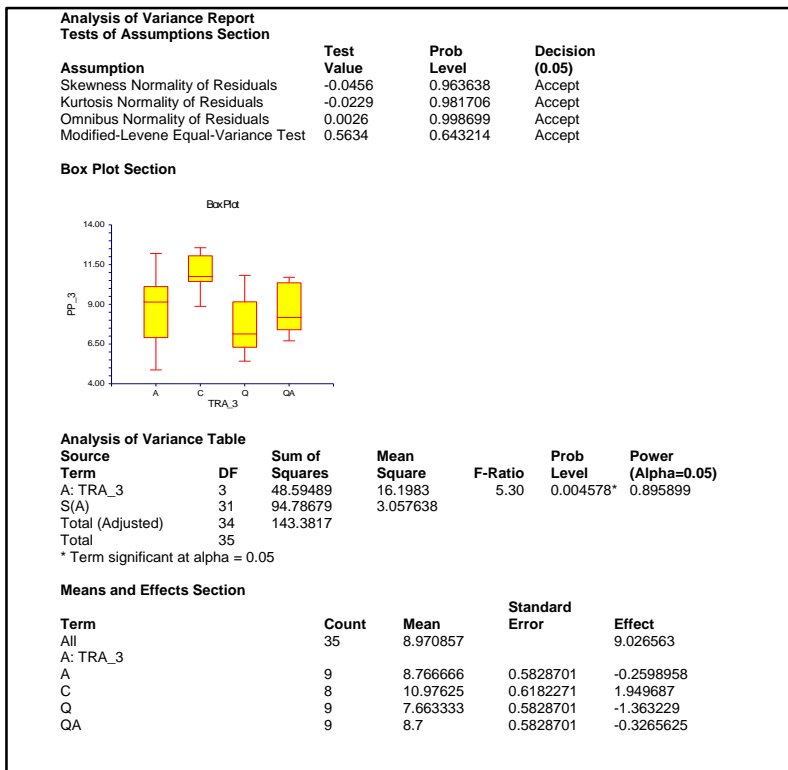
Response: PP_4
Term AB: tiempo_4, trat_4

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=9.693082E-02 Critical Value=4.4186

Group	Count	Mean	Different From Groups
0d,C	10	-1.221245E-15	(14d,Q), (14d,A), (14d,QA), (14d,C)
0d,Q	10	3.358425E-15	(14d,Q), (14d,A), (14d,QA), (14d,C)
0d,A	10	3.63598E-15	(14d,Q), (14d,A), (14d,QA), (14d,C)
0d,QA	10	3.996803E-15	(14d,Q), (14d,A), (14d,QA), (14d,C)
14d,Q	9	1.951111	(0d,C), (0d,Q), (0d,A), (0d,QA), (14d,C)
14d,A	10	1.969	(0d,C), (0d,Q), (0d,A), (0d,QA), (14d,C)
14d,QA	10	2.119	(0d,C), (0d,Q), (0d,A), (0d,QA), (14d,C)
14d,C	9	2.928889	(0d,C), (0d,Q), (0d,A), (0d,QA), (14d,C), (14d,A), (14d,QA)

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

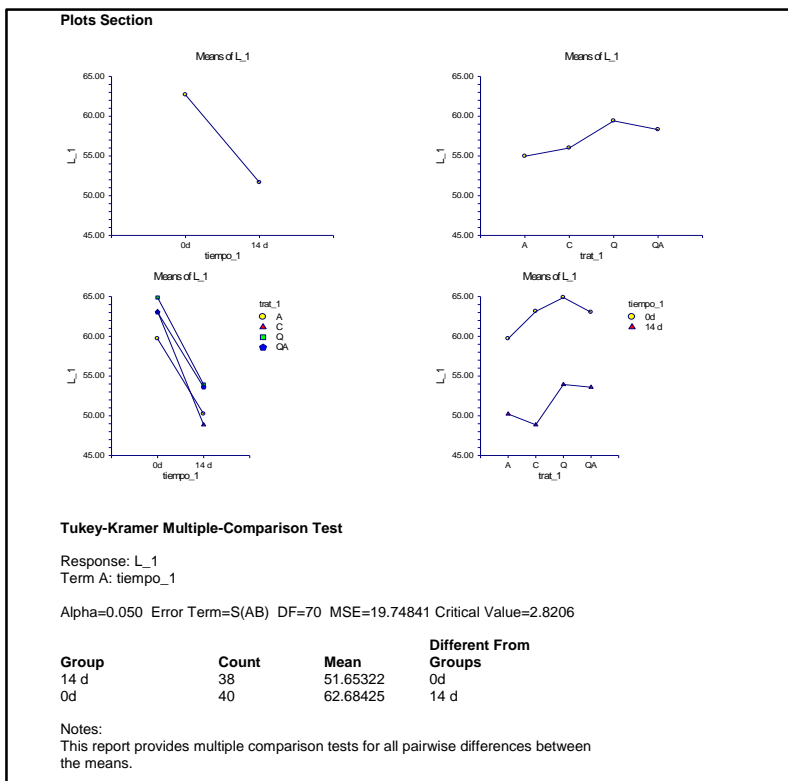
2. Porcentaje de pérdida de peso en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20 °C.



ANEXO 7. Análisis de Varianza Realizado a los Parámetros de Color Externo e Interno en Tomate Var. Saladette a 13 °C y 20 °C

1. Luminosidad (L^*) externo en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13 °C.

Analysis of Variance Report						
Expected Mean Squares Section						
Source Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square		
A: tiempo_1	1	Yes	S(AB)	S+bsA		
B: trat_1	3	Yes	S(AB)	S+asB		
AB	3	Yes	S(AB)	S+sAB		
S(AB)	70	No		S		
Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.						
Analysis of Variance Table						
Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: tiempo_1	1	2367.896	2367.896	119.90	0.000000*	1.000000
B: trat_1	3	244.7544	81.5848	4.13	0.009347*	0.830622
AB	3	74.59222	24.86407	1.26	0.295161	0.322803
S	70	1382.389	19.74841			
Total (Adjusted)	77	4063.8				
Total	78					
* Term significant at alpha = 0.05						
Means and Standard Error Section						
Term	Count	Mean	Standard Error			
All	78	57.16874				
A: tiempo_1						
Od	40	62.68425	0.7026453			
14 d	38	51.65322	0.7208989			
B: trat_1						
A	20	54.959	0.9936905			
C	19	55.99761	1.019505			
Q	19	59.40933	1.019505			
QA	20	58.309	0.9936905			
AB: tiempo_1, trat_1						
Od,A	10	59.697	1.405291			
Od,C	10	63.133	1.405291			
Od,Q	10	64.882	1.405291			
Od,QA	10	63.025	1.405291			
14 d,A	10	50.221	1.405291			
14 d,C	9	48.86222	1.481306			
14 d,Q	9	53.93667	1.481306			
14 d,QA	10	53.593	1.405291			



Analysis of Variance Report

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: L_1
Term B: trat_1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=19.74841 Critical Value=3.7220

Group	Count	Mean	Different From Groups
A	20	54.959	Q
C	19	55.99761	
QA	20	58.309	
Q	19	59.40933	A

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: L_1
Term AB: tiempo_1, trat_1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=19.74841 Critical Value=4.4186

Group	Count	Mean	Different From Groups
14 d,C	9	48.86222	(0d,A), (0d,QA), (0d,C), (0d,Q)
14 d,A	10	50.221	(0d,A), (0d,QA), (0d,C), (0d,Q)
14 d,QA	10	53.593	(0d,QA), (0d,C), (0d,Q)
14 d,Q	9	53.93667	(0d,QA), (0d,C), (0d,Q)
0d,A	10	59.697	(14 d,C), (14 d,A)
0d,QA	10	63.025	(14 d,C), (14 d,A), (14 d,QA), (14 d,Q)
0d,C	10	63.133	(14 d,C), (14 d,A), (14 d,QA), (14 d,Q)
0d,Q	10	64.882	(14 d,C), (14 d,A), (14 d,QA), (14 d,Q)

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

2. Cromo (C) externo en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13 °C.

Analysis of Variance Report

Expected Mean Squares Section

Source	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: tiempo_1	1	Yes	S(AB)	S+bsA
B: trat_1	3	Yes	S(AB)	S+asB
AB	3	Yes	S(AB)	S+sAB
S(AB)	70	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: tiempo_1	1	920.7374	920.7374	54.60	0.000000*	1.000000
B: trat_1	3	127.9365	42.64549	2.53	0.064243	0.601421
AB	3	75.82095	25.27365	1.50	0.222470	0.379592
S	70	1180.476	16.86394			
Total (Adjusted)	77	2294.909				
Total	78					

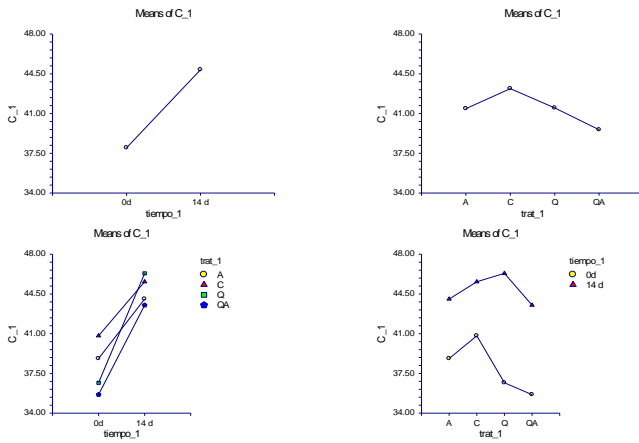
* Term significant at alpha = 0.05

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	78	41.42282	
A: tiempo_1			
0d	40	37.9835	0.6493062
14 d	38	44.86214	0.6661741
B: trat_1			
A	20	41.431	0.9182576
C	19	43.19361	0.9421124
Q	19	41.49417	0.9421124
QA	20	39.5725	0.9182576
AB: tiempo_1, trat_1			
0d,A	10	38.811	1.298612
0d,C	10	40.815	1.298612
0d,Q	10	36.675	1.298612
0d,QA	10	35.633	1.298612
14 d,A	10	44.051	1.298612
14 d,C	9	45.57222	1.368858
14 d,Q	9	46.31333	1.368858
14 d,QA	10	43.512	1.298612

Analysis of Variance Report

Plots Section



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C_1
 Term A: tiempo_1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=16.86394 Critical Value=2.8206

Group	Count	Mean	Different From Groups
0d	40	37.9835	14 d
14 d	38	44.86214	0d

Notes:
 This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Analysis of Variance Report

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C_1
 Term B: trat_1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=16.86394 Critical Value=3.7220

Group	Count	Mean	Different From Groups
QA	20	39.5725	C
A	20	41.431	
Q	19	41.49417	
C	19	43.19361	QA

Notes:
 This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C_1
 Term AB: tiempo_1, trat_1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=16.86394 Critical Value=4.4186

Group	Count	Mean	Different From Groups
0d,QA	10	35.633	(14 d,QA), (14 d,A), (14 d,C), (14 d,Q)
0d,Q	10	36.675	(14 d,QA), (14 d,A), (14 d,C), (14 d,Q)
0d,A	10	38.811	(14 d,C), (14 d,Q)
0d,C	10	40.815	
14 d,QA	10	43.512	(0d,QA), (0d,Q)
14 d,A	10	44.051	(0d,QA), (0d,Q)
14 d,C	9	45.57222	(0d,QA), (0d,Q), (0d,A)
14 d,Q	9	46.31333	(0d,QA), (0d,Q), (0d,A)

Notes:
 This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

3. Ángulo de tono (*hue*) externo en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13 °C.

Analysis of Variance Report
Expected Mean Squares Section

Source	Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: tiempo_1	1	1	Yes	S(AB)	S+bsA
B: trat_1	3	3	Yes	S(AB)	S+asB
AB	3	3	Yes	S(AB)	S+sAB
S(AB)	70	70	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

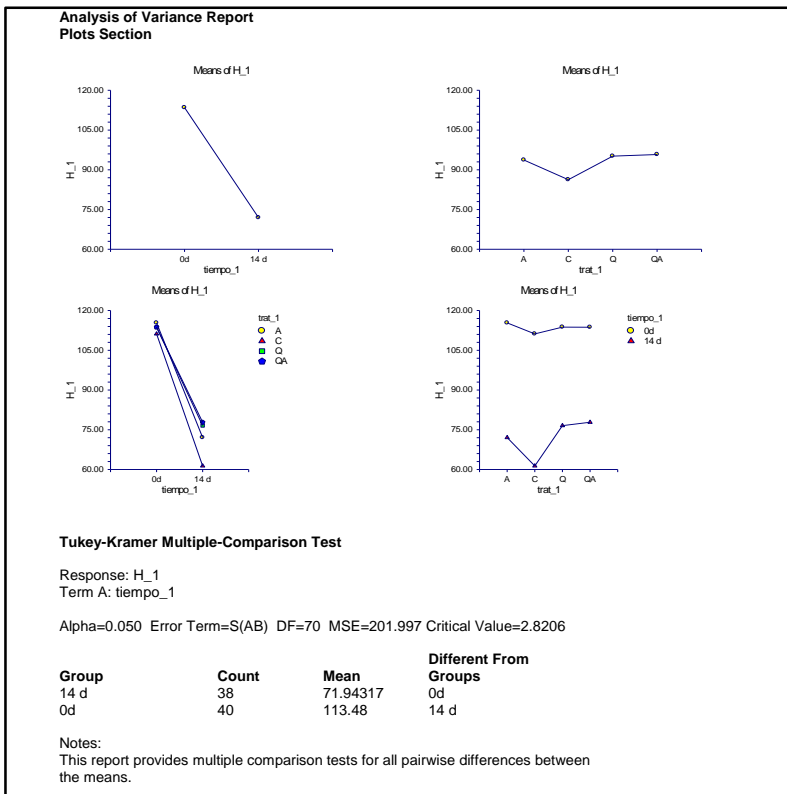
Analysis of Variance Table

Source	Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: tiempo_1	1	1	33573.57	33573.57	166.21	0.000000*	1.000000
B: trat_1	3	3	1105.477	368.4925	1.82	0.150680	0.454607
AB	3	3	590.9039	196.968	0.98	0.409519	0.255224
S	70	70	14139.79	201.997			
Total (Adjusted)	77	77	49142.22				
Total	78	78					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	78	92.71159	
A: tiempo_1			
0d	40	113.48	2.247204
14 d	38	71.94317	2.305583
B: trat_1			
A	20	93.682	3.178026
C	19	86.25939	3.260586
Q	19	95.14394	3.260586
QA	20	95.761	3.178026
AB: tiempo_1, trat_1			
0d,A	10	115.321	4.494408
0d,C	10	111.171	4.494408
0d,Q	10	113.729	4.494408
0d,QA	10	113.699	4.494408
14 d,A	10	72.043	4.494408
14 d,C	9	61.34778	4.737522
14 d,Q	9	76.55889	4.737522
14 d,QA	10	77.823	4.494408



Analysis of Variance Report

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: H_1
Term B: trat_1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=201.997 Critical Value=3.7220

Group	Count	Mean	Different From Groups
C	19	86.25939	
A	20	93.682	
Q	19	95.14394	
QA	20	95.761	

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: H_1
Term AB: tiempo_1, trat_1

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=70 MSE=201.997 Critical Value=4.4186

Group	Count	Mean	Different From Groups
14 d,C	9	61.34778	(0d,C), (0d,QA), (0d,Q), (0d,A)
14 d,A	10	72.043	(0d,C), (0d,QA), (0d,Q), (0d,A)
14 d,Q	9	76.55889	(0d,C), (0d,QA), (0d,Q), (0d,A)
14 d,QA	10	77.823	(0d,C), (0d,QA), (0d,Q), (0d,A)
0d,C	10	111.171	(14 d,C), (14 d,A), (14 d,Q), (14 d,QA)
0d,QA	10	113.699	(14 d,C), (14 d,A), (14 d,Q), (14 d,QA)
0d,Q	10	113.729	(14 d,C), (14 d,A), (14 d,Q), (14 d,QA)
0d,A	10	115.321	(14 d,C), (14 d,A), (14 d,Q), (14 d,QA)

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

4. Luminosidad (L^*) interno en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13 °C.

Analysis of Variance Report

Expected Mean Squares Section

Source	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: tiempo_2	1	Yes	S(AB)	S+bsA
B: trat_2	3	Yes	S(AB)	S+asB
AB	3	Yes	S(AB)	S+sAB
S(AB)	52	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

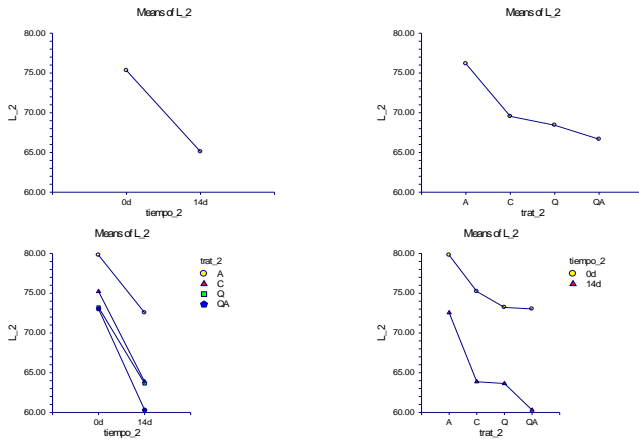
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: tiempo_2	1	1543.975	1543.975	33.27	0.000000*	0.999892
B: trat_2	3	788.844	262.948	5.67	0.001956*	0.930241
AB	3	63.28745	21.09581	0.45	0.715207	0.135209
S	52	2413.396	46.41147			
Total (Adjusted)	59	4680.284				
Total	60					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	60	70.19745	
A: tiempo_2			
0d	32	75.30968	1.204308
14d	28	65.08521	1.28746
B: trat_2			
A	16	76.16438	1.703149
C	16	69.54	1.703149
Q	14	68.42667	1.820743
QA	14	66.65875	1.820743
AB: tiempo_2, trat_2			
0d,A	8	79.7875	2.408617
0d,C	8	75.21875	2.408617
0d,Q	8	73.215	2.408617
0d,QA	8	73.0175	2.408617
14d,A	8	72.54125	2.408617
14d,C	8	63.86125	2.408617
14d,Q	6	63.63833	2.781231
14d,QA	6	60.3	2.781231

**Analysis of Variance Report
Plots Section**



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: L_2
Term A: tiempo_2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=52 MSE=46.41147 Critical Value=2.8378

Group	Count	Mean	Different From Groups
14d	28	65.08521	0d
0d	32	75.30968	14d

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Analysis of Variance Report

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: L_2
Term B: trat_2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=52 MSE=46.41147 Critical Value=3.7535

Group	Count	Mean	Different From Groups
QA	14	66.65875	A
Q	14	68.42667	A
C	16	69.54	A
A	16	76.16438	QA, Q, C

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

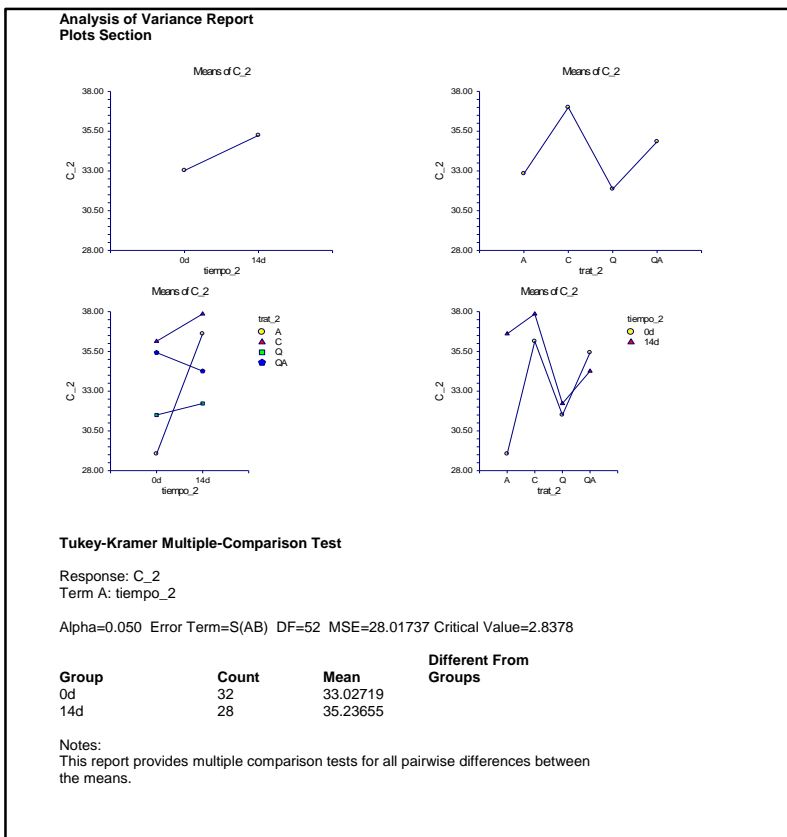
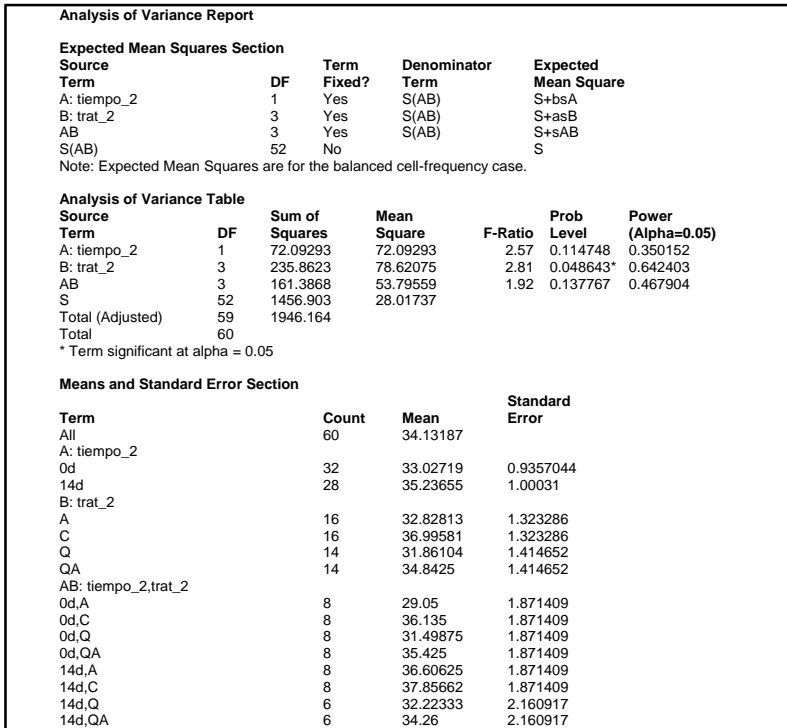
Response: L_2
Term AB: tiempo_2, trat_2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=52 MSE=46.41147 Critical Value=4.4654

Group	Count	Mean	Different From Groups
14d,QA	6	60.3	(14d,A), (0d,QA), (0d,Q), (0d,C), (0d,A)
14d,Q	6	63.63833	(0d,A)
14d,C	8	63.86125	(0d,C), (0d,A)
14d,A	8	72.54125	(14d,QA)
0d,QA	8	73.0175	(14d,QA)
0d,Q	8	73.215	(14d,QA)
0d,C	8	75.21875	(14d,QA), (14d,C)
0d,A	8	79.7875	(14d,QA), (14d,Q), (14d,C)

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

5. Cromo (C) interno en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13 °C.



Analysis of Variance Report

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C_2
Term B: trat_2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=52 MSE=28.01737 Critical Value=3.7535

Group	Count	Mean	Different From Groups
Q	14	31.86104	
A	16	32.82813	
QA	14	34.8425	
C	16	36.99581	

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: C_2
Term AB: tiempo_2, trat_2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=52 MSE=28.01737 Critical Value=4.4654

Group	Count	Mean	Different From Groups
Od,A	8	29.05	(14d,C)
Od,Q	8	31.49875	
14d,Q	6	32.22333	
14d,QA	6	34.26	
Od,QA	8	35.425	
Od,C	8	36.135	
14d,A	8	36.60625	
14d,C	8	37.85662	(Od,A)

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

6. Ángulo de tono (*hue*) interno en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13 °C.

Analysis of Variance Report

Expected Mean Squares Section

Source Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: tiempo_2	1	Yes	S(AB)	S+bsA
B: trat_2	3	Yes	S(AB)	S+asB
AB	3	Yes	S(AB)	S+asAB
S(AB)	52	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: tiempo_2	1	21483.03	21483.03	183.45	0.000000*	1.000000
B: trat_2	3	2816.849	938.9498	8.02	0.000174*	0.986149
AB	3	4460.82	1486.94	12.70	0.000002*	0.999645
S	52	6089.602	117.1077			
Total (Adjusted)	59	33702.57				
Total	60					

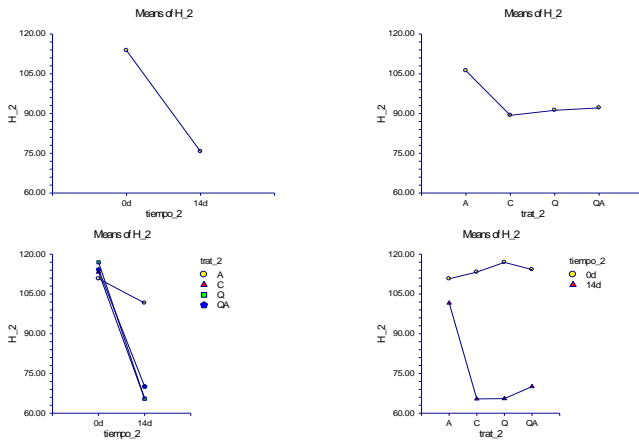
* Term significant at alpha = 0.05

Means and Standard Error Section

Term	Count	Mean	Standard Error
All	60	94.70802	
A: tiempo_2			
Od	32	113.7775	1.913012
14d	28	75.63854	2.045096
B: trat_2			
A	16	106.1594	2.705408
C	16	89.32437	2.705408
Q	14	91.21625	2.892203
QA	14	92.13208	2.892203
AB: tiempo_2, trat_2			
Od,A	8	110.7312	3.826025
Od,C	8	113.2487	3.826025
Od,Q	8	116.9325	3.826025
Od,QA	8	114.1975	3.826025
14d,A	8	101.5875	3.826025
14d,C	8	65.4	3.826025
14d,Q	6	65.5	4.417913
14d,QA	6	70.06667	4.417913

Analysis of Variance Report

Plots Section



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: H_2
 Term A: tiempo_2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=52 MSE=117.1077 Critical Value=2.8378

Group	Count	Mean	Different From Groups
14d	28	75.63854	0d
0d	32	113.7775	14d

Notes:
 This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Analysis of Variance Report

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: H_2
 Term B: trat_2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=52 MSE=117.1077 Critical Value=3.7535

Group	Count	Mean	Different From Groups
C	16	89.32437	A
Q	14	91.21625	A
QA	14	92.13208	A
A	16	106.1594	C, Q, QA

Notes:
 This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

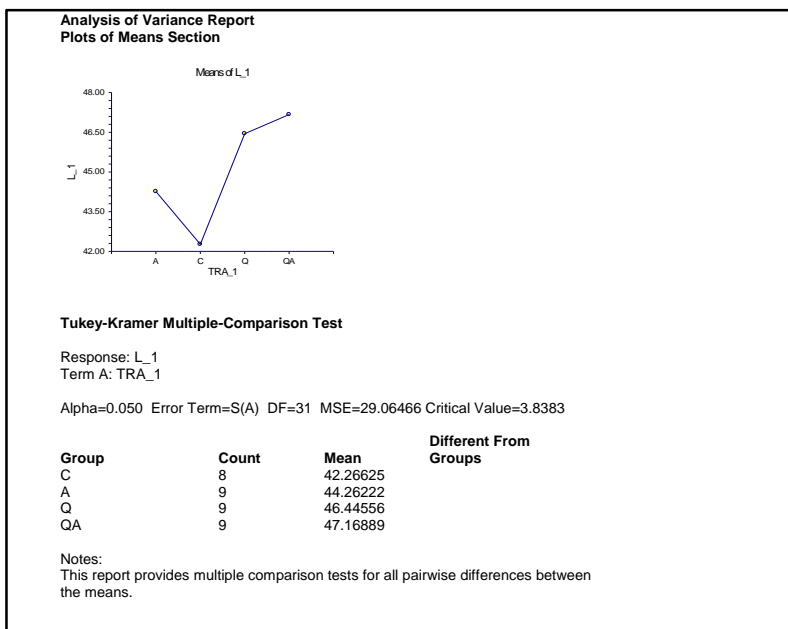
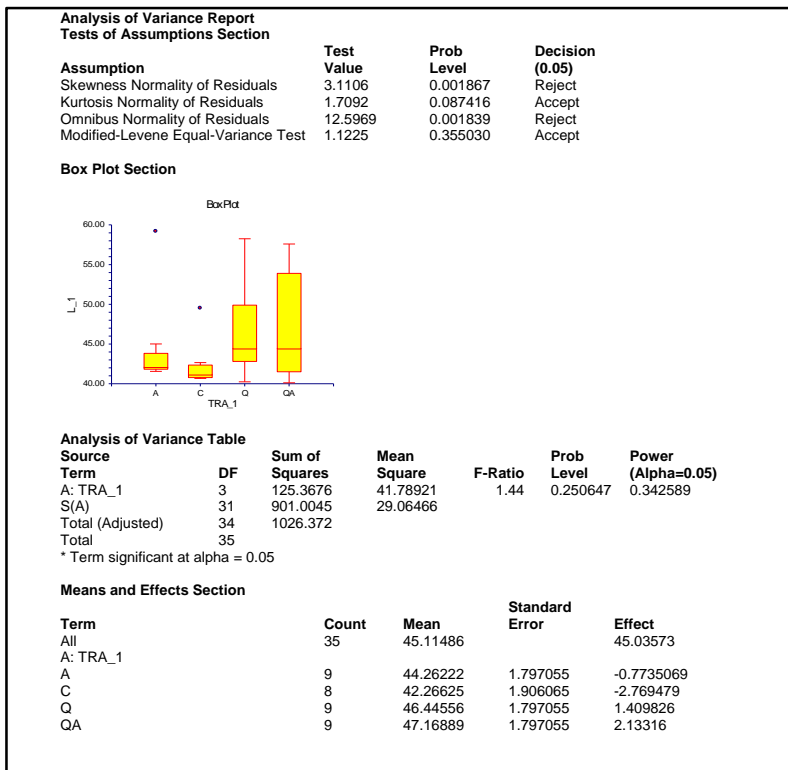
Response: H_2
 Term AB: tiempo_2, trat_2

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=52 MSE=117.1077 Critical Value=4.4654

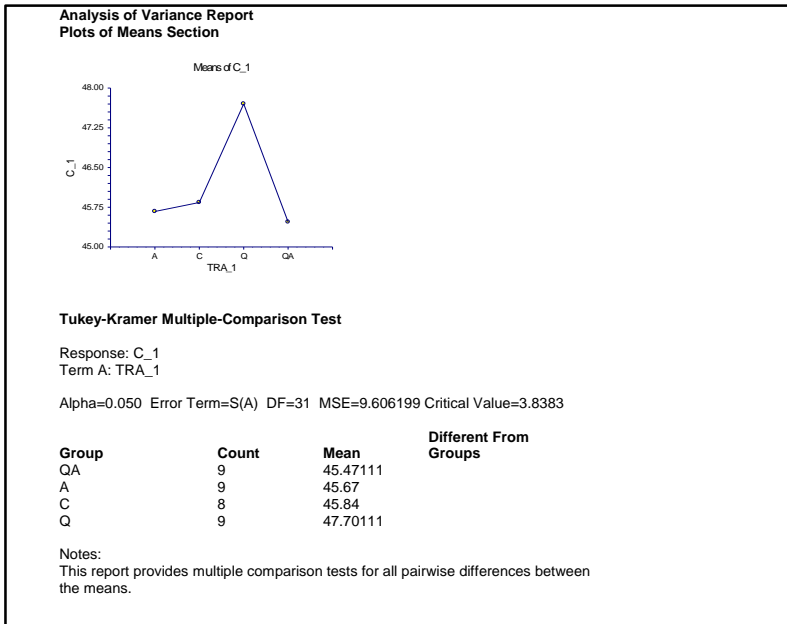
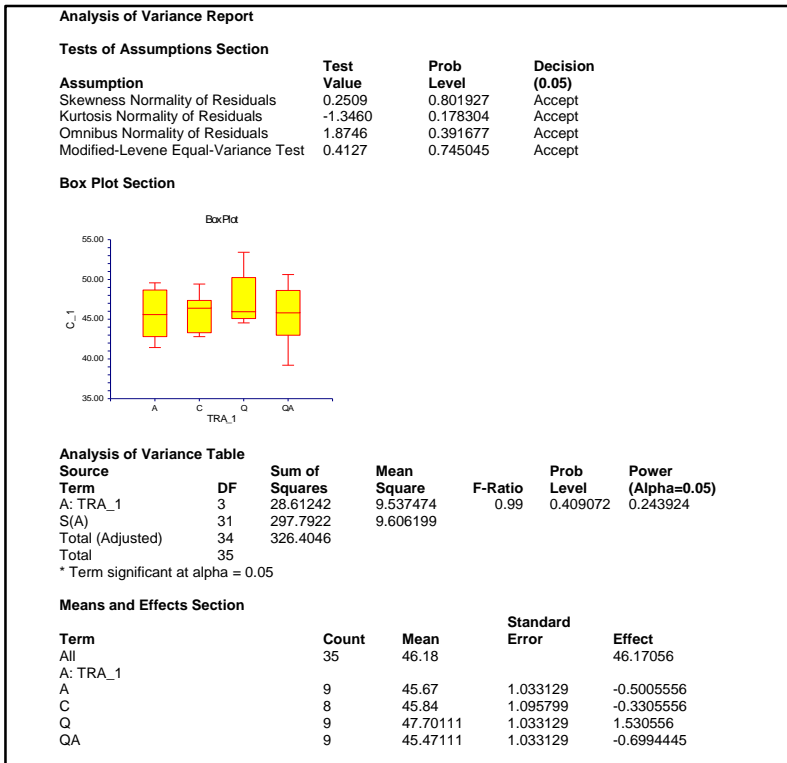
Group	Count	Mean	Different From Groups
14d,C	8	65.4	(14d,A), (0d,A), (0d,C), (0d,QA), (0d,Q)
14d,Q	6	65.5	(14d,A), (0d,A), (0d,C), (0d,QA), (0d,Q)
14d,QA	6	70.06667	(14d,A), (0d,A), (0d,C), (0d,QA), (0d,Q)
14d,A	8	101.5875	(14d,C), (14d,Q), (14d,QA)
0d,A	8	110.7312	(14d,C), (14d,Q), (14d,QA)
0d,C	8	113.2487	(14d,C), (14d,Q), (14d,QA)
0d,QA	8	114.1975	(14d,C), (14d,Q), (14d,QA)
0d,Q	8	116.9325	(14d,C), (14d,Q), (14d,QA)

Notes:
 This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

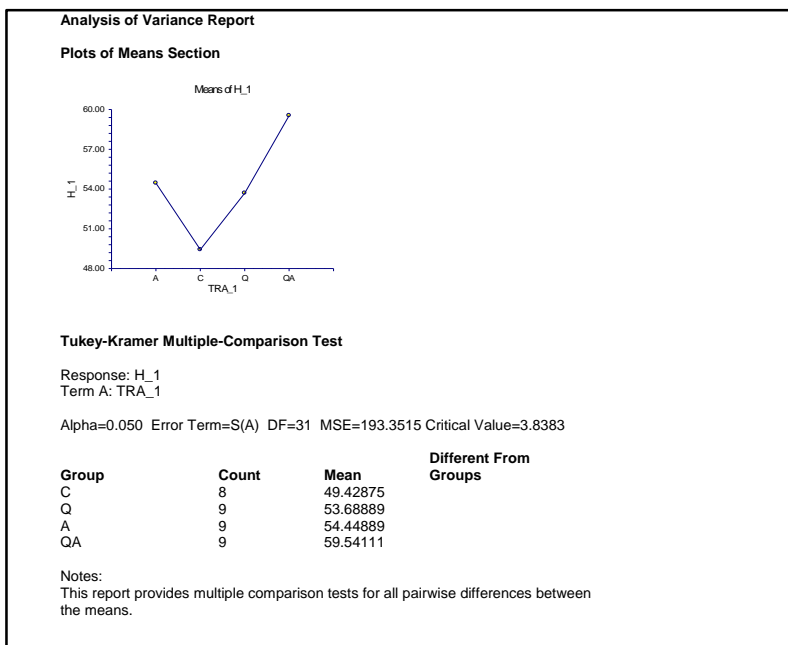
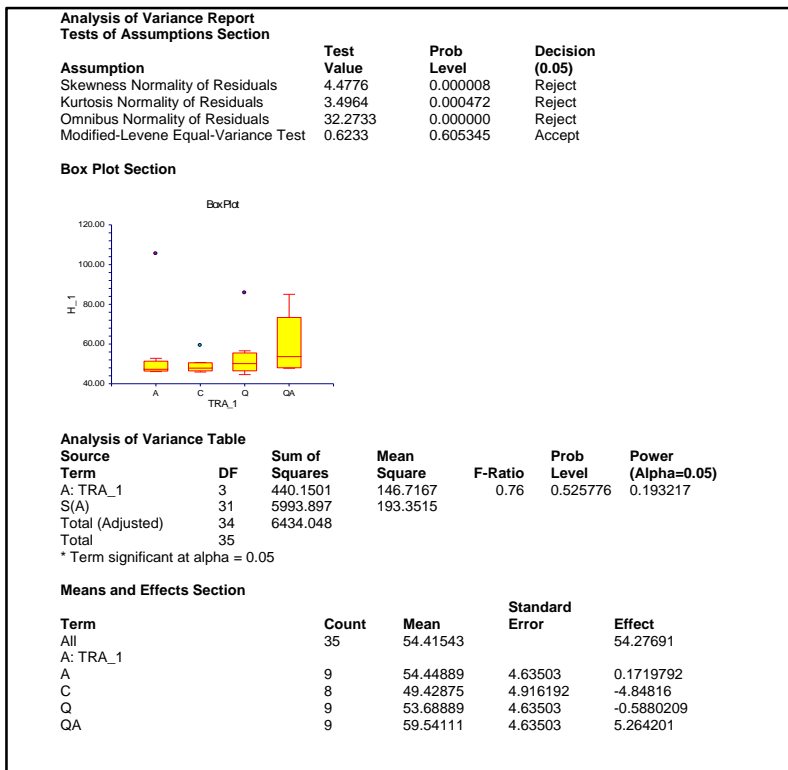
7. Luminosidad (L^*) externo en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20 °C.



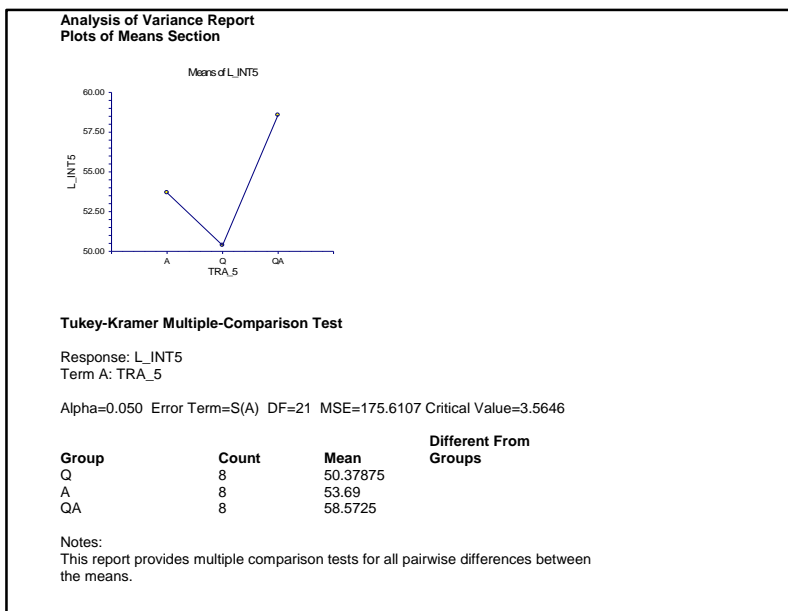
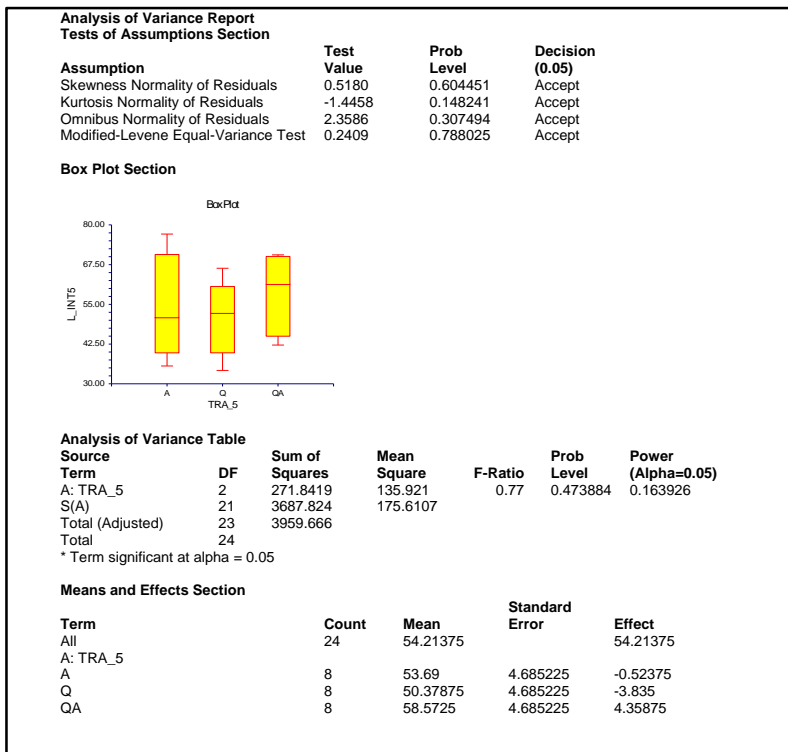
8. Cromo (C) externo en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20 °C.



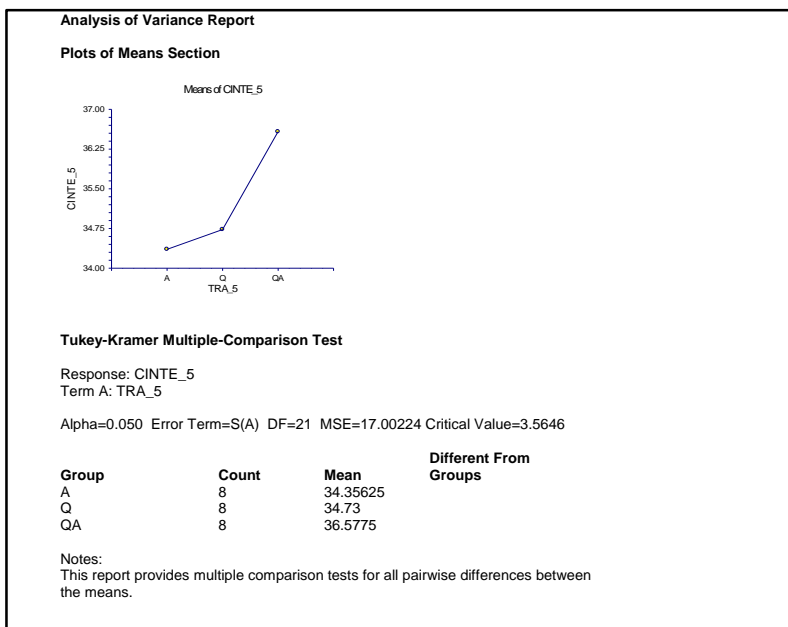
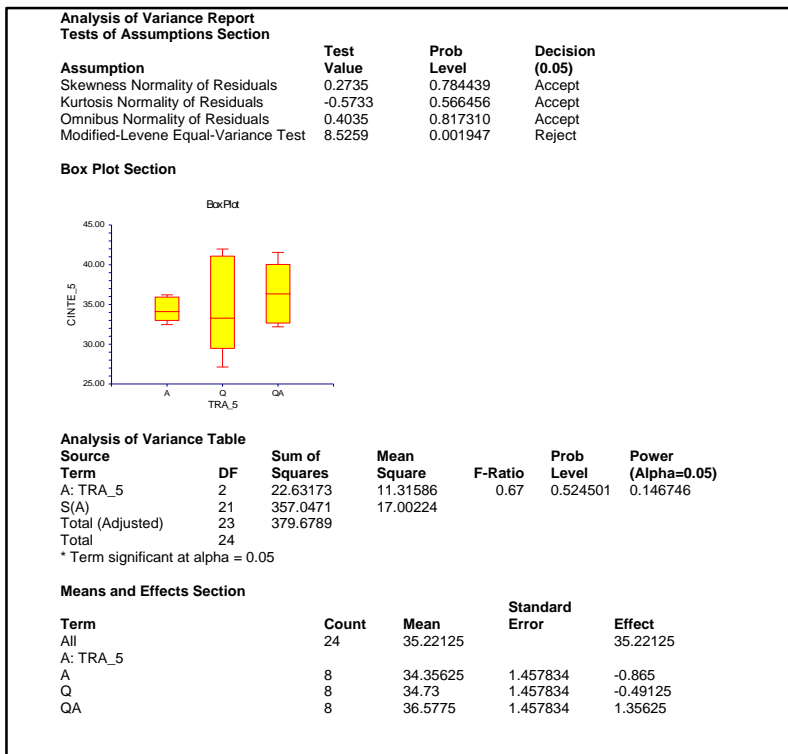
9. Ángulo de tono (hue) externo en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20 °C.



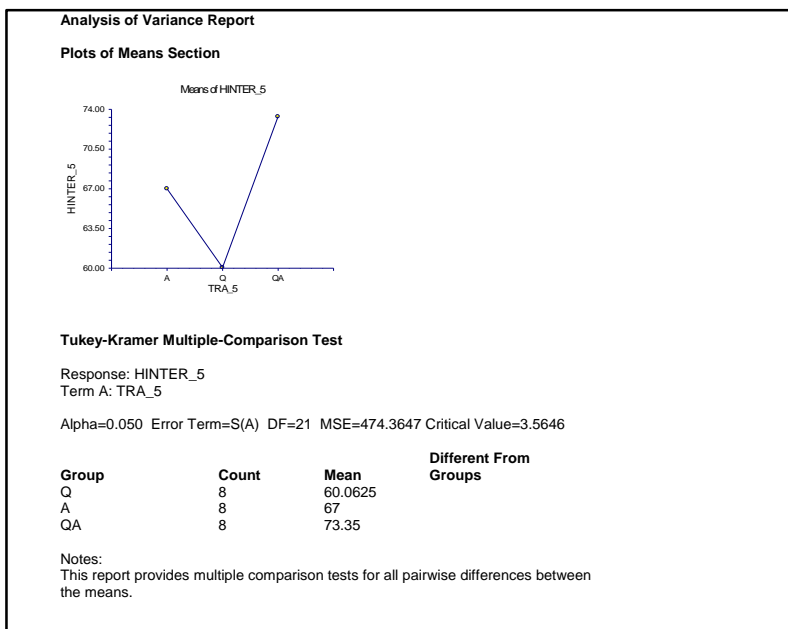
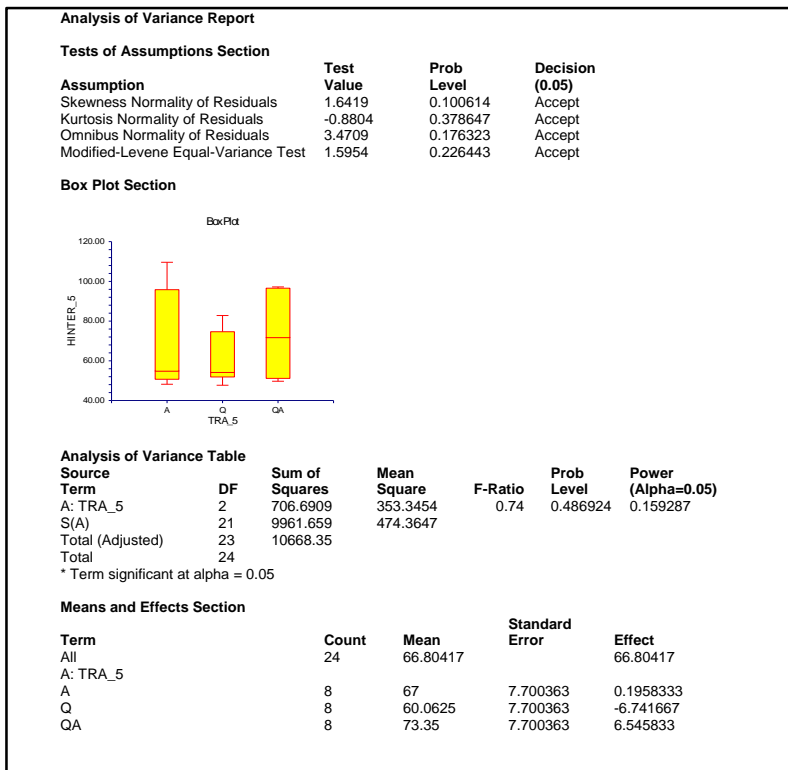
10. Luminosidad (L^*) interno en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20 °C.



11. Cromo (C) interno en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20 °C.



12. Ángulo de tono (hue) interno en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20 °C.



ANEXO 8. Análisis de Varianza Realizado en el Parámetro de Firmeza en Tomate Var. Saladette a 13 °C y 20 °C

1. Firmeza en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 13 °C.

Analysis of Variance Report

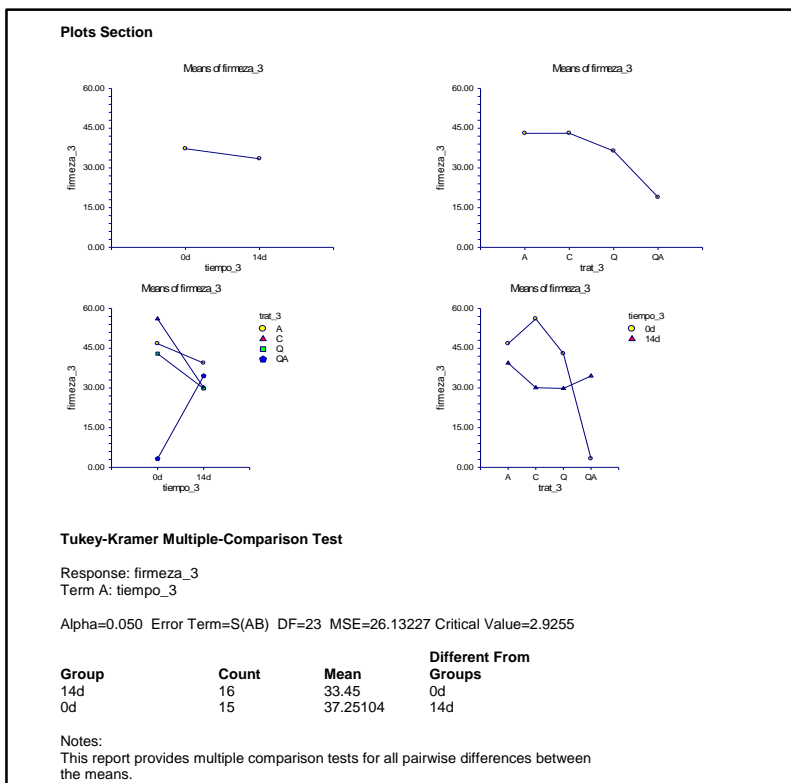
Expected Mean Squares Section				
Source Term	DF	Term Fixed?	Denominator Term	Expected Mean Square
A: tiempo_3	1	Yes	S(AB)	S+bsA
B: trat_3	3	Yes	S(AB)	S+asB
AB	3	Yes	S(AB)	S+sAB
S(AB)	23	No		S

Note: Expected Mean Squares are for the balanced cell-frequency case.

Analysis of Variance Table						
Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: tiempo_3	1	110.96	110.96	4.25	0.050826	0.505748
B: trat_3	3	3059.075	1019.692	39.02	0.000000*	1.000000
AB	3	3642.901	1214.3	46.47	0.000000*	1.000000
S	23	601.0423	26.13227			
Total (Adjusted)	30	7359.232				
Total	31					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Standard Error Section			
Term	Count	Mean	Standard Error
All	31	35.35052	
A: tiempo_3			
Od	15	37.25104	1.319906
14d	16	33.45	1.277993
B: trat_3			
A	7	43.05208	1.932144
C	8	43.08125	1.807356
Q	8	36.38125	1.807356
QA	8	18.8875	1.807356
AB: tiempo_3, trat_3			
Od,A	3	46.71667	2.951399
Od,C	4	56.0875	2.555987
Od,Q	4	42.95	2.555987
Od,QA	4	3.25	2.555987
14d,A	4	39.3875	2.555987
14d,C	4	30.075	2.555987
14d,Q	4	29.8125	2.555987
14d,QA	4	34.525	2.555987



Analysis of Variance Report

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: firmeza_3
Term B: trat_3

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=23 MSE=26.13227 Critical Value=3.9136

Group	Count	Mean	Different From Groups
QA	8	18.8875	Q, A, C
Q	8	36.38125	QA
A	7	43.05208	QA
C	8	43.08125	QA

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: firmeza_3
Term AB: tiempo_3, trat_3

Alpha=0.050 Error Term=S(AB) DF=23 MSE=26.13227 Critical Value=4.7019

Group	Count	Mean	Different From Groups
0d,QA	4	3.25	(14d,Q), (14d,C), (14d,QA), (14d,A), (0d,Q), (0d,A), (0d,C)
14d,Q	4	29.8125	(0d,QA), (0d,Q), (0d,A), (0d,C)
14d,C	4	30.075	(0d,QA), (0d,Q), (0d,A), (0d,C)
14d,QA	4	34.525	(0d,QA), (0d,C)
14d,A	4	39.3875	(0d,QA), (0d,C)
0d,Q	4	42.95	(0d,QA), (14d,Q), (14d,C), (0d,C)
0d,A	3	46.71667	(0d,QA), (14d,Q), (14d,C)
0d,C	4	56.0875	(0d,QA), (14d,Q), (14d,C), (14d,QA), (14d,A), (0d,Q)

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.

2. Firmeza en tomate recubierto de diferentes formulaciones de RCs, durante el almacenamiento a 20 °C.

Analysis of Variance Report

Tests of Assumptions Section

Assumption	Test Value	Prob Level	Decision (0.05)
Skewness Normality of Residuals	2.3685	0.017858	Reject
Kurtosis Normality of Residuals	1.3672	0.171565	Accept
Omnibus Normality of Residuals	7.4792	0.023764	Reject
Modified-Levene Equal-Variance Test	0.3584	0.784109	Accept

Box Plot Section

Analysis of Variance Table

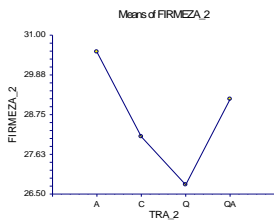
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power (Alpha=0.05)
A: TRA_2	3	30.57125	10.19042	0.38	0.768209	0.104583
S(A)	12	320.5638	26.71365			
Total (Adjusted)	15	351.135				
Total	16					

* Term significant at alpha = 0.05

Means and Effects Section

Term	Count	Mean	Standard Error	Effect
All	16	28.65		28.65
A: TRA_2				
A	4	30.525	2.584262	1.875
C	4	28.125	2.584262	-0.525
Q	4	26.7625	2.584262	-1.8875
QA	4	29.1875	2.584262	0.5375

**Analysis of Variance Report
Plots of Means Section**



Tukey-Kramer Multiple-Comparison Test

Response: FIRMEZA_2
Term A: TRA_2

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=26.71365 Critical Value=4.1987

Group	Count	Mean	Different From Groups
Q	4	26.7625	
C	4	28.125	
QA	4	29.1875	
A	4	30.525	

Notes:
This report provides multiple comparison tests for all pairwise differences between the means.