



**Centro de Investigación en Alimentación
y Desarrollo, A.C.**

**PROPIEDADES DE BARRERA A LA HUMEDAD Y AL
CRECIMIENTO MICROBIANO DE RECUBRIMIENTOS DE
QUITOSANO-CERA DE CARNAUBA-ACEITE ESENCIAL
DE ORÉGANO EN FRUTOS DE PEPINO**

Por:

Q. A. María Melissa Gutiérrez Pacheco

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

Agosto de 2015

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de la Q. A. María Melissa Gutiérrez Pacheco, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala

Director de Tesis



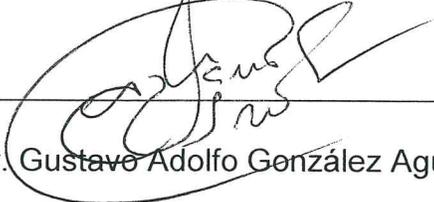
M. C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela

Asesor



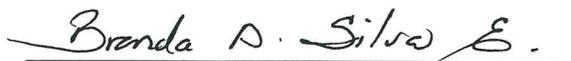
Dr. Jaime Lizardi Mendoza

Asesor



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar

Asesor



M. C. Brenda Adriana Silva Espinoza

Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por permitirme realizar mis estudios de maestría y poder alcanzar una meta importante en mi formación.

A la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV), por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación en esta área, facilitándome sus equipos y mis reiteradas gratificaciones para el personal que labora en esta coordinación.

Un especial agradecimiento a mi director de tesis el Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala por su asesoría en la realización de mi tesis, sus consejos y enseñanzas brindadas, las cuales sin duda alguna hicieron de mí una mejor profesionista. También, quiero agradecerle su amistad, confianza y sonrisas brindadas.

Agradezco a mi comité de tesis integrado por la M. C. Brenda Adriana Silva Espinoza, M. C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela, Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar y Dr. Jaime Lizardi Mendoza, por la asesoría y apoyo brindado a lo largo de estos dos años. Muchas Gracias.

A todas aquellas personas que contribuyeron a la realización de mi trabajo de tesis: Ing. German Cumplido Barbeitia, M. C. Karla Robinson, M. C. Elizabeth Peralta, Q. B. María del Carmen Granados, Q. B. Mónica Villegas y al Q. A. Nicolás Rodríguez.

DEDICATORIAS

A Dios, por estar siempre a mi lado en cada momento y llenarme de bendiciones.
A mis padres Olga y Juan José, por estar a mi lado en cada momento, por darme la vida, por enseñarme a ser una persona de bien y a superarme día con día. Siempre les estaré eternamente agradecida por la confianza y el gran amor puro y sincero que me han brindado. Porque sin estar juntos físicamente, lo estamos de corazón y pensamiento. Esto es por ustedes y para ustedes, los amo con todo mi corazón.

A mi hermano Juanito, por todos los momentos felices que me ha dado, por tu apoyo siempre incondicional. Me amas, lo sé aunque lo niegues. Siempre les estaré eternamente agradecida a ti y a Sthefan por darme ese pedacito de cielo que me llena de felicidad en cada momento, mi preciosa Luna Violeta.

A mi prometido Luis Alberto, por ser mi compañero de vida, por estar a mi lado en cada momento, por ese apoyo y amor incondicional que siempre me has brindado y por hacerme inmensamente feliz. Te amo con todo mi corazón.

A mi familia por estar a mi lado en todo momento, por su apoyo y por creer en mí.

A mis amigas Anna Judith, Ana Karen, Andrea y Chio por llenarme de momentos felices, por su apoyo y por las largas charlas que hacen que el tiempo y la distancia sean nada cuando estamos juntas, las adoro.

A Brenda Silva, Fernando Ayala y Reynaldo Cruz porque no solo fueron mis asesores, fueron mis amigos. Gracias por todo el cariño y momentos felices, los quiero mucho.

A mis compañeros, Pancho, Melvin, Julián, Rosy, Thaly, Dalila y Ramón por su apoyo, por brindarme su amistad y por tantos momentos divertidos.

A todos los integrantes de la planta piloto de carnes por el gran cariño que me brindaron desde mi inicio en ciad. Siempre le estaré agradecida German por apoyarme y por su amistad.

En especial quiero dedicar este trabajo a esa persona que ha estado a mi lado en todo momento de mi vida, mi hermana Lisdeth. Eres y siempre serás mi media naranja. Gracias por todas las experiencias compartidas a lo largo de toda nuestra vida. Siempre te estaré eternamente agradecida por tu amor y tu carisma que hacen de mis días algo maravilloso. Por encontrar siempre las palabras adecuadas para hacerme sentir bien en momentos de debilidad o tristeza. Dios acertó al traerme a la vida pero contigo, te amo.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE CUADROS	xi
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	4
La Deshidratación y Contaminación Microbiana Afectan la Calidad Poscosecha de Pepino	4
Recubrimientos Comestibles y su Efecto en la Calidad Poscosecha	5
Aceite Esencial de Orégano: Composición Química y Uso como Agente Antimicrobiano en Alimentos	14
HIPÓTESIS	23
OBJETIVOS	24
Objetivo General	24
Objetivos Específicos	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Formulación y Caracterización de las Propiedades de Barrera y Capacidad Antimicrobiana de los Recubrimientos	25
Materiales	25
Elaboración de las Películas	25
Grosor y Transmisión al Vapor de Agua (TVA)	26
Capacidad Antimicrobiana <i>in vitro</i> de Películas de Quitosano-cera-AEO	27
Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR)	28
Evaluación del Efecto de la Aplicación de los Recubrimientos Comestibles sobre la Deshidratación y Deterioro Microbiano de Pepino	28
Selección de la Materia Prima	28
Recubrimiento de Pepinos con Quitosano-cera-AEO	28
Pérdida de Peso	29
Análisis Microbiológico	29

CONTENIDO (continuación)

	Página
Análisis Estadístico.....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Formulación y Caracterización de las Propiedades de Barrera y Capacidad Antimicrobiana de los Recubrimientos.....	31
Grosor y TVA de Películas de Quitosano-cera-AEO	31
Efecto Antimicrobiano <i>in vitro</i> de Películas de Quitosano-cera-AEO .	33
Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR)	40
Evaluación del Efecto de la Aplicación de los Recubrimientos Comestibles sobre la Deshidratación y Deterioro Microbiano de Pepino	45
Pérdida de Peso	45
Efecto Antimicrobiano de Recubrimientos Bicapa de Cera de Carnauba-quitosano adicionadas con AEO	48
CONCLUSIÓN	56
REFERENCIAS	57

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	Página
1. Los recubrimientos bicapa son elaborados mediante la laminación sucesiva de dos materiales sobre el alimento	7
2. La estructura del quitosano está conformada de unidades de N-acetilglucosamina por enlaces β , 1-4.....	9
3. Estructura química de carvacrol y timol, los principales constituyentes del AEO.	16
4. Carvacrol y timol desintegran la membrana celular bacteriana provocando un aumento de permeabilidad y liberación de constituyentes celulares.	17
5. Los recubrimientos comestibles bicapa proveen una matriz protectora para compuestos bioactivos evitando su difusión al medio ambiente y neutralización por contacto con el alimento.....	21
6. Efecto antimicrobiano de películas comestibles contra la microflora bacteriana (A) y fúngica (B) nativa de pepino.....	35
7. Efecto antibacteriano de películas comestibles contra <i>S. Typhimurium</i> (A) y <i>E. coli</i> O157:H7 (B).	36
8. Efecto antifúngico de películas comestibles contra <i>A. alternata</i> . Línea punteada indica carga fúngica inicial.....	38
9. Espectros FT-IR de las películas de quitosano, cera y quitosano-cera, donde se muestran interacciones entre los grupos O-H y C=O del quitosano y componentes lipídicos de la cera.	41
10. Espectros FT-IR del AEO y las películas de quitosano y cera adicionadas con AEO, donde se muestran interacciones entre los grupos O-H y N-H del quitosano y O-H de los terpenos del AEO.....	42
11. Espectro FT-IR de película de quitosano-cera-AEO donde se muestra la aparición de nuevas bandas de absorción e interacciones entre los grupos N-H, O-H y C=O del quitosano con componentes del AEO y cera.	43
12. Pérdida de peso de pepinos frescos recubiertos con cera, quitosano, quitosano-cera, cera-AEO, quitosano-AEO y quitosano-cera-AEO almacenados a 10 °C durante 15 días.....	46

LISTA DE FIGURAS (continuación)

<i>Figura</i>	Página
13. Efecto de la temperatura de almacenamiento (25 y 10 °C) sobre la superficie de pepino recubierto con cera, así como falta de homogeneidad de la película de quitosano-cera sobre la superficie del fruto (regiones marcadas con flechas). Imágenes tomadas con microscopio estereoscópico Olympus SZX12 a una magnitud de 0.7-9x.....	49
14. El efecto antibacteriano del quitosano se da por con el contacto directo de sus sitios activos con los microorganismos.....	52

LISTA DE CUADROS

<i>Cuadro</i>	Página
1. Composición química de la cera de carnauba.	12
2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano (AEO) y sus principales componentes probados <i>in vitro</i> contra patógenos alimentarios.....	19
3. Grosor y TVA de películas comestibles de quitosano-cera-AEO.	32
4. Efecto antibacteriano de películas comestibles en pepinos almacenados a 10 °C durante 15 días.....	50
5. Conteo de hongos y levaduras de pepinos recubiertos con películas comestibles almacenados a 10 °C durante 15 días.....	54

RESUMEN

El pepino (*Cucumis sativus* L.) es un fruto que posee un alto contenido de agua lo cual lo hace susceptible a la deshidratación y deterioro microbiano, comprometiendo su calidad poscosecha. En este contexto, el objetivo de la presente tesis fue elaborar y caracterizar recubrimientos bicapa a base de cera de carnauba y quitosano adicionados con aceite esencial de orégano (AEO) para mantener la calidad poscosecha de pepino almacenado a 10 °C durante 15 días. Las películas de quitosano-cera-AEO mostraron la menor transmisión al vapor de agua (0.141 g/m²/h), la cual fue significativamente inferior a las películas de quitosano (0.257 g/m²/h). Por otro lado, el análisis de infrarrojo de las películas de quitosano-cera-AEO mostró un desfase en las bandas de absorción de los grupos O-H, N-H y C=O indicando posibles interacciones entre sus componentes. Asimismo, las películas de quitosano-AEO (2 mg/mL) inhibieron completamente el crecimiento de *Alternaria alternata* y redujeron la carga de bacterias y hongos nativos de pepino, *Salmonella* Typhimurium (inoculada) y *Escherichia coli* (inoculada) en 3.23, 1.12, 3.12 y 3.45 log UFC/mL, respectivamente. Los pepinos recubiertos con cera mostraron la menor pérdida de peso en comparación con los demás tratamientos y los frutos testigo. Adicionalmente, los pepinos recubiertos con quitosano tuvieron la carga más baja de mesófilos aerobios al final del almacenamiento. Por otro lado, no se observaron diferencias de la carga de hongos y levaduras entre los tratamientos, presentando cargas menores a los frutos testigo. En conclusión, las películas con los componentes individuales tuvieron un mayor efecto como barrera a la pérdida de agua y/o crecimiento microbiano que la combinación de quitosano-cera-AEO.

Palabras clave: *Cucumis sativus* L., deshidratación, actividad antimicrobiana, recubrimientos bicapa, aceites esenciales, aditivos alimentarios.

ABSTRACT

Cucumber (*Cucumis sativus* L.) has a high water content that makes it susceptible to dehydration and microbial spoilage, compromising its postharvest quality. Therefore, the objective of this thesis was to develop and characterize carnauba wax and chitosan based bilayer coatings added with oregano essential oil (OEO) to maintain postharvest quality of cucumber stored at 10 °C during 15 days. Chitosan-wax-OEO films showed the lowest water vapor transmission rates (0.141 g/m²/h), being significantly lower compared to chitosan films (0.257 g/m²/h). On the other hand, infrared analysis of chitosan-wax-OEO films showed a shift in the absorption bands of O-H, N-H and C=O groups indicating possible interactions among their components. Likewise, chitosan-OEO films completely inhibited the growth of *Alternaria alternata* and reduced the counts of native bacteria and fungi of cucumber, *Salmonella* Typhimurium (inoculated) and *Escherichia coli* (inoculated) on 3.23, 1.12, 3.12 and 3.45 log CFU/mL, respectively. Wax coated cucumbers showed less weight loss compared to other treatments and control fruits. Additionally, chitosan coated cucumbers had the lowest counts of aerobic mesophilic bacteria at the end of storage. While, no differences were observed in mold and yeast counts among treatments, showing lower counts than control fruits. In conclusion, the individual components of the films have a greater effect as barrier of water loss and/or microbial growth than the combination of chitosan-wax-OEO.

Keywords: *Cucumis sativus* L., dehydration, antimicrobial activity, bilayer coatings, essential oils, food additives.

INTRODUCCIÓN

El pepino (*Cucumis sativus* L.) es un fruto perteneciente a la familia de las Cucurbitáceas (Paris 2001). Es ampliamente consumido en forma fresca, es rico en potasio, posee valores aceptables de magnesio, hierro, y presenta un bajo contenido en calorías (Carnide y Barroso 2006). Sin embargo, este y otros productos hortícolas son ricos en agua, por lo que sufren deshidratación, el cual es uno de los principales factores de deterioro que provoca pérdidas cuantitativas, de apariencia y calidad nutritiva (Giménez-Miralles 2013). También son susceptibles al ataque de bacterias y hongos, siendo los más comunes *Alternaria spp.* y *Rhizopus spp.* Esto ha conllevado a pérdidas durante el periodo que va desde la recolección hasta el consumo (Giménez-Miralles 2013). Es por esto, que existe una gran necesidad de métodos de conservación que le provean una protección a la transferencia de agua así como al ataque de microorganismos.

En este sentido, una alternativa es el uso de recubrimientos comestibles (RC), los cuales tienen la capacidad de actuar como barreras semipermeables al intercambio de gases, migración de solutos y humedad (Falguera *et al.*, 2011; Silva-Weiss *et al.*, 2013). Existen diferentes tipos de materiales utilizados para la elaboración de RC, entre los que se encuentran proteínas, lípidos y polisacáridos (Falguera *et al.*, 2011). Los polisacáridos presentan buenas propiedades de barrera a los gases; sin embargo, estos son altamente hidrofílicos y muestran una alta permeabilidad al vapor de agua (Embuscado y Huber 2009; Dhall 2013). Por otra parte, los lípidos, debido a su naturaleza hidrofóbica muestran buenas propiedades de barrera al agua, no obstante, su carácter no polimérico limita su habilidad para formar películas con

buena integridad mecánica (Pérez-Gago y Krochta 2005). En este sentido, la combinación de ambos materiales en forma de un recubrimiento bicapa puede mejorar su funcionalidad. Esto se basa en el hecho de que cada recubrimiento de manera individual tiene funciones únicas y limitadas; sin embargo, su combinación podría ayudar a mejorar su funcionalidad (Lin y Zhao 2007). Entre los materiales con potencial para ser utilizados en recubrimientos bicapa se encuentra el quitosano. Este compuesto obtenido generalmente de la desacetilación alcalina de la quitina ha sido utilizado ampliamente por sus propiedades antimicrobianas. Se ha reportado que la aplicación de recubrimientos de quitosano ha extendido la vida útil de vegetales (Jiang y Li 2001; Durango *et al.*, 2006). Por otra parte, la cera de carnauba, la cual es obtenida de las hojas de la palma *Copernicia cerifera*, es reconocida generalmente como segura y ha sido comúnmente añadida a las formulaciones de recubrimientos comestibles debido a su barrera a la transferencia al vapor de agua.

Cabe destacar que los recubrimientos bicapa además de las propiedades funcionales que presentan también poseen un alto potencial para acarrear ingredientes activos. Estos proveen una matriz protectora a los compuestos, evitando su difusión al medio ambiente, interacción con componentes propios del alimento, etc., lo cual conlleva a la pérdida de su funcionalidad (Ayala-Zavala *et al.*, 2008). Asimismo, estos permiten que se mantengan las concentraciones efectivas de los ingredientes activos durante el tiempo de almacenamiento, permitiendo así su liberación controlada (Ouattara *et al.*, 2000). Entre los ingredientes activos que pueden ser acarreados por recubrimientos bicapa se encuentran algunos compuestos antimicrobianos, como el aceite esencial de orégano (AEO) (Pranoto *et al.*, 2005).

Existen datos publicados de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales aplicados en alimentos, mostrando diferentes valores de eficacia dependiendo el tipo: orégano/ clavo/ semilla de cilantro/ canela> tomillo> menta> romero> mostaza> cilantro/ salvia (Burt 2004). Lo anterior hace

evidente que el AEO es uno de los antimicrobianos más potentes. La actividad antibacteriana del AEO es atribuida a sus compuestos monoterpénicos carvacrol y timol (Beirão da Costa *et al.*, 2012). Como resultado de su carácter lipofílico, pueden embeberse en la membrana lipídica bacteriana provocando una expansión de la misma, alteración de sistemas enzimáticos y pérdida de sus constituyentes celulares (Kim *et al.*, 1995; Ayala-Zavala *et al.*, 2011). Por otra parte, se hipotetiza que la actividad antifúngica del AEO es atribuida a la interacción de los compuestos antes mencionados por puentes de hidrógeno con los sitios activos de enzimas. Además, pueden evitar la síntesis de metabolitos de importancia tales como fosfolípidos y esteroides (Lucini y col., 2006).

En base a lo anterior, los recubrimientos bicapa (a base de polisacáridos y lípidos) aplicados en pepino pueden proveerle una barrera a la transferencia de agua y evitar así su deshidratación. Además, la incorporación de AEO puede potenciar el efecto antimicrobiano del RC y así evitar el deterioro microbiano poscosecha de pepino.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

La Deshidratación y Contaminación Microbiana Afectan la Calidad Poscosecha de Pepino

El pepino *C. sativus* L., es una planta herbácea, anual, perteneciente a la familia de las Cucurbitáceas, una de las familias de plantas más variadas genéticamente e importantes desde el punto de vista del consumo humano (Robinson y Decker-Walters 1999). En México, el cultivo de pepino ocupa el segundo lugar en importancia entre las hortalizas exportadas, superado solamente por el tomate (Siller 2000). Sinaloa alcanzó el primer lugar en superficie sembrada de esta hortaliza en el 2004, con una superficie plantada de alrededor de 6000 ha (SIAP-SAGARPA 2004). El fruto de esta cucurbitácea se cosecha inmaduro, con un 96% de agua en sus tejidos (Rangel *et al.*, 2004). Éste es ampliamente consumido, principalmente fresco en forma de ensaladas.

Uno de los principales problemas poscosecha del pepino es la pérdida de agua a través de la transpiración y respiración del fruto; ocurriendo como consecuencia la pérdida de firmeza (Cazier 2000). Asimismo, debido a su alto contenido de agua es susceptible a deterioro fúngico por hongos como *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, entre otros (Snowdon 2010; UCDAVIS 2013). Los productos frescos como el pepino, típicamente contiene una compleja mezcla de bacterias, hongos y levaduras que son característicos y cuya población y tipos es muy variable (Zagory 1999). En los vegetales, la microflora está dominada por los organismos del suelo. Los patógenos pueden contaminar las verduras crudas a través de prácticas

agrícolas deficientes y sobrevivir durante el procesamiento y distribución (Parras-Jurado 2014). Algunos reportes han mostrado la incidencia de patógenos en productos frescos, tal es el caso de algunas especies de *Salmonella* en cucurbitáceas (pepino y melón) (FDA 2014) y *Escherichia coli* O157:H7 en vegetales de hoja verde como lechuga y espinaca (CDC 2011; CDC 2012). Los tratamientos más comunes para el control de estos microorganismos son el uso de desinfectantes químicos, tales como el cloro, dióxido de cloro, peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos, fosfato trisódico y ozono. Sin embargo, algunos de estos no han tenido mucho éxito en la reducción de la microflora nativa (Brackett 1992).

Por otra parte, el crecimiento de hongos ha sido contrarrestado con el uso de fungicidas sintéticos, pero la aplicación masiva y continuada durante años de materias activas similares (tiabendazol, imazalil, etc.) ha generado graves preocupaciones debido a la contaminación generada por un exceso de residuos químicos y a la proliferación de cepas patogénicas resistentes (Carvalho *et al.*, 2012). Por lo tanto, se necesitan alternativas que provean una protección a este tipo de alimentos como los recubrimientos comestibles, los cuales se han utilizado ampliamente debido a sus propiedades de barrera a la transmisión de vapor de agua y contaminación microbiana.

Recubrimientos Comestibles y su Efecto en la Calidad Poscosecha

Existen diferentes métodos de conservación que pueden disminuir el deterioro de los productos alimenticios como el almacenamiento en frío, irradiación UV, empaclado en atmósferas modificadas y los RC (Lemoine *et al.*, 2007; Sellamuthu *et al.*, 2013). Los RC pueden ser definidos como una delgada capa de material que cubre la superficie del alimento, puede ser consumida como parte del producto (Vargas *et al.*, 2008) y juega un papel importante en su conservación, distribución y mercadeo. Algunas de sus funciones son proteger

al producto alimenticio de daños mecánicos, físicos, químicos, y microbiológicos y por lo tanto extender su vida útil (Falguera *et al.*, 2011). Los RC forman una atmósfera modificada pasiva que puede influenciar diferentes cambios en productos frescos y mínimamente procesados en aspectos tales como actividad antioxidante, color, firmeza, calidad sensorial, inhibición del crecimiento microbiano y producción de etileno (Oms-Oliu *et al.*, 2008).

Los RC pueden ser elaborados a partir de materiales con habilidad para formar películas (Dhall 2013). Éstos en base al número de capas incorporadas pueden ser divididos en recubrimientos monocapa, bicapa y multicapa. La formulación de los RC y su elección depende principalmente del objetivo de la aplicación. Los principales componentes usados para formar recubrimientos comestibles incluyen polisacáridos, proteínas, lípidos y sus mezclas (Falguera *et al.*, 2011; Valencia-Chamorro *et al.*, 2011; Dhall 2013).

Los polisacáridos son los componentes más usados en RC y están presentes en la mayoría de las formulaciones disponibles. Los principales polisacáridos que pueden ser incluidos en las formulaciones de RC son almidón, celulosa y sus derivados, carragenina, pectina, alginato, quitosano, y algunas gomas hidrocoloides (Vargas *et al.*, 2008). Los polisacáridos muestran efectivas propiedades de barrera a los gases, así como buenas propiedades mecánicas lo cual permite obtener distintos materiales como membranas o películas que pueden ser utilizados en el recubrimiento de frutos; sin embargo, estos son altamente hidrofílicos y muestran una alta permeabilidad al agua (Kaminski y Modrzejewska 1997; Embuscado y Huber 2009).

Por otra parte, los lípidos (ácidos grasos, resinas y ceras) se utilizan por sus propiedades hidrófobas que los hacen buenas barreras a la pérdida de humedad, pero su carácter no polimérico limita su habilidad para formar recubrimientos con buena integridad mecánica (Dhall 2013). Teniendo en cuenta las ventajas e inconvenientes de cada grupo, las tendencias se han enfocado en combinar polisacáridos y lípidos a modo de formar lo que se conoce como recubrimientos bicapa, los cuales combinan las propiedades

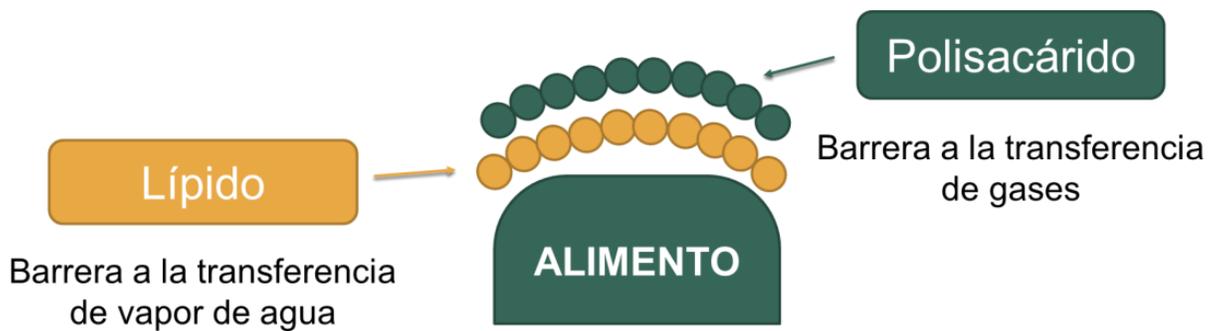


Figura 1. Los recubrimientos bicapa (polisacárido-lípido) son elaborados mediante la laminación sucesiva de dos materiales sobre el alimento.

benéficas de ambos materiales de recubrimiento. Estos son elaborados mediante la laminación de los diferentes materiales de recubrimiento sobre el alimento (Figura 1).

Entre los polisacáridos ampliamente estudiados y con potencial para ser utilizados en RC bicapa se encuentra el quitosano. El quitosano es una molécula polcatiónica lineal, formada por unidades de N-acetilglucosamina con uniones β (1-4) (Figura 2). Este polisacárido, es normalmente obtenido de la desacetilación alcalina de la quitina (Jiang y Li 2001). El quitosano proviene de una fuente natural y renovable, ya que se obtiene a partir de desechos primarios de industrias procesadoras de crustáceos (camarón, cangrejo, langosta, etc.). Es biodegradable y no contaminante, biocompatible tanto en tejidos animales como vegetales, biológicamente funcional y no es tóxico (Peniche *et al.*, 2008). Debido a sus propiedades viscoelásticas y mecánicas, el quitosano tiene la capacidad de formar películas semipermeables.

Se ha reportado que el uso de recubrimientos comestibles de quitosano extiende la vida de anaquel y reduce el deterioro de vegetales (Durango *et al.*, 2006; Chien *et al.*, 2007; Chien *et al.*, 2007). Esto, es atribuido principalmente a su permeabilidad selectiva frente a los gases, una ligera resistencia al vapor de agua, propiedades antifúngicas y antibacterianas (Dutta *et al.*, 2009). El modo exacto por el cual el quitosano ejerce su actividad antimicrobiana no es bien conocido; sin embargo, se han propuesto diferentes mecanismos de acción. Uno de ellos es mediante la interacción entre los grupos amino protonados del quitosano con componentes de la membrana celular del microorganismo, lo cual afecta la permeabilidad y permite la salida de componentes intracelulares (Kong *et al.*, 2010). Otros sugieren que la capacidad quelante del quitosano une selectivamente trazas de metales inhibiendo la producción de toxinas y el crecimiento microbiano. Por último, se cree que la unión del quitosano con el DNA y la inhibición de la síntesis de RNAm y otras proteínas, ocurre cuando

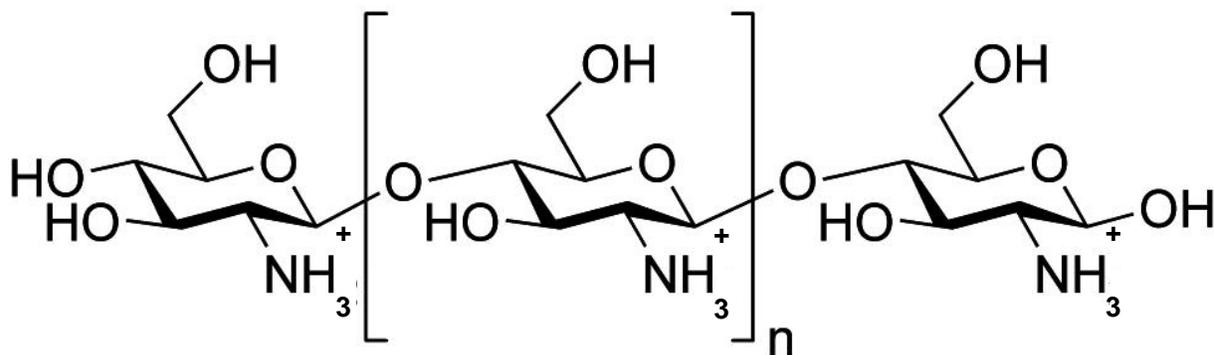


Figura 2. La estructura del quitosano está conformada de unidades de N-acetilglucosamina por enlaces β, 1-4.

este penetra al núcleo del microorganismo (Devlieghere *et al.*, 2004). La actividad antimicrobiana del quitosano contra microorganismos patógenos ha sido reportada por varios autores.

Li *et al.*, (2008) reportan que 0.10 mg/mL de quitosano inhibieron marcadamente el crecimiento de *Xantomonas*. Por otra parte, Tsai *et al.*, (2002) reportan concentraciones mínimas letales para *Bacillus cereus*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, y *Vibrio parahaemolyticus* en el rango de 0.05-0.2 mg/mL. Recubrimientos de quitosano (1%) presentaron un efecto bactericida inhibiendo completamente el crecimiento de *L. monocytogenes* (Coma *et al.*, 2002). Asimismo, se ha reportado que los recubrimientos a base de quitosano reducen el desarrollo de pudriciones causadas por *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer*, *A. alternata* y *Penicillium expansum*, entre otras (Ben-Shalom *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007).

La eficacia de los recubrimientos de quitosano sobre la calidad poscosecha de frutas y vegetales ha sido reportada por varios autores. Chien *et al.*, (2007) evaluaron el efecto de la aplicación de diferentes concentraciones de quitosano (0.5, 1 y 2%) sobre rebanadas de mango. Estos autores observaron que los recubrimientos de quitosano inhibieron de manera significativa el crecimiento de microorganismos. También, Hernández-Munoz *et al.*, (2008) reportan que la aplicación de quitosano (1.5%) sobre fresa inhibe el deterioro fúngico de manera significativa con respecto a un testigo no recubierto, el cual al tercer día de almacenamiento mostró signos de deterioro.

De manera similar, El Ghaouth *et al.*, (1992) recubrieron tomate y observaron que a concentraciones de 2% de quitosano las tasas de respiración disminuyeron. Asimismo, los tomates presentaron mayor firmeza y menor deterioro que la fruta testigo (no recubierta) al final del almacenamiento a 20 °C. Por otra parte, González-Aguilar *et al.*, (2009) aplicaron recubrimientos de quitosano de bajo, mediano y alto peso molecular a concentraciones de 0.01 y 0.02 g/mL sobre cubos de papaya "Maradol". Estos autores pudieron observar

que especialmente los recubrimientos de mediano peso molecular (0.02 g/mL) mantuvieron los mayores niveles de color, firmeza, y actividad antimicrobiana, y disminuyeron la actividad de enzimas poligalacturonasa y pectinmetilesterasa comparado con los testigos.

En lo que respecta a los lípidos, las ceras se han empleado tradicionalmente para aportar brillo a frutas y hortalizas, así como para reducir la pérdida de humedad y tasas de respiración (Saucedo-Pompa *et al.*, 2009). Entre éstas se encuentra la cera de carnauba, la cual es obtenida a partir de hojas de la palma *Copernicia cerifera*. Esta es una sustancia generalmente reconocida como segura (GRAS) y es comúnmente añadida a las formulaciones de RC (Weller *et al.*, 1998). La cera de carnauba está compuesta de ésteres de ácidos grasos saturados que tienen una longitud de cadena de 24 a 32 átomos de carbono entre otros componentes lipídicos (Cuadro 1). Las propiedades de barrera al agua de esta y otras ceras son muy buenas y su permeabilidad al vapor de agua es hasta 10 veces menor que la de películas de lecitina, 25 veces inferior a las de la mayoría de los aceites y entre 100 y 200 veces inferior a la permeabilidad de las películas de polisacáridos (Guilbert *et al.*, 1995).

La aplicación de cera de carnauba en frutos ha sido reportada por algunos autores, tal es el caso de McGuire y Hallman (1995) quienes aplicaron cera de carnauba a una concentración del 5% en guayaba y observaron una reducción de la pérdida de peso y ablandamiento de un 10 a 30%. De manera similar, Chiumarelli y Ferreira (2006) aplicaron diferentes formulaciones de cera de carnauba sobre tomate cv. Década y observaron una reducción en la pérdida de peso, daño mecánico y enfermedades. Por otra parte, Baldwin *et al.*, (1999) aplicaron cera de carnauba a mango fresco cortado y observaron una reducción de la pérdida de peso en un 1.4%, con respecto a recubrimientos a base de celulosa (1.8%) y un testigo no recubierto (1.9%). Como se mencionó anteriormente, algunos materiales de recubrimiento de manera individual poseen ciertas propiedades funcionales que mejoran la vida útil de los productos alimenticios, sin embargo, la combinación de diferentes materiales

Cuadro 1. Composición química de la cera de carnauba.

Componente	% de peso
Hidrocarburos	1.5-3.0
Ésteres	84-85
Alcoholes	6-9
Ácidos grasos libres	3.3-5
Humedad	0.5-1.5
Residuos inorgánicos	1

Fuente: Maldonado (2015)

mejora estas propiedades.

Algunos trabajos reportan la eficacia del uso de sistemas bicapa y multicapa en frutas frescas y mínimamente procesadas. Tal es el caso de Velickova *et al.*, (2013) quienes evaluaron la efectividad de un recubrimiento multicapa de cera de abeja-quitosano-cera de abeja (0.5, 0.8 y 0.5 g/100 g, respectivamente) en la vida útil de fresas almacenadas a 20 °C y 35-40% de humedad relativa, comparadas con recubrimientos monocapa de quitosano. Estos autores encontraron que especialmente los recubrimientos de tres capas disminuyeron significativamente la pérdida de peso de las fresas comparadas con el recubrimiento monocapa. También, varias frutas cítricas han sido cubiertas con carboximetilcelulosa/quitosano (1.5 y 1%, respectivamente), observándose un incremento de la firmeza y mejora del brillo de la fruta (Arnon *et al.*, 2014). Además, Kamper y Fennema (1984) reportaron que películas a base de hidroxipropilmetilcelulosa tuvieron una reducción de la permeabilidad al vapor de agua tras la incorporación de ceras, y que esto fue dependiente de la saturación de las mismas.

Por otra parte, Poverenov *et al.*, (2013), desarrollaron un recubrimiento bicapa a base de alginato (1.5 % p/v) y quitosano (1.5 % p/v) para mantener la calidad poscosecha de melón fresco cortado, comparado con recubrimientos monocapa y un testigo no recubierto. Estos autores observaron que los recubrimientos bicapa mostraron las propiedades benéficas de ambos ingredientes debido a la buena adhesión de la capa de alginato a la matriz del melón y la actividad antimicrobiana del recubrimiento de quitosano. Esto se vió reflejado en la reducción de los conteos de bacterias (por aproximadamente 1.5 log UFC), hongos y levaduras (1.65 log UFC), así como en disminución de la degradación de textura, observándose una apreciable firmeza después de 14 días de almacenamiento.

Lo anterior hace evidente el potencial que poseen los recubrimientos bicapa para mantener la calidad poscosecha de productos hortofrutícolas,

especialmente aquellos elaborados a base polisacáridos y lípidos. Además de las propiedades de barrera que presentan estos recubrimientos, estos también pueden poseer un efecto antimicrobiano cuando se le adicionan compuestos con esta actividad, tal es el caso de los aceites esenciales.

Entre algunos de los estudios que muestran la eficacia de la aplicación de aceites esenciales en recubrimientos comestibles se encuentra lo reportado por Melgarejo-Flores *et al.*, (2013) quienes aplicaron aceite esencial de hoja de canela (36.1 g/L) en recubrimientos de pectina (30 g/L) y observaron una completa inhibición del deterioro fúngico causado por *B. cinerea*. Por otra parte, Rodríguez-García (2013) aplicó un recubrimiento de pectina (30 g/L) adicionado con AEO (36.1 g/L) sobre tomate fresco y pudo observar una completa reducción del deterioro fúngico causado por *A. alternata*. En base a lo mencionado anteriormente, la aplicación de aceites esenciales en recubrimientos comestibles puede ser una opción para proveer efecto antimicrobiano a éstos.

Aceite Esencial de Orégano: Composición Química y Uso como Agente Antimicrobiano en Alimentos

Los aceites esenciales son líquidos aceitosos aromáticos obtenidos de material vegetal (flores, semillas, hojas, ramas, cortezas, etc.) (Burt 2004). Estos compuestos han sido ampliamente usados debido a sus propiedades antimicrobianas. Entre los aceites esenciales más usados en alimentos se encuentran el de clavo, cilantro, laurel, albahaca, romero, hierbabuena, tomillo, orégano, etc. Los compuestos presentes en los aceites esenciales son principalmente terpenos fenólicos y son los responsables de la actividad antimicrobiana del aceite (Sauceda 2011). Éstos pueden ser letales para las células microbianas o simplemente servir como inhibidores de la producción de metabolitos (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2004). Algunos microorganismos tales

como *Fusarium spp.*, *Alternaria spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* y *Rhizopus spp.* han sido inhibidos por aceites esenciales (Soliman y Badeaa 2002; Tepe *et al.*, 2005).

Existen datos publicados acerca de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales aplicados en alimentos, mostrando diferentes valores de eficacia dependiendo el tipo: orégano/ clavo/ semilla de cilantro/ canela> tomillo> menta> romero> mostaza> cilantro/ salvia (Burt 2004). Lo anterior hace evidente que el AEO es uno de los antimicrobianos más potentes.

El orégano comprende varias especies de plantas que son utilizadas con fines culinarios y terapéuticos, siendo las más comunes *Origanum vulgare*, nativo de Europa, y *Lippia graveolens*, originario de México (Arcila-Lozano *et al.*, 2004). La composición química de estas plantas depende de diversos factores como el clima, altitud, época de cosecha, y su estado de crecimiento. Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales (Pascual *et al.*, 2001). Se ha reportado que los principales componentes monoterpénicos de *O. vulgare* y *L. graveolens* son carvacrol, timol, γ -terpineno y p-cimeno, siendo carvacrol y timol a los cuales se les ha atribuido principalmente la actividad antimicrobiana del AEO (Prudent *et al.*, 1995; Charai *et al.*, 1996; Sivropoulou *et al.*, 1996; Sultanbawa *et al.*, 2009).

La estructura química de los componentes individuales del aceite esencial afecta su preciso modo de acción y actividad antimicrobiana (Dorman y Deans 2000). Ésta está relacionada con su estructura molecular: una parte no polar que facilita su paso a través de la membrana de la bacteria y un grupo hidroxilo combinado con un sistema de electrones deslocalizados confiriéndoles un carácter ácido (Figura 3) (Gutiérrez-Larraínzar *et al.*, 2012). El modo de acción de carvacrol y timol se ha relacionado con su capacidad de hacer permeable la membrana celular. Estos tienen la habilidad para desintegrar la membrana de bacterias Gram negativas, liberando lipopolisacáridos e incrementando la permeabilidad de la membrana citoplasmática al ATP (Figura 4) (Burt 2004).

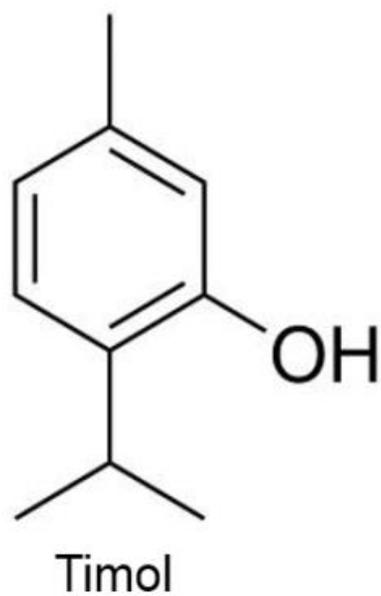
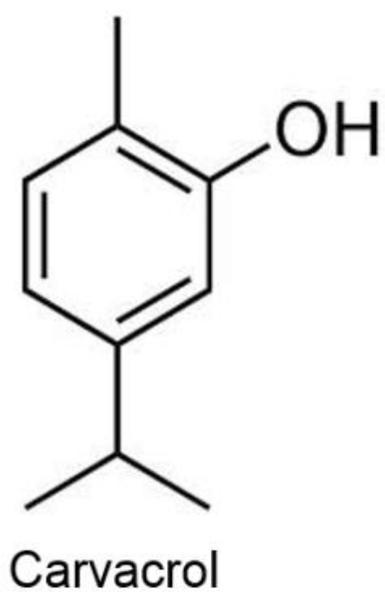


Figura 3. Estructura química de carvacrol y timol, los principales constituyentes del AEO.

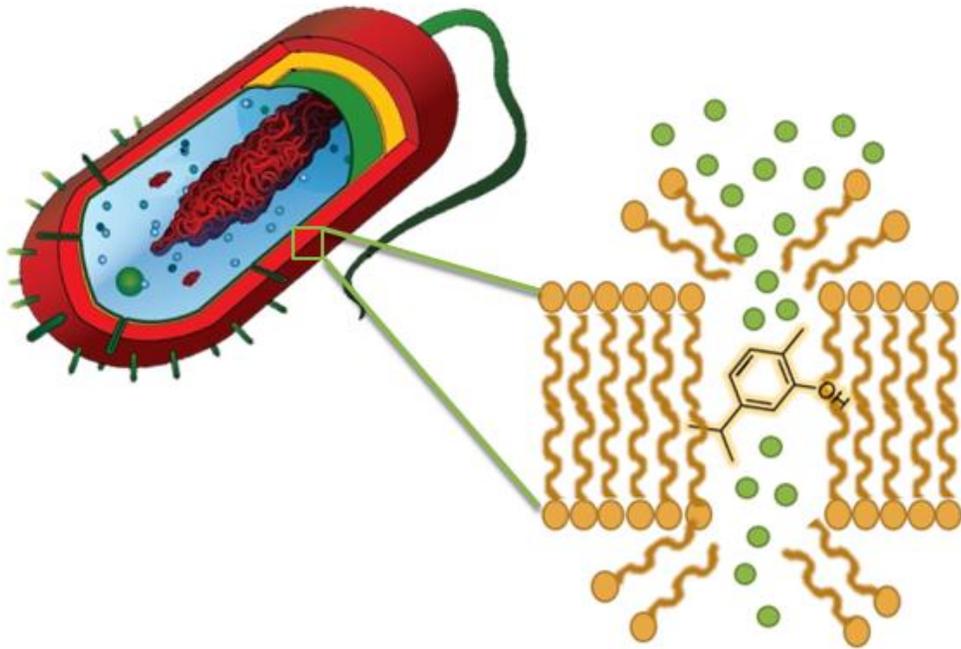


Figura 4. Carvacrol y timol desintegran la membrana celular bacteriana provocando un aumento de permeabilidad y liberación de constituyentes celulares.

Algunos estudios realizados con carvacrol muestran que interactúa con la membrana celular de *B. cereus*, disolviéndose en la bicapa de fosfolípidos y alineándose entre las cadenas de ácidos grasos (Ultee 2000). Esta distorsión de la estructura física hace que se produzca una expansión y desestabilización de la fluidez de la membrana, lo que trae consigo un aumento en la permeabilidad pasiva (Ultee *et al.*, 2002). Asimismo, se ha reportado que carvacrol forma canales a través de la membrana celular, permitiendo que los iones salgan del citoplasma, lo cual se ha observado por la reducción de los niveles de iones potasio intracelulares, mientras que las cantidades extracelulares aumentan proporcionalmente (Ultee 2000).

La actividad antibacteriana *in vitro* del AEO se ha reportado contra diferentes bacterias Gram negativas como *Salmonella Typhimurium*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y Gram positivas como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *L. monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Aligiannis, 2001). En la Cuadro 2, pueden observarse algunas concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) del AEO y sus componentes principales contra algunas de las bacterias antes mencionadas. Además, se ha reportado actividad fungicida contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus niger*, entre otros. La aplicación del AEO y sus principales componentes en vegetales ha sido reportada por varios autores. Frutos de manzana tratados con AEO (1% y 10%), presentaron una reducción en el crecimiento de *B. cinerea* y *P. expansum* (Lopez - Reyes *et al.*, 2010). De manera similar, la combinación de AEO y *Rosmarinus officinalis* L. (80 a 0.003 µL/mL) inhibió la microflora bacteriana asociada con vegetales mínimamente procesados (De Azeredo *et al.*, 2011). Adicionalmente, nectarinas tratadas con timol (1 mL/L) mostraron un menor índice de deterioro causado por *R. stolonifer*, *B. cinerea* y *Penicillium digitatum* (Navarro *et al.*, 2011).

Concordando con lo anterior, carvacrol (0.05, 0.2, 0.5 y 1.0 mL/L) fue probado en uva de mesa inhibiendo el desarrollo de *B. cinerea* (Martínez-Romero *et al.*, 2007). Mientras que carvacrol y timol (10, 25, 50, 100, 250 y 500 µL/L de

Cuadro 2. Concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de orégano (AEO) y sus principales componentes probados *in vitro* contra patógenos alimentarios.

	Bacteria	CMI (µL/mL)	Referencias
AEO	<i>E. coli</i>	0.5-1.2	Burt y Reinders (2003)
	<i>S. Typhimurium</i>	0.3	Valles <i>et al.</i> , (2014)
	<i>S. aureus</i>	0.5-1.2	Valles <i>et al.</i> , (2014)
Carvacrol	<i>E. coli</i>	0.225-5	Kim <i>et al.</i> , (1995)
	<i>S. Typhimurium</i>	0.225-0.25	Kim <i>et al.</i> , (1995)
	<i>S. aureus</i>	0.175-0.450	Lambert y Pearson (2000)
	<i>L. monocytogenes</i>	0.375-5	Pol y Smid (1999)
Timol	<i>E. coli</i>	0.225-0.45	Cosentino <i>et al.</i> , (1999)
	<i>S. Typhimurium</i>	0.056	Cosentino <i>et al.</i> , (1999)
	<i>S. aureus</i>	0.140-0.225	Cosentino <i>et al.</i> , (1999)

carvacrol, timol o la mezcla 1:1 de carvacrol + timol) aplicados en limón, mostraron un menor deterioro fúngico inducido por *P. digitatum* y *Penicillium italicum* (Pérez-Alfonso *et al.*, 2012). Por lo tanto, el AEO o sus principales componentes pueden ser utilizados como aditivo antimicrobiano para diferentes frutos o vegetales. La incorporación de aceites esenciales y sus compuestos bioactivos en productos alimenticios proporciona muchas ventajas en la conservación de alimentos. Sin embargo, estos pueden tener ciertas desventajas cuando son aplicados directamente en alimentos, como la pérdida de sabores y una pérdida temprana de su funcionalidad debido a su volatilidad (Ayala-Zavala *et al.*, 2008). En este sentido, su incorporación en recubrimientos comestibles bicapa puede resolver estas desventajas y proporcionarle ciertas características funcionales y bioactivas. Esto mediante la reducción de su difusión al medio ambiente, neutralización por contacto directo con el alimento y manteniendo las concentraciones efectivas de sus compuestos bioactivos cuando sea necesario (Figura 5) (Quirós-Sauceda *et al.*, 2014).

A pesar de que los estudios acerca de la aplicación de compuestos antimicrobianos en recubrimientos de múltiples capas son escasos, algunos autores reportan su efectividad. Tal es el caso de Brasil *et al.*, (2012) quienes probaron el efecto de la incorporación de *trans*-cinamaldehído encapsulado en β -ciclodextrina (2 g/100 g) en un recubrimiento de quitosano-pectina (2 g/100 g) en la mejora de la calidad de papaya fresca cortada almacenada a 4 °C durante 15 días. Estos autores observaron que el recubrimiento bicapa mantuvo la firmeza, color, contenido de β -caroteno, y mostró menor pérdida de jugo con respecto al testigo no recubierto. De manera similar, Martiñon *et al.*, (2014) reportaron que el mismo sistema incorporado con 3 g/100 g de *trans*-cinamaldehído encapsulado en β -ciclodextrina redujo 4.4 log UFC/g el conteo de microorganismos aerobios de melón fresco cortado almacenado a 4 °C durante 15 días.

En base a lo anterior, se puede observar que los recubrimientos comestibles bicapa a base de la combinación polisacárido-lípido tienen potencial para

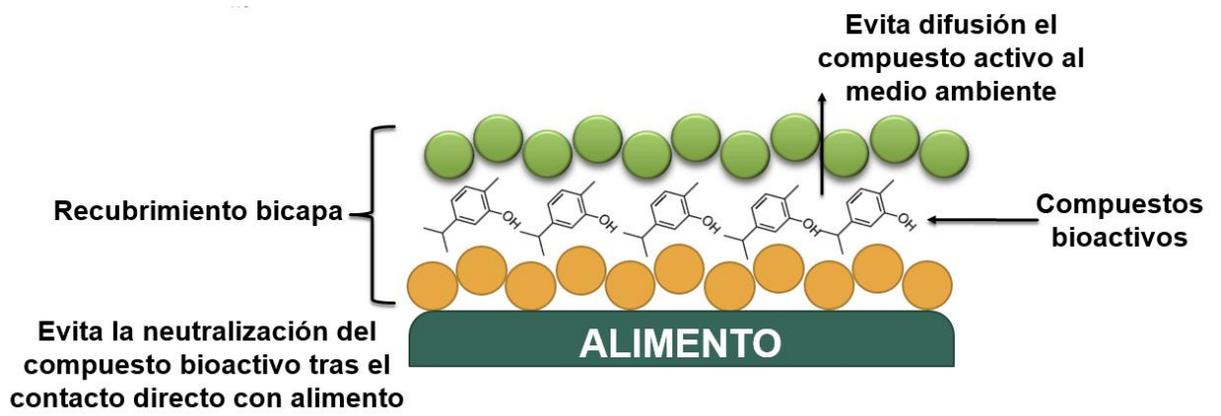


Figura 5. Los recubrimientos comestibles bicapa proveen una matriz protectora para compuestos bioactivos evitando su difusión al medio ambiente y neutralización por contacto con el alimento.

mantener los parámetros poscosecha de algunos frutos y vegetales frescos tales como el pepino. Esto mediante la reducción de su deshidratación y deterioro microbiano tras la incorporación de agentes antimicrobianos dentro del RC tales como el AEO.

HIPÓTESIS

La combinación quitosano-cera-AEO ofrece una mejor barrera a la deshidratación y crecimiento microbiano de frutos de pepino que los componentes individuales.

OBJETIVOS

Objetivo General

Reducir el deterioro por deshidratación y crecimiento microbiano de pepino fresco, mediante la aplicación de recubrimientos bicapa a base de cera de carnauba y quitosano adicionados con aceite esencial de orégano.

Objetivos Específicos

- Formular y caracterizar las propiedades de barrera y capacidad antimicrobiana de las películas comestibles de quitosano-cera-AEO.
- Evaluar el efecto de la aplicación de los recubrimientos comestibles sobre la deshidratación y deterioro microbiano de pepino.

MATERIALES Y MÉTODOS

Formulación y Caracterización de las Propiedades de Barrera y Capacidad Antimicrobiana de los Recubrimientos

Materiales

Se utilizó quitosano de mediano peso molecular con un 75-85% de desacetilación, cera de carnauba No.1 amarilla, glicerol $\geq 95\%$, cloruro de calcio anhidro $\geq 93\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EUA), ácido acético (J. T. Baker), agua destilada, aceite de coco (oilsbynature Inc.) y AEO (ORE procesadora de orégano silvestre, Chihuahua, México).

Elaboración de las Películas

Se elaboraron películas a base de quitosano (0.8%) y cera de carnauba (10%), así como de las mismas adicionadas con AEO (8 mg/mL) mediante el método de laminación, tales concentraciones se definieron en base a la bibliografía y estudios preliminares. Se hicieron películas de quitosano, cera, quitosano-cera, quitosano-AEO, cera-AEO y quitosano-cera-AEO. Para las películas de quitosano, se pesaron 0.8 g de quitosano y 0.2 g de glicerol y se disolvieron en 100 mL de una solución de ácido acético al 1%. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h y después de la completa disolución del quitosano, la solución se filtró, esterilizó a 121 °C durante 15 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Para las películas adicionadas con AEO, se le adicionaron 0.2 g de Tween 20 y 8 mg/mL de AEO a la solución de quitosano y se mezcló a 13500 rpm por 5 min en un homogeneizador POLYTRON PT 1200C. Posteriormente, 20 mL de solución de quitosano se vaciaron en placas Petri con un diámetro estándar de 90 mm, se secaron a temperatura ambiente por 24 h y se almacenaron en un desecador para posteriores análisis de caracterización. Para la solución de cera de carnauba, 10 g de cera de carnauba (Sigma Aldrich) se fundieron en 90 mL de aceite de coco y se calentó a 70 °C con agitación constante. Para las películas de cera con AEO, se adicionaron 8 mg/mL de AEO y se mezcló por 3 min a 13500 rpm en un homogeneizador POLYTRON PT 1200C. Las películas bicapa con y sin AEO se elaboraron aplicando la cera con una brocha sobre las películas de quitosano previamente formadas.

Grosor y Transmisión al Vapor de Agua (TVA)

El grosor de las películas se midió con un micrómetro digital (E.J. Cady and Co., Wheeling, IL, EUA). Se llevaron a cabo tres mediciones de grosor en diferentes puntos de 5 películas por tratamiento (quitosano, quitosano-cera, quitosano-AEO y quitosano-cera-AEO) y los valores medios se expresaron en milímetros. La TVA se determinó gravimétricamente en base a los métodos recomendados por la ASTM (ASTM, 1980) para las películas de quitosano, quitosano-cera, quitosano-AEO y quitosano-cera-AEO. Cada película se selló en la parte superior de una celda de permeación (volumen de 118,64 cm³) conteniendo 30 g de perlas de cloruro de calcio para asegurar una humedad relativa del 0%. Posteriormente, las celdas se colocaron en un desecador (volumen de 1500 cm³) conteniendo 70 mL de solución sobresaturada de nitrato de magnesio para asegurar una humedad relativa del 90% y se dejaron a temperatura ambiente por 8 h. El agua transferida a través de la película y adsorbida por el desecante se determinó a partir del aumento de peso de la celda de permeación.

Las muestras se pesaron cada hora durante 8 horas y la pendiente de la ganancia de peso en función del tiempo se obtuvo mediante regresión lineal. La TVA de las películas se determinó mediante la siguiente fórmula: $TVA = m/a$, donde m es la pendiente de la ganancia de peso vs tiempo y a el área de la película. El análisis se realizó por triplicado.

Capacidad Antimicrobiana *in vitro* de Películas de Quitosano-cera-AEO

Con la finalidad de conocer el efecto antimicrobiano de las películas, se evaluó el efecto inhibitorio contra la flora nativa bacteriana y fúngica del pepino, así como también contra *Salmonella enterica* subespecie *enterica* serotipo Typhimurium (ATCC® 14028™), *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC® 43890™) y *Alternaria alternata* (ATCC® 6663). Esto se llevó a cabo en base al método de macrodilución descrito por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (2001), con algunas modificaciones. Para el ensayo, 2 mg/mL de las películas (cera, quitosano, quitosano-cera, cera-AEO, quitosano-AEO y quitosano-cera-AEO) se introdujeron en tubos conteniendo 10 mL de caldo Mueller Hinton para el caso de bacterias y caldo papa dextrosa para hongos. Después de 15 min, los tubos fueron inoculados con los diferentes microorganismos a una concentración de 1×10^6 UFC/mL.

Posteriormente, 1 mL de caldo de cada tubo fueron subcultivados en placas Petri conteniendo agar cuenta estándar y agar papa dextrosa acidificado e incubadas a 37 ± 2 °C por 24 h y 25 ± 2 °C por 5 días para bacterias y hongos, respectivamente. Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a subcultivar nuevamente en placas Petri e incubar a las mismas condiciones. Finalmente, se contaron las colonias bacterianas y fúngicas a las 0 y 24 h después de la inoculación. Los resultados fueron expresados como log UFC/mL y comparadas con una muestra testigo sin película.

Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR)

Con el propósito de conocer las posibles interacciones fisicoquímicas entre los componentes de las películas, se llevó a cabo su análisis por medio de FT-IR con la finalidad de observar posibles interacciones entre la cera, quitosano y AEO. Para esto, un trozo de cada película se midió en un espectrofotómetro FT-IR Nicolet Protegé 460 (Instrument Corp. Madison, WI, EUA) con las siguientes condiciones de escaneo: rango de longitud de onda de 4000-400 1/cm con una resolución de 4 1/cm y 64 escaneos a una velocidad de 0.63. Para el análisis de la cera y AEO, se colocaron muestras líquidas sobre pastillas de bromuro de potasio previamente formadas.

Evaluación del Efecto de la Aplicación de los Recubrimientos Comestibles sobre la Deshidratación y Deterioro Microbiano de Pepino

Selección de la Materia Prima

Los frutos de pepino fueron obtenidos del campo La Cuesta ubicado en el Km 23 de la carretera Hermosillo-Nogales en el municipio de Hermosillo, Sonora, México. Se seleccionaron pepinos en estado inmaduro, homogéneos en tamaño y peso, y libres de podredumbres. Se lavaron con agua clorada (200 ppm) durante 2 minutos y se secaron a temperatura ambiente.

Recubrimiento de Pepinos con Quitosano-cera-AEO

Se utilizaron 210 pepinos, de los cuales 180 fueron recubiertos con los diferentes tratamientos: cera, quitosano, quitosano-cera, cera-AEO, quitosano-AEO y quitosano-cera-AEO, los cuales fueron elaborados como se describió

anteriormente. Se utilizaron 30 pepinos sin recubrir como testigo. La aplicación de los diferentes tratamientos se hizo de manera manual con la ayuda de una brocha agregando alrededor de 0.5 mL de cada tratamiento por pepino. Para los pepinos recubiertos con quitosano-cera y quitosano-cera-AEO, primero se aplicó el recubrimiento de quitosano y se secó a temperatura ambiente con flujo de aire constante. Una vez seco, se aplicó el recubrimiento de cera (con y sin AEO). Posteriormente, los pepinos se almacenaron por tratamiento en contenedores de polietileno y se almacenaron a 10 °C y 90% de H. R. durante 15 días. El efecto de los diferentes recubrimientos sobre la pérdida de peso de pepino y el deterioro microbiano se evaluó a los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15 de almacenamiento.

Pérdida de Peso

Se realizó la medición de la pérdida de peso de tres réplicas con 3 pepinos por tratamiento, tomando como base el peso inicial del pepino menos el peso del mismo al tiempo de muestreo. El resultado se expresó como pérdida de peso (%).

Análisis Microbiológico

La cuenta microbiológica se realizó a los días 0, 3, 6, 9, 12 y 15, durante el almacenamiento a 10 °C. Se pesaron 10 g de muestra y se diluyó en 90 mL de agua peptonada, y se homogeneizó por un minuto. Posteriormente, se hicieron diluciones decimales. Se realizaron conteos microbiológicos de mesófilos aerobios (NOM-092-SSA1-1994), hongos y levaduras (NOM-111-SSA1-1994), mediante el método de vertido en placa usando 1 mL de la muestra homogeneizada de cada dilución. Se incubaron las placas a 35 ± 2 °C por 24 h y a 25 ± 2 °C por 5 días para el caso de mesófilos aerobios y hongos y levaduras, respectivamente.

Análisis Estadístico

El diseño experimental para la formulación y caracterización de las películas fue un diseño completo al azar, donde los factores fueron las películas (quitosano, cera, quitosano-cera, quitosano-AEO, cera-AEO y quitosano-cera-AEO) y las variables de respuesta la TVA, grosor y capacidad antimicrobiana *in vitro*. Para la evaluación del efecto de los recubrimientos sobre la deshidratación y deterioro microbiano del pepino, se utilizó un diseño completo al azar con un arreglo factorial, donde los factores fueron los recubrimientos (quitosano, cera, quitosano-cera, quitosano-AEO, cera-AEO y quitosano-cera-AEO) y el tiempo de almacenamiento a 10 °C (0, 3, 6, 9, 12 y 15 días). Las variables de respuesta fueron la pérdida de peso, mesófilos aerobios, hongos y levaduras. Se realizó un ANOVA y se compararon las medias por Tukey Kramer. Todo esto a una $p \leq 0.05$ utilizando el software estadístico NCSS 2007.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formulación y Caracterización de las Propiedades de Barrera y Capacidad Antimicrobiana de los Recubrimientos

Grosor y TVA de Películas de Quitosano-cera-AEO

En el Cuadro 3 se muestran los resultados obtenidos del análisis de grosor y TVA de las películas comestibles. Se puede observar que el grosor fue similar ($p \geq 0.05$) para las películas de quitosano, quitosano-cera y quitosano-AEO, mostrando valores entre 0.022-0.027 mm; sin embargo, el grosor de la película de quitosano-cera-AEO fue diferente ($p \leq 0.05$) a todos los tratamientos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Velickova *et al.*, (2013) y Poverenov *et al.*, (2014) quienes reportan un grosor de 0.052 y 0.016 mm para películas de quitosano, respectivamente. En la TVA se puede observar que las películas de quitosano son las que mostraron una mayor TVA (0.257 g/m²/h), seguidas de las películas de quitosano-AEO (0.241 g/m²/h), no observándose diferencias significativas entre ellas. Por otra parte, las películas de quitosano-cera, y quitosano-cera-AEO mostraron valores de TVA de 0.167 y 0.141 g/m²/h, respectivamente, siendo estas diferentes ($p \leq 0.05$) a las películas de quitosano y quitosano-AEO.

Las películas de quitosano de manera similar a otras películas de polisacáridos exhiben una propiedad de barrera al agua relativamente baja debido a su naturaleza altamente hidrofílica (Mohamed *et al.*, 2013). Las películas de quitosano adicionadas con AEO si bien presentaron una menor TVA en

Cuadro 3. Grosor y TVA de películas comestibles de quitosano-cera-AEO.

Película	Grosor (mm) *	TVA (g/m²/h) **
Quitosano	0.025 ± 0.007 ^a	0.257 ± 0.013 ^a
Quitosano-AEO	0.022 ± 0.002 ^a	0.241 ± 0.019 ^a
Quitosano-cera	0.027 ± 0.005 ^a	0.167 ± 0.012 ^b
Quitosano-cera-AEO	0.037 ± 0.004 ^b	0.141 ± 0.008 ^b

Diferentes literales en la misma columna indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$). * n= 15; ** n= 3.

comparación a las películas de quitosano, esta diferencia no fue significativa ($p \geq 0.05$). Esto puede ser atribuido a una disminución de las fuerzas existentes entre las cadenas de quitosano tras la adición del AEO, ya que se ha reportado que al adicionar compuestos dentro de una matriz polimérica como el quitosano, la estructura compacta del polímero, especialmente en partes cristalinas, se ve alterada lo cual aumenta el volumen libre entre las cadenas poliméricas, favoreciendo la transferencia de moléculas de agua (Park *et al.*, 2004). Asimismo, se observa que la incorporación de cera sobre la películas de quitosano disminuyó ($p \leq 0.05$) la TVA, observándose valores de 0.167 y 0.141 g/m²/h para las películas de quitosano-cera y quitosano-cera-AEO, respectivamente.

Numerosos estudios han mostrado la disminución de la permeabilidad al vapor de agua de películas de polisacáridos tras la incorporación de compuestos lipídicos. Velickova *et al.*, (2013) observaron una mejora en las propiedades de barrera al vapor de agua de películas de quitosano tras la incorporación de un recubrimiento de cera de abeja. También, Debeaufort *et al.*, (2000) reportaron que películas de metilcelulosa mejoraron las tasas de TVA después de haber sido recubiertas con una mezcla de aceite y cera de parafina. Películas de arabinosilanos presentaron mejores propiedades de barrera cuando algunos lípidos como ácidos grasos, triglicéridos o aceites hidrogenados fueron adicionados como bicapas (Phan The *et al.*, 2002).

Efecto Antimicrobiano *in vitro* de Películas de Quitosano-cera-AEO

En la Figura 6 se muestra el efecto antimicrobiano de películas comestibles contra la flora bacteriana (A) y fúngica (B) nativa de pepino después de 24 h de incubación a 37 °C. Se puede observar, que todos los tratamientos tuvieron la misma carga bacteriana inicial, la cual fue de alrededor de 6.76 log UFC/mL. Después de 24 h de incubación, todos los tratamientos excepto la película de

quitosano-AEO presentaron un crecimiento superior a los 8 log UFC/mL, sin observarse diferencias entre ellos ($p \geq 0.05$). La película de quitosano-AEO inhibió el crecimiento de la flora bacteriana nativa de pepino, reflejado en la reducción de 3.23 log UFC/mL después de 24 h a 37 °C comparado con el testigo. Por otra parte, se puede observar que las películas de quitosano-AEO fueron las que presentaron la mayor reducción de la carga fúngica en comparación con el testigo (1.12 log UFC/mL). Por otra parte, a los 5 días de incubación a 25 °C las películas de quitosano, quitosano-cera y quitosano-cera-AEO no presentaron diferencias ($p \geq 0.05$) en los conteos de hongos y levaduras, presentando una carga microbiana en un rango de 5.77-5.93 log UFC/mL. Asimismo, se puede observar que las películas de cera, con o sin la incorporación de AEO fueron iguales ($p \geq 0.05$) a estos tratamientos.

En la Figura 7 se muestra el efecto antibacteriano de las películas comestibles contra *S. Typhimurium* (A) y *E. coli* (B). Se observó que la incorporación de AEO en las películas de quitosano mejoró su efecto antibacteriano, observándose una reducción ($p \leq 0.05$) del crecimiento de 3.12 log UFC/mL con respecto al testigo después de 24 h de incubación a 37 °C. Por otro lado, las películas de quitosano y cera-AEO redujeron significativamente los conteos bacterianos 1.25 y 0.79 log UFC/mL, respectivamente comparado con el testigo. Sin embargo, las películas de cera, quitosano-cera y quitosano-cera-AEO no inhibieron el crecimiento de *S. Typhimurium*, mostrando conteos de 9.02, 9.05, 9.04 y 8.66 log UFC/mL, los cuales fueron iguales ($p \geq 0.05$) al testigo.

Las películas de quitosano, quitosano-cera y quitosano-AEO provocaron una reducción del crecimiento de *E. coli* de 1.58, 0.43 y 3.45 log UFC/mL, con respecto al testigo. No se observó inhibición del crecimiento de *E. coli* después de 24 h de incubación tras su exposición a las películas de cera, cera-AEO y quitosano-cera-AEO.

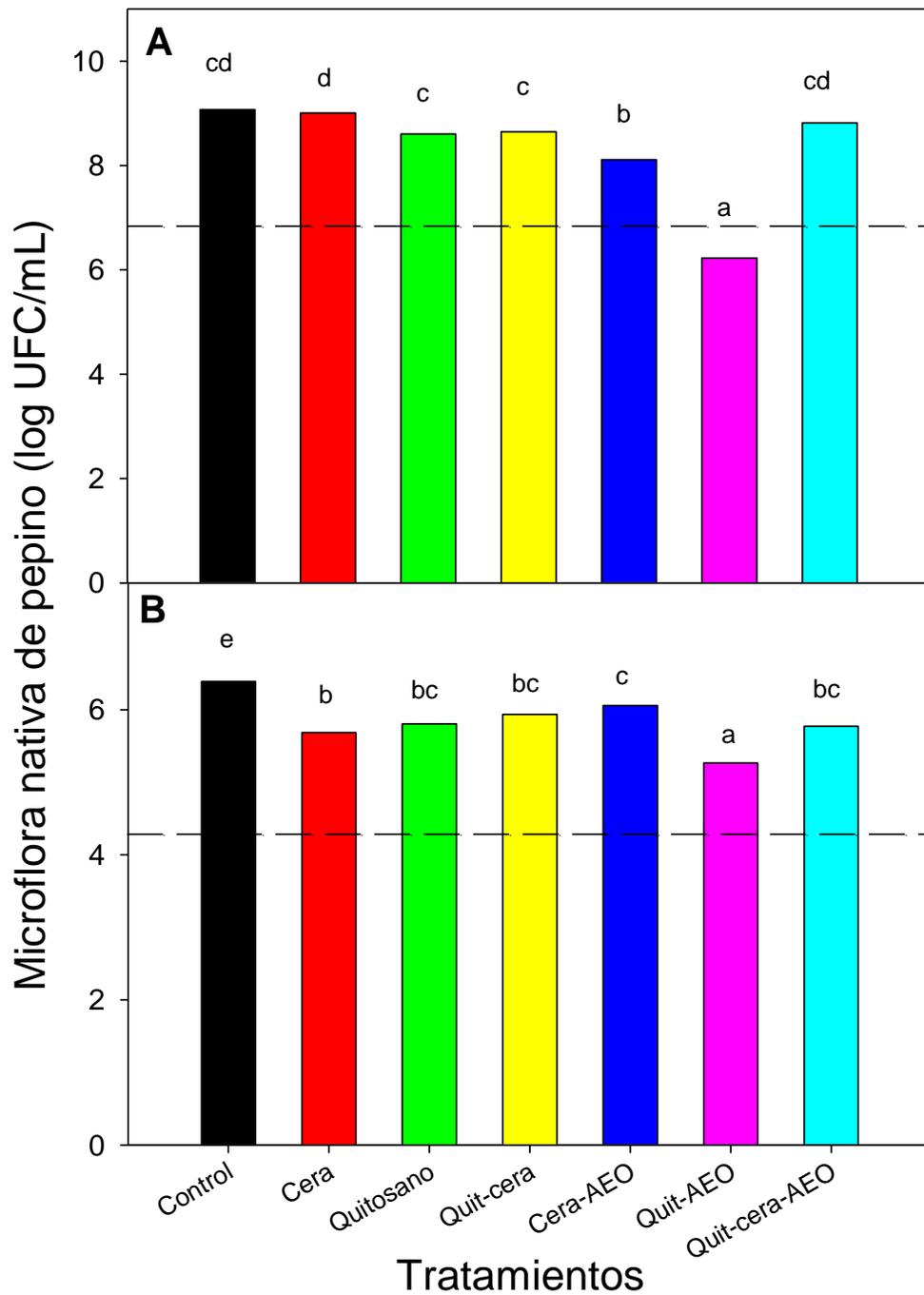


Figura 6. Efecto antimicrobiano de películas comestibles contra la microflora bacteriana (A) y fúngica (B) nativa de pepino. Líneas punteadas indican carga microbiana inicial. Diferentes literales indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

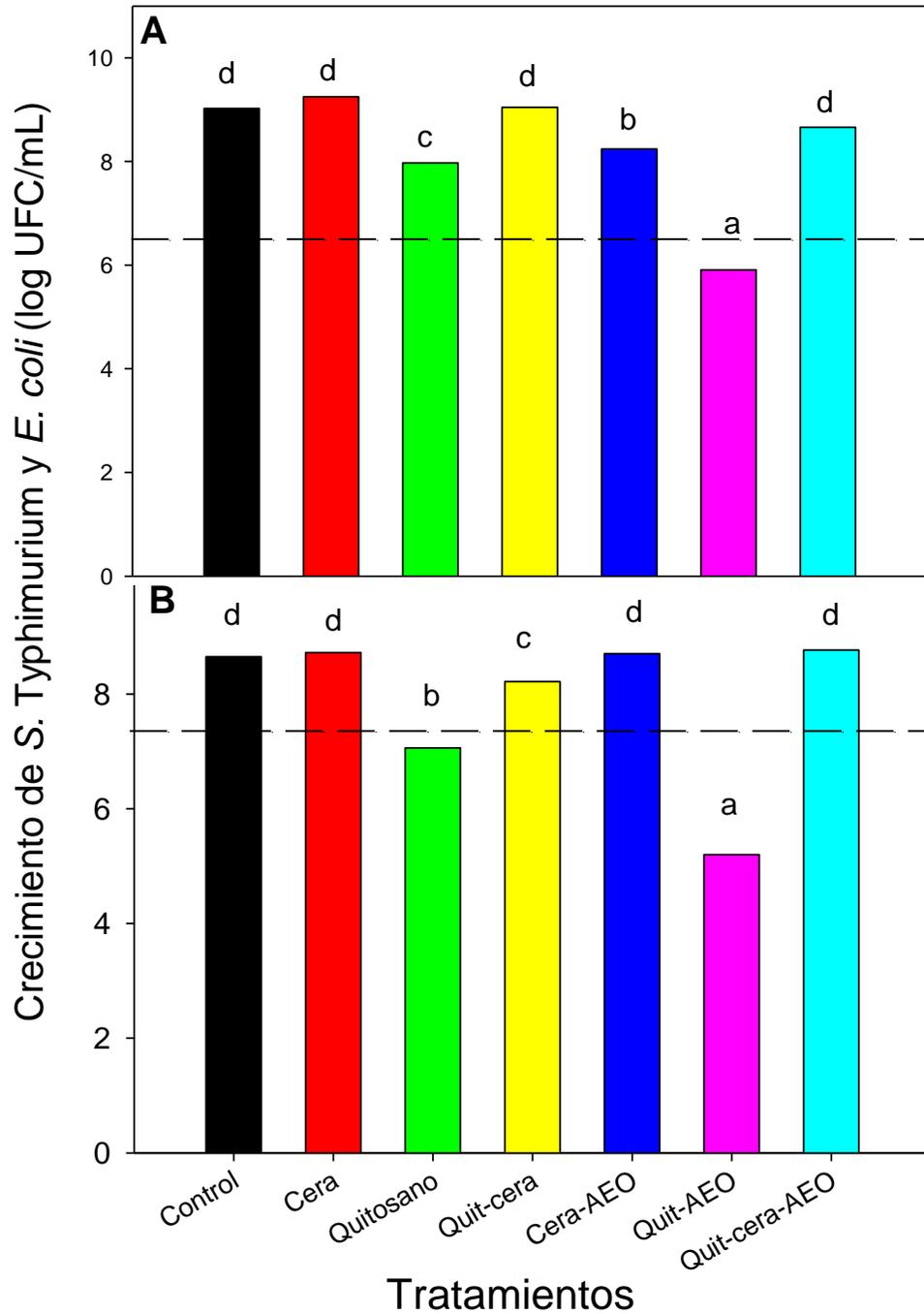


Figura 7. Efecto antibacteriano de películas comestibles contra *S. Typhimurium* (A) y *E. coli* O157:H7 (B). Líneas punteadas indican carga bacteriana inicial. Diferentes literales indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

En la Figura 8 se puede observar que las películas de quitosano-AEO presentaron un efecto fungicida, inhibiendo completamente el crecimiento de *A. alternata*. Se puede observar que la película de quitosano-cera-AEO redujo los conteos de *A. alternata* 1.67 log UFC/mL con respecto al testigo después de 5 días de incubación. Por otra parte, las películas de cera no mostraron tener un efecto en la inhibición del crecimiento de *A. alternata*, observándose un crecimiento de 7.23 log UFC/mL, el cual fue significativamente superior a los demás tratamientos y el testigo. No se observaron diferencias entre las películas de quitosano, cera-AEO y el testigo, las cuales presentaron una carga fúngica en el rango de 4.86-5.04 log UFC/mL a los 5 días de incubación a 25 °C.

El potencial antimicrobiano observado de las películas de quitosano-AEO contra los microorganismos probados es atribuido a la capacidad que posee cada uno de los componentes para inhibir el crecimiento microbiano. Se ha planteado la hipótesis que el efecto antibacteriano del quitosano es mediante la interacción de los grupos amino presentes en su estructura con fosfolípidos de la membrana celular bacteriana, lo cual conlleva a la desestabilización de la misma y pérdida de constituyentes celulares. Por otro lado, la actividad antimicrobiana del AEO, es atribuida principalmente a los monoterpenos aromáticos, carvacrol y timol (Kordali et al., 2008). Como se mencionó anteriormente, su mecanismo no es bien conocido; sin embargo, diferentes estudios sugieren que carvacrol y timol pueden desintegrar la membrana externa de las bacterias. Esto provoca la liberación de los componentes lipopolisacáridos, y por lo tanto incrementa la permeabilidad en la membrana citoplasmática y consecuentemente cambia la permeabilidad pasiva de la célula (Guarda et al., 2011).

Resultados similares fueron reportados por Zivanovic et al., (2005) quienes evaluaron el efecto antimicrobiano de películas de quitosano incorporadas con AEO contra varias cepas como *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *B. cereus* y *S. aureus*. Estos autores reportaron que las películas de quitosano

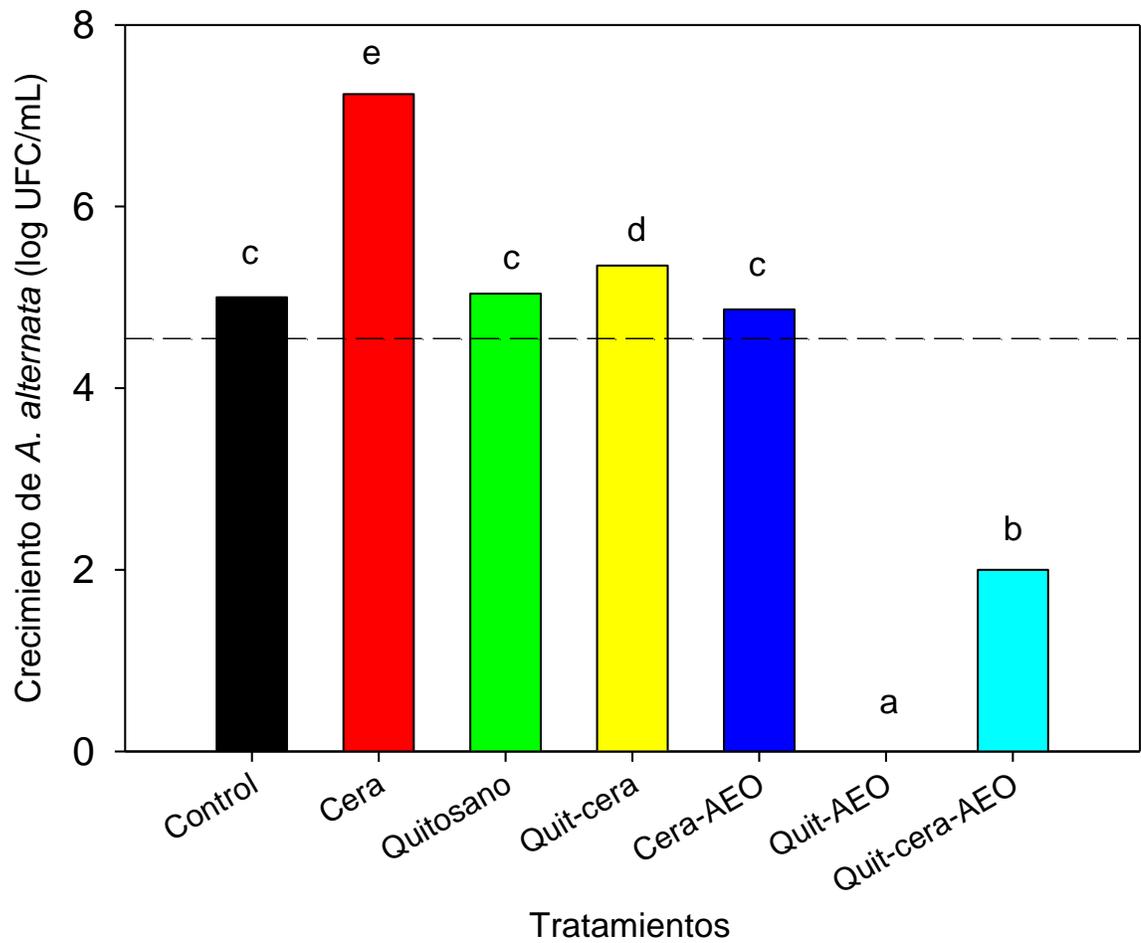


Figura 8. Efecto antifúngico de películas comestibles contra *A. alternata*. Línea punteada indica carga fúngica inicial. Diferentes literales indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

redujeron 2 log el crecimiento de *L. monocytogenes*, mientras que las mismas enriquecidas con 1 y 2% de AEO disminuyeron los conteos de *L. monocytogenes* (3.6 y 4 log) y *E. coli* (3 y 3 log). El potencial antimicrobiano de películas de quitosano adicionadas con otros aceites esenciales ya ha sido reportado en la literatura. Ruiz-Navajas *et al.*, (2013) incorporaron aceite esencial de *Thymus piperella* en películas de quitosano y observaron una reducción significativa del crecimiento de *Serratia marcescens* y *Listeria innocua*. Asimismo, Altioik *et al.*, (2010) evaluaron el efecto antibacteriano de películas de quitosano adicionadas con aceite esencial de tomillo (1.2%) y observaron una inhibición del crecimiento de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *S. aureus*. Por otro lado, la incorporación del AEO y sus compuestos monoterpénicos principales en películas comestibles ha sido reportado en la literatura por algunos autores como Du *et al.*, (2008) quienes reportaron que películas de puré de manzana incorporadas con carvacrol (1%) inhibieron el crecimiento de *E. coli* O157:H7.

Estudios *in vitro* han mostrado que la combinación de quitosano (10 mg/mL) y aceite esencial de tomillo (0.3 mg/mL) tiene un efecto fungicida sobre *R. stolonifer*, inhibiendo el crecimiento micelial, la germinación de esporas y el proceso de esporulación (Alvarado, 2009). El quitosano también ha mostrado actividad fungicida contra varios hongos como *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechstera sorokiana*, *Micronectriella nivalis*, *Piricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* y *Trichophyton equinum*. Como se mencionó anteriormente, la estructura policatiónica de este compuesto es un factor clave de sus propiedades antifúngicas (Martínez-Camacho *et al.*, 2010). También, se ha planteado la hipótesis que el quitosano puede tener un posible efecto en la síntesis de algunas enzimas. Estudios recientes han mostrado que el quitosano no sólo es efectivo en detener el crecimiento del patógeno, sino que también induce cambios morfológicos, alteraciones estructurales y desorganización molecular de las células fúngicas (Rabea *et al.*, 2003; Martínez-Camacho *et al.*, 2010).

Espectroscopia Infrarroja Transformada de Fourier (FT-IR)

En la Figura 9 se muestran los espectros de infrarrojo de las películas de quitosano, cera y quitosano-cera en el rango de longitud de onda de 4000-400 $1/\text{cm}$. Puesto que el grado de desacetilación utilizado en este estudio fue de 75-85%, se puede observar a una frecuencia alrededor de 1602 $1/\text{cm}$ el pico del estiramiento C=O (amida I) y los picos de la flexión del grupo N-H (amida II) a los 1554 cm^{-1} para la película de quitosano. Estos picos representan la estructura de la N-acetilglucosamina, que se podría encontrar en quitosano con un menor grado de desacetilación (Balau *et al.*, 2004). Asimismo, a una frecuencia de 3334.3 se observa la banda de absorción correspondiente al estiramiento del grupo hidroxilo O-H. Sin embargo, cuando se adiciona cera a la película de quitosano (quitosano-cera) se puede observar claramente un desfase en la banda de absorción correspondiente al estiramiento del grupo O-H ($\Delta\text{OH}= 50$) hacia frecuencias más altas (efecto hipsocrómico).

Por otra parte, en la Figura 10 y 11 se observan los espectros de infrarrojo del AEO y las películas de quitosano-AEO, cera-AEO y quitosano-cera-AEO. Al adicionar AEO a la película de quitosano, se produce también un desfase en las bandas de absorción del enlace O-H y C=O. Este mismo comportamiento fue observado en la película de quitosano-cera-AEO, donde los máximos de absorción de los enlaces O-H, C=O y N-H se ven desplazados hacia frecuencias más altas ($\Delta\text{OH}= 7.7$ y 44.85 , y $\Delta\text{NH}= 14$). Es importante resaltar que las señales de mayor interés son las correspondientes a los grupos O-H y N-H, ya que cambios en estos grupos están directamente ligados con cambios en las propiedades de barrera y antimicrobianas. La poca disponibilidad del grupo O-H debido a interacciones podría conllevar a una disminución de la absorción de moléculas de agua y por lo tanto, disminuir la permeabilidad.

Asimismo, se sabe que la actividad antimicrobiana del aceite esencial está relacionada con los grupos hidroxilo activos de sus componentes principales, carvacrol y timol, los cuales pueden disminuir su efecto por la interacción con

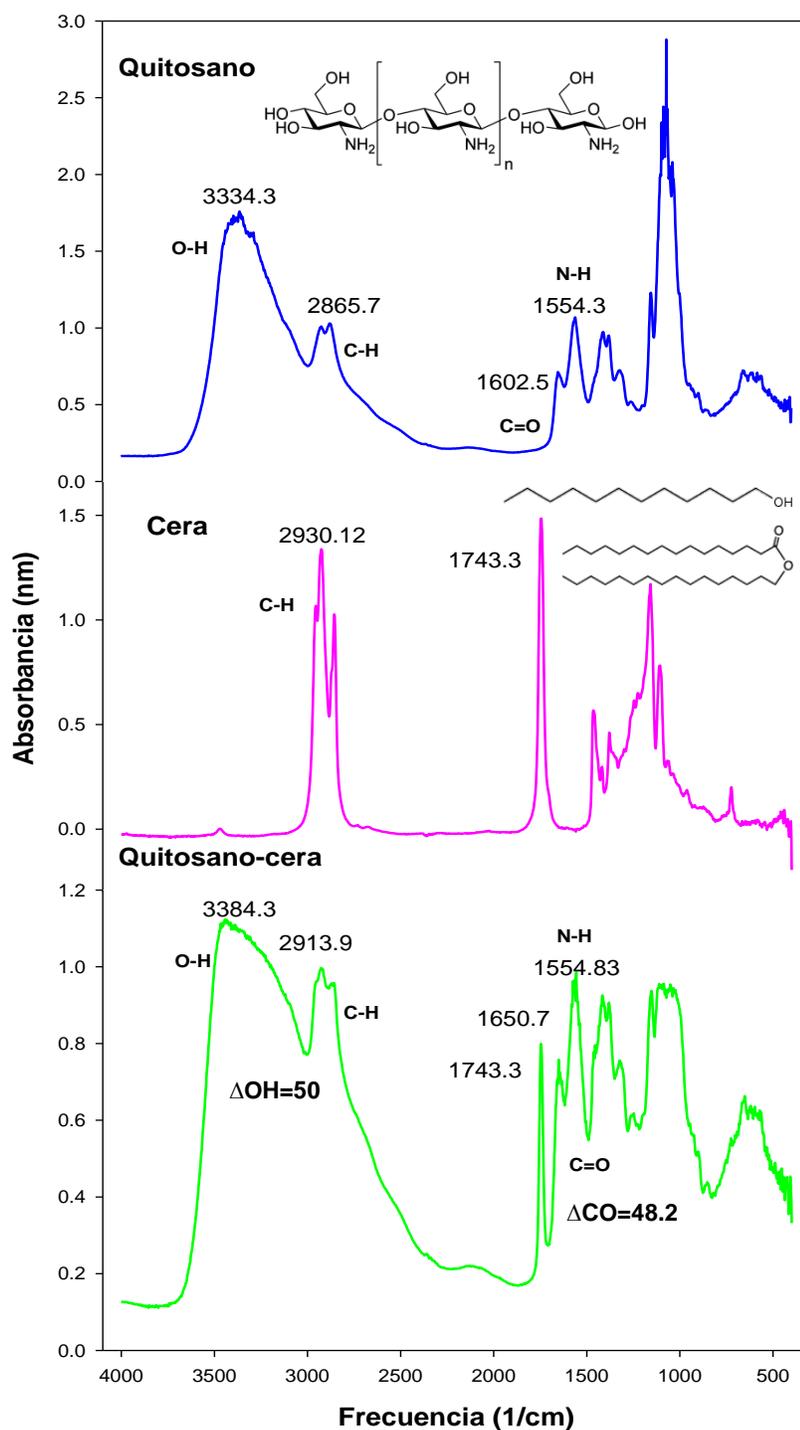


Figura 9. Espectros FT-IR de las películas de quitosano, cera y quitosano-cera, donde se muestran interacciones entre los grupos O-H y C=O del quitosano y componentes lipídicos de la cera.

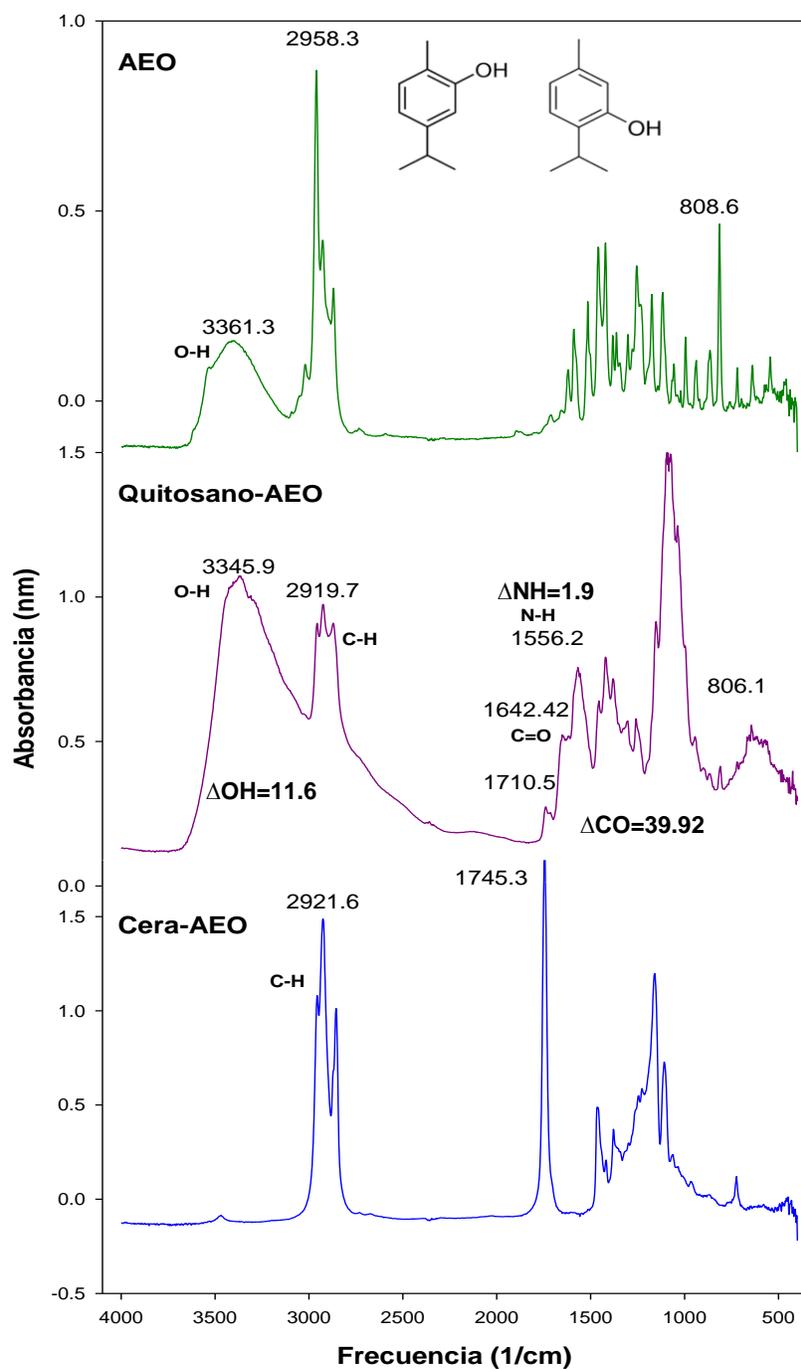


Figura 10. Espectros FT-IR del AEO y las películas de quitosano y cera adicionadas con AEO, donde se muestran interacciones entre los grupos O-H y N-H del quitosano y O-H de los terpenos del AEO.

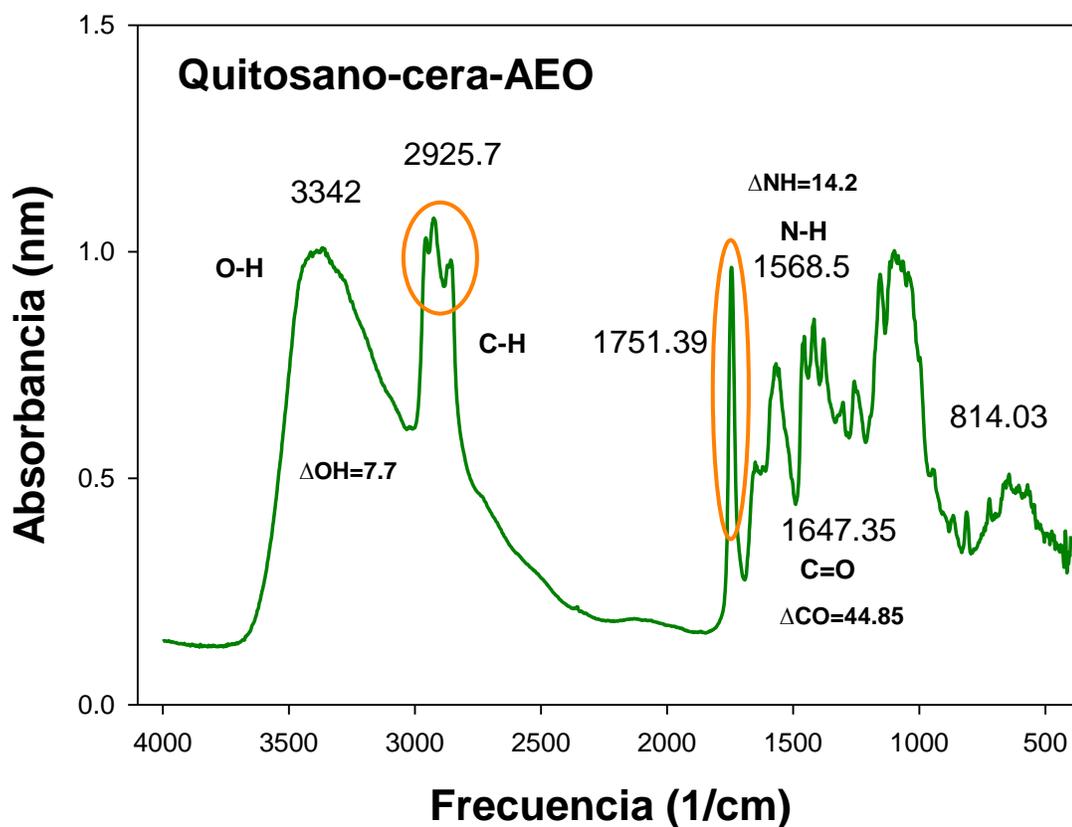


Figura 11. Espectro FT-IR de película de quitosano-cera-AEO donde se muestra la aparición de nuevas bandas de absorción e interacciones entre los grupos N-H, O-H y C=O del quitosano con componentes del AEO y cera.

componentes del sistema. Como se mencionó anteriormente, la actividad antimicrobiana del quitosano está relacionada con su capacidad de interactuar con componentes celulares por medio de sus grupos N-H, por lo tanto, cualquier interacción en este sitio puede conllevar a la disminución de su potencial antimicrobiano. Es bien sabido que cuando existen cambios en los espectros de absorción (cambio en la frecuencia y forma de la señal) estos se pueden correlacionar con posibles interacciones entre sus componentes (Kazarian *et al.*, 1996).

La teoría para explicar la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares por medio del desfase de una banda característica, yace en la Ley de Planck. Primeramente, la aparición de la señal asignada por un enlace dado, en este caso enfoquemos la atención en el enlace O-H, se da por la vibración de los átomos participantes en tal unión al ser expuesto al haz de luz infrarroja, presentando una señal en el espectro a una frecuencia (ν) dada. Considerando lo anterior, la ley de Planck relaciona la energía vibracional del enlace causado por la incidencia del haz infrarrojo mediante la fórmula: $E=h\nu$, donde h es la constante de Planck ($6.62606896 \times 10^{-34}$ J s). Por lo anterior, al darse un desfase en la frecuencia de la señal de los grupos O-H y N-H del quitosano al incorporar AEO, se asume que estos grupos están siendo compartidos mediante puentes de hidrógeno.

Resultados similares fueron reportados por Pranoto *et al.*, (2005) quienes observaron bandas de absorción del grupo O-H a 3400 $1/\text{cm}$. Asimismo, también observaron bandas de absorción de 1550 a 1590 $1/\text{cm}$ correspondientes a los grupos aminos del quitosano. Sin embargo, estos autores reportan que no se observó un desfase o aparición de bandas de absorción tras la incorporación de aceite esencial de ajo. Es importante resaltar que la espectroscopia de infrarrojo también es una técnica útil para la determinación del porcentaje de acetilación del quitosano (Brugnerotto *et al.*, 2001). Por lo tanto, de manera adicional se pudo obtener dicho parámetro utilizando de los espectros de infrarrojo, tomando en cuenta la relación existente

entre las absorbancias netas de las bandas de absorción a 1320 y 1420, obteniéndose un porcentaje de acetilación de 13.97. Este valor hace referencia a un 86.03% de desacetilación, el cual es similar a lo reportado por la casa comercial de la cual se obtuvo el quitosano utilizado en el presente estudio. Es muy importante tomar en cuenta este parámetro debido a que entre mayor sea el grado de desacetilación, mayor será el número de grupos aminos distribuidos en las cadenas del quitosano capaces de ejercer un efecto antimicrobiano.

Evaluación del Efecto de la Aplicación de los Recubrimientos Comestibles sobre la Deshidratación y Deterioro Microbiano de Pepino

Pérdida de Peso

En la Figura 12 se muestran los resultados de pérdida de peso de pepinos recubiertos almacenados a 10 °C durante 15 días. Se puede observar que todos los pepinos recubiertos perdieron peso de manera constante durante el tiempo de almacenamiento. Al día 15 de almacenamiento, los pepinos recubiertos con cera y cera-AEO presentaron la menor pérdida de peso (5.48 y 6.93%, respectivamente) con respecto al testigo (7.10%) y los pepinos recubiertos con quitosano (7.18%), quitosano-cera (7.42%), quitosano-AEO (7.65%) y quitosano-cera-AEO (8.03%). Sin embargo, los pepinos recubiertos con cera redujeron la pérdida de peso de manera significativa ($p \leq 0.05$) con respecto al testigo y los demás tratamientos de manera global durante todo el periodo de evaluación. De manera general, se observó que las tasas de pérdida de peso estuvieron en el rango de 1.11-1.35 g por día. La menor pérdida de peso observada para los recubrimientos de cera es atribuida a las buenas propiedades de barrera a la transmisión de agua que presentan los recubrimientos lipídicos, debido a la naturaleza hidrofóbica de sus constituyentes.

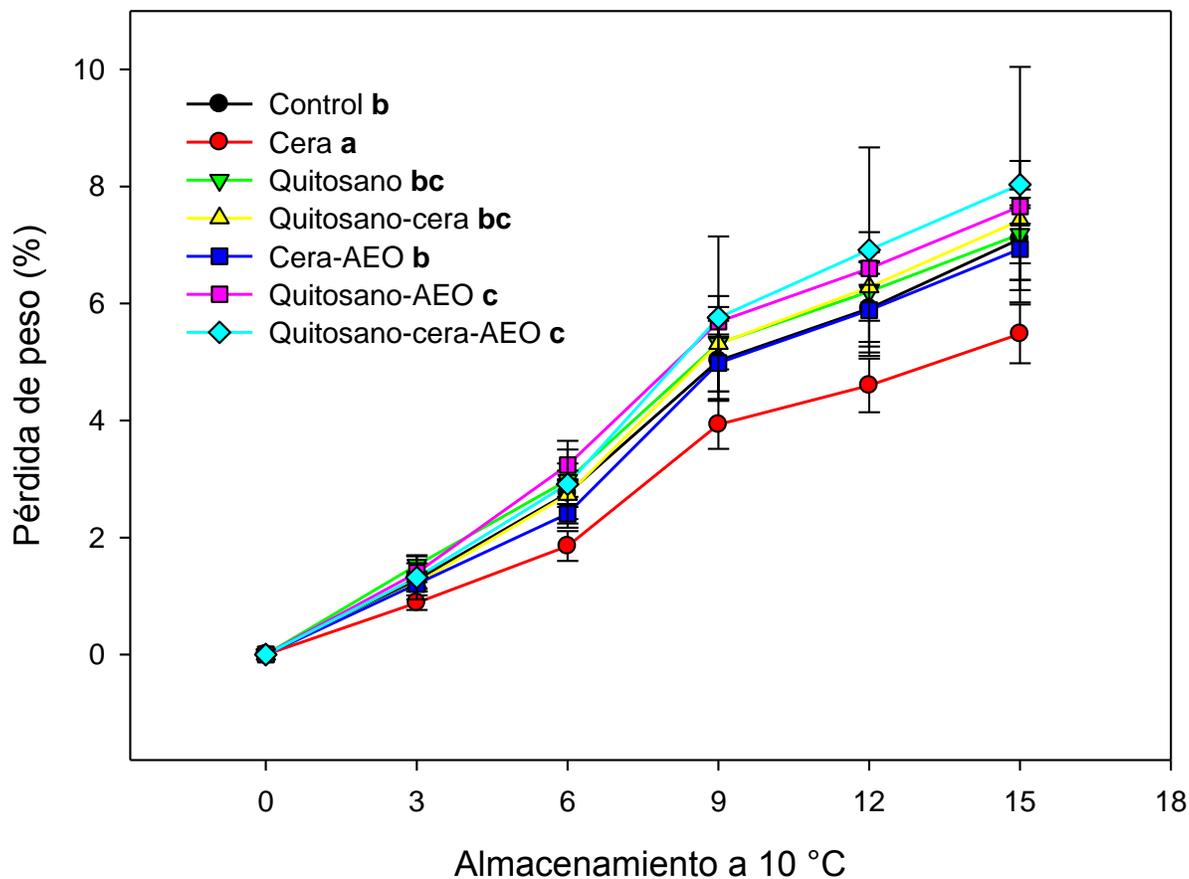


Figura 12. Pérdida de peso de pepinos frescos recubiertos con cera, quitosano, quitosano-cera, cera-AEO, quitosano-AEO y quitosano-cera-AEO almacenados a 10 °C durante 15 días. Medias \pm DE, n=9. *Diferentes literales indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en base al efecto global de los recubrimientos.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Baldwin *et al.*, (1999) quienes evaluaron el efecto de la aplicación de dos recubrimientos, uno a base de celulosa y otro de cera de carnauba, sobre mango fresco almacenado a 10 °C y 90% H. R. Estos autores reportaron que el recubrimiento de cera de carnauba redujo significativamente la pérdida de peso comparado con los mangos no recubiertos y el recubrimiento a base de celulosa. Por otra parte, Chiumarelli y Ferreira (2006) observaron una tendencia similar en la pérdida de peso a lo encontrado en el presente estudio donde tomates no recubiertos presentaron una pérdida de peso de 3.41% con respecto a los frutos recubiertos con cera de carnauba (1.63%) después de 15 días de almacenamiento a 12.5 °C.

De manera similar, Dávila-Aviña *et al.*, (2011) reportaron que la aplicación de recubrimientos lipídicos como la cera de carnauba y aceite mineral redujeron la pérdida de peso de tomate fresco, sin embargo, esta disminución sólo fue significativa para el recubrimiento de aceite mineral. Esta diferencia con respecto a lo observado en el presente trabajo puede ser atribuido a la diferente composición de las formulaciones comerciales de cera de carnauba. Se ha reportado que las propiedades de barrera al agua de esta y otras ceras son muy buenas y su permeabilidad al vapor de agua es hasta 10 veces menor que la de películas de lecitina, 25 veces inferior a las de la mayoría de los aceites y entre 100 y 200 veces inferior a la permeabilidad de las películas de polisacáridos (Guilbert *et al.*, 1995).

El recubrimiento de quitosano no mostró tener un efecto en disminuir la pérdida de peso de pepino, lo cual era de esperarse dadas las características hidrofílicas del material por lo cual las pérdidas ascendieron al 3.5%. Al incorporar la cera al recubrimiento de quitosano se esperaba una mejora en las propiedades de barrera dada la naturaleza lipofílica de la cera; sin embargo, se pudo observar que no existieron diferencias ($p \geq 0.05$) entre los recubrimientos de quitosano, quitosano-AEO, quitosano-cera, cera-AEO y quitosano-cera-AEO, presentando también pérdidas superiores al 3.5%.

Los resultados antes descritos son diferentes a lo reportado por Velickova *et al.*, (2013) quienes describen que tras la incorporación de una segunda capa de recubrimiento a base de cera de abeja se mejoraron las propiedades de barrera a la transmisión de agua de películas de quitosano. Esto puede ser atribuido al elevado punto de fusión de las ceras, las cuales, cuando se encuentran como una fase dispersa son mas frágiles e inestables (Bosquez-Molina *et al.*, 2003). Asimismo, es claro que su estabilidad y consistencia son fuertemente dependientes de la temperatura, donde temperaturas bajas pueden provocar su cristalización (Endlein y Peleikis 2011). Esto pudo observarse claramente en imágenes microscópicas tomadas de la superficie del fruto de pepino (Figura 13), donde se observa que los frutos que fueron cubiertos con cera presentaron cristalización en diferentes partes de la superficie del fruto al almacenarse a 10 °C. Adicionalmente, se pudo observar que la incorporación de la cera sobre el pepino recubierto con quitosano conllevó a una poca homogeneidad del sistema lo que podría relacionarse con la poca eficacia del recubrimiento bicapa.

Efecto Antimicrobiano de Recubrimientos Bicapa de Cera de Carnauba- quitosano adicionadas con AEO

En el Cuadro 4 se muestra el efecto de los tratamientos sobre la carga bacteriana de pepino almacenado a 10 °C durante 15 días. Se puede observar claramente un descenso de la carga microbiana por efecto de la aplicación de los recubrimientos al día 0, asimismo, se muestra un ligero aumento al día 3 de almacenamiento, presentando todos los tratamientos un crecimiento bacteriano menor al testigo. Sin embargo, al día 6 de almacenamiento, los recubrimientos de cera, cera-AEO y los recubrimientos bicapa presentaron un incremento en la carga bacteriana con valores en el rango de 5-7 log UFC/g. Por otra parte, los recubrimientos de quitosano y quitosano-AEO mantuvieron la carga bacteriana por debajo de los 5 log UFC/g. Sin embargo, al día 9 y 12 de almacenamiento, este efecto antibacteriano se vio disminuido en los recubrimientos de

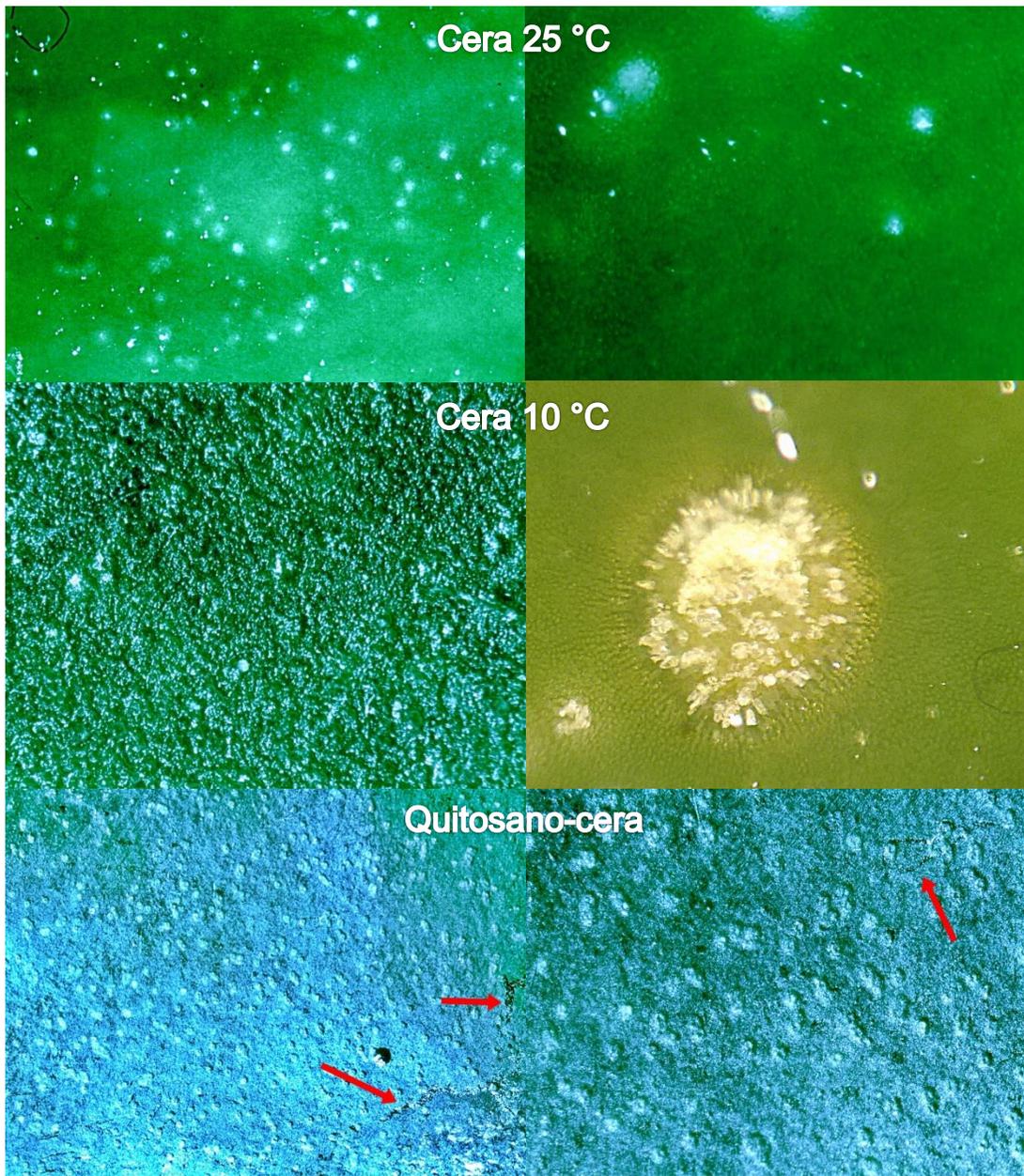


Figura 13. Efecto de la temperatura de almacenamiento (25 y 10 °C) sobre la superficie de pepino recubierto con cera, así como falta de homogeneidad de la película de quitosano-cera sobre la superficie del fruto (regiones marcadas con flechas). Imágenes tomadas con microscopio estereoscópico Olympus SZX12 a una magnitud de 0.7-9x.

Cuadro 4. Efecto antibacteriano de películas comestibles en pepinos almacenados a 10 °C durante 15 días.

Días	log UFC/g						
	Testigo	Cera	Quitosoano	Quit-cera	Cera-AEO	Quit-AEO	Quit-cera-AEO
Inicial	6.70	6.70	6.70	6.70	6.70	6.70	6.70
0	6.70 ^a	4.44 ^b	3.81 ^b	4.62 ^b	4.94 ^b	3.76 ^b	4.80 ^b
3	6.0 ^c	5.45 ^b	4.80 ^a	4.90 ^{ab}	5.36 ^{ab}	5.20 ^{ab}	4.96 ^{ab}
6	5.90 ^b	6.97 ^c	4.80 ^a	5.0 ^a	6.98 ^c	4.85 ^a	5.09 ^a
9	5.23 ^{bc}	5.54 ^c	4.70 ^a	4.85 ^{ab}	5.34 ^c	5.51 ^c	5.11 ^{abc}
12	6.19 ^c	5.39 ^{ab}	5.22 ^a	5.99 ^c	6.30 ^c	5.73 ^{bc}	5.80 ^{bc}
15	7.37 ^d	6.90 ^c	5.78 ^a	6.68 ^{bc}	6.89 ^c	6.39 ^b	6.56 ^b

Diferentes literales en filas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$), $n=4$.

quitosano-AEO, observándose un incremento de la carga bacteriana hasta el final del tiempo de almacenamiento. El recubrimiento de quitosano fue el tratamiento que de mejor manera la proliferación bacteriana durante el periodo de evaluación. Durante los 15 días de almacenamiento, el recubrimiento de quitosano fue el que provocó el menor crecimiento bacteriano (4.83 log UFC/g) en comparación con el testigo (6.23 log UFC/g) y los demás tratamientos.

Estos resultados pueden ser atribuidos al efecto antibacteriano que posee el quitosano y el AEO. Se hipotetiza que el efecto antibacteriano del quitosano es atribuido a la interacción de los grupos amino presentes en su estructura con fosfolípidos presentes en la membrana celular bacteriana, lo cual conlleva a la desestabilización de la misma y pérdida de constituyentes celulares. Sin embargo, se sabe que cuando se tienen sistemas multicomponente se pueden llevar a cabo interacciones entre los grupos funcionales de los componentes de recubrimiento o bien con la superficie del sistema estudiado, provocando un bloqueo de sitios activos y por lo tanto una disminución del efecto antibacteriano (Pranoto *et al.*, 2005).

Como pudimos observar anteriormente, los espectros de FT-IR de las películas mostraron interacciones entre el quitosano, cera y AEO. Particularmente, la película de quitosano-cera mostró interacciones en los grupos O-H, lo cual haría suponer que los grupos amino del quitosano se encuentran libres para ejercer su efecto; sin embargo, esto no fue así, ya que se observó un incremento de microorganismos después del sexto día de almacenamiento. A pesar de las propiedades antimicrobianas del quitosano, este no tiene la capacidad de difundirse; por lo tanto, solo los microorganismos en contacto directo con los sitios activos del quitosano pueden ser inhibidos (Figura 14) (Coma *et al.*, 2002). En base a esto podemos decir que la aplicación de cera sobre el quitosano condujo a un impedimento estérico entre los sitios activos del quitosano y las bacterias. Por otra parte, los componentes del AEO son altamente volátiles, los cuales al 6 día de almacenamiento pudieron haberse volatilizado.

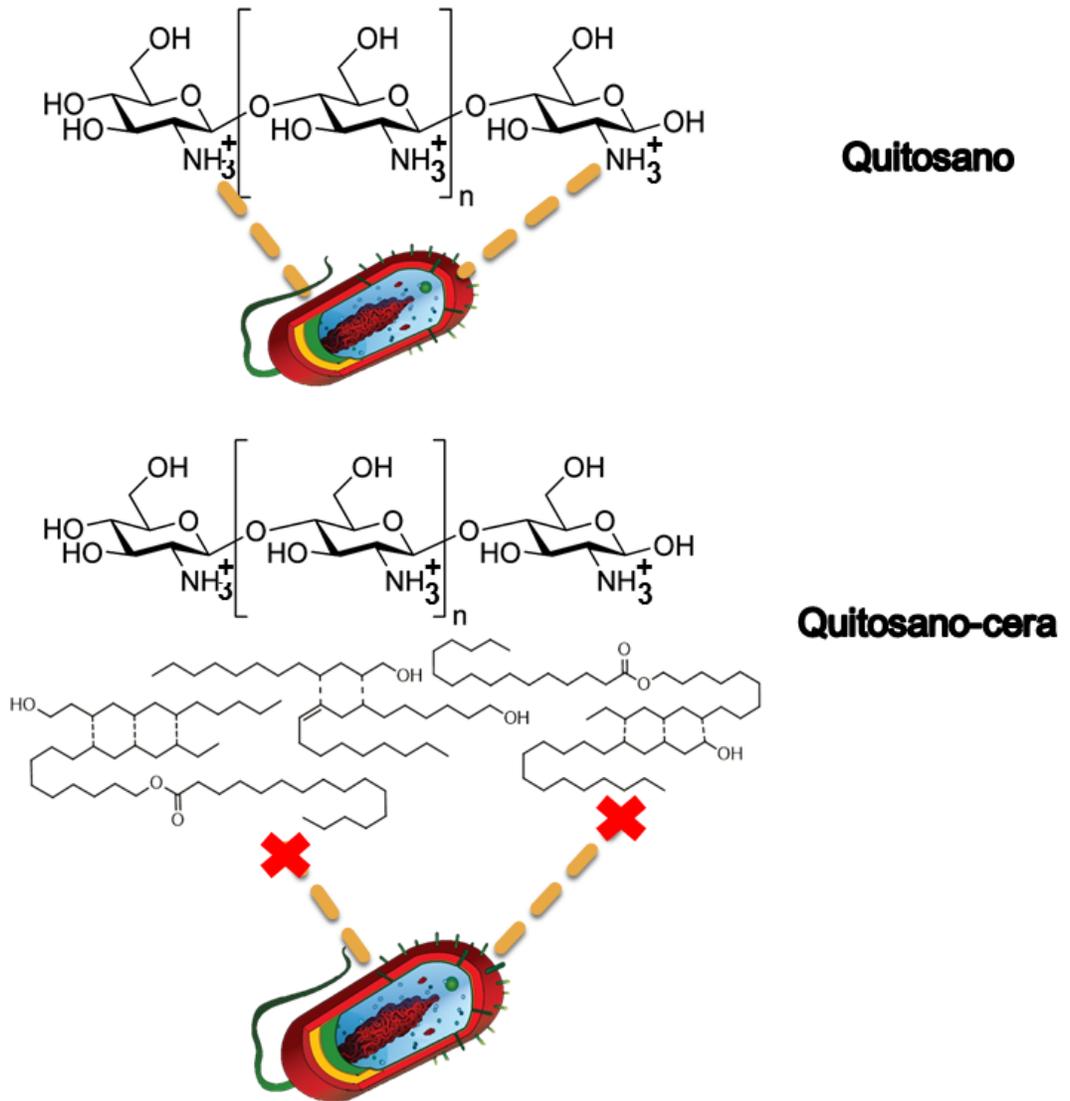


Figura 14. El efecto antibacteriano del quitosano se da por con el contacto directo de sus sitios activos con los microorganismos.

Los resultados obtenidos son similares a lo reportado por Poverenov *et al.*, (2014) quienes evaluaron el efecto antimicrobiano de películas bicapa de quitosano-alginato y los mismos de manera individual sobre el crecimiento de mesófilos aerobios en melones almacenados a 6 °C durante 14 días. Estos autores reportaron que la película de quitosano tuvo un mejor efecto antimicrobiano de manera individual que cuando se combinaba con alginato reduciendo el conteo de mesófilos aerobios 2.27 y 1.08 log UFC/g con respecto al testigo y el recubrimiento bicapa al final del almacenamiento, respectivamente.

El efecto antimicrobiano del quitosano observado en el presente estudio (reducción de 1.96 log UFC/g) fue similar a lo reportado por Durango *et al.*, (2006) quienes observaron una reducción de 1.34 log UFC/g de mesófilos aerobios tras la aplicación de recubrimientos de quitosano en zanahoria almacenada a 10 °C durante 15 días. También, Moreira *et al.*, (2011) reportan que la aplicación de recubrimientos de quitosano sobre floretes de brócoli almacenados a 7 °C por 20 días redujeron de manera significativa las cuentas de mesófilos aerobios comparados con el testigo no recubierto. De manera similar, Alvarez *et al.*, (2013) reportaron que la aplicación de recubrimientos de quitosano (10 y 20 g/L) sobre floretes de brócoli produjeron una reducción significativa del conteo de mesófilos aerobios (2.5-3 log UFC/g) comparado con el testigo no recubierto entre el día 2 y 7 de almacenamiento a 7 °C.

En el Cuadro 5 se muestra el conteo de hongos y levaduras de pepinos con recubrimientos comestibles y almacenados a 10 °C durante 15 días. Se puede observar que todos los pepinos recubiertos presentaron una carga de hongos y levaduras similar ($p \geq 0.05$) al inicio del almacenamiento, siendo los pepinos recubiertos con quitosano-AEO los que presentaron los recuentos más bajos (1.82 log UFC/mL). La carga fúngica inicial de los pepinos testigo fue significativamente diferente a los recubiertos con cera, quitosano, quitosano-cera, quitosano-AEO y quitosano-cera-AEO, presentando un crecimiento de 3.58 log UFC/g.

Cuadro 5. Conteo de hongos y levaduras de pepinos recubiertos con películas comestibles almacenados a 10 °C durante 15 días.

Días	log UFC/g*						
	Testigo	Cera	Quitosoano	Quit-cera	Cera-AEO	Quit-AEO	Quit-cera-AEO
0	3.58 ^c	2.30 ^{ab}	2.14 ^{ab}	2.18 ^{ab}	2.72 ^{bc}	1.82 ^{ab}	1.87 ^a
3	5.07 ^c	5.22 ^d	3.72 ^a	4.12 ^{ab}	4.69 ^{bcd}	4.10 ^{ab}	4.27 ^{abc}
6	4.30 ^b	3.53 ^a	3.0 ^a	-	3.37 ^a	-	3 ^a
9	4.25 ^b	-	3.20 ^a	-	3.07 ^a	4.13 ^b	-
12	4.98 ^c	3 ^a	4.12 ^b	3.0 ^a	4.05 ^b	3 ^a	-
15	5.02 ^c	3.55 ^{ab}	3.94 ^b	-	3.30 ^{ab}	3 ^a	3.69 ^{ab}

- Menor a 250 UFC/g. Diferentes literales en filas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$).

Al día 3 de almacenamiento, los pepinos recubiertos con quitosano mostraron el menor contenido de hongos y levaduras (3.72 log UFC/g) con respecto a los demás tratamientos y al testigo, los cuales presentaron un crecimiento de microorganismos en el rango de 4.10-5.22 log UFC/g. Un comportamiento similar se observó al día 6 de almacenamiento en donde los pepinos cubiertos con quitosano-AEO y quitosano-cera no presentaron crecimiento de hongos y levaduras, y los pepinos testigo presentaron cuentas superiores a 4 log UFC/g. Al final del tiempo de almacenamiento, todos los tratamientos presentaron un crecimiento similar de hongos y levaduras. Los pepinos cubiertos con quitosano-cera no presentaron crecimiento microbiano, mientras que los pepinos cubiertos con quitosano-AEO presentaron la carga más baja (3 log UFC/g).

Es importante resaltar que sólo se encontraron diferencias entre los recubrimientos quitosano-AEO, quitosano y el testigo. El efecto antifúngico de las películas de quitosano fue similar a lo reportado por El Ghaouth *et al.*, (1992) quienes encontraron que recubrimientos de quitosano (2%) controlaron la infección por *B. cinerea* en tomates. Estos mismos autores observaron que fresas cubiertas con quitosano al 1.5% presentaban un 60% menos deterioro por *B. cinerea* que el testigo a los 14 días de almacenamiento (El Ghaouth *et al.*, 1991). Por otra parte, Romanazzi *et al.*, (2002) reportaron que la reducción de este mismo microorganismo en uvas cubiertas con quitosano fue atribuida a la combinación de las propiedades del polímero como antifúngico y a su capacidad de estimular mecanismos de defensa como la activación de quitinasa y la síntesis de fitoalexinas.

CONCLUSIÓN

La incorporación de cera fue el factor que determinó la reducción de la TVA, disminuyendo la permeabilidad de la película de quitosano. Por otro lado, las películas de quitosano-AEO afectaron el crecimiento *in vitro* de todos los microorganismos evaluados. Los recubrimientos de cera y cera-AEO provocaron la menor pérdida de peso de pepino con respecto a los demás tratamientos; sin embargo, en el sistema quitosano-cera-AEO no se observó tal efecto. Los recubrimientos comestibles causaron una disminución de la carga microbiana en pepino fresco, siendo los recubrimientos de quitosano los que disminuyeron este parámetro de manera significativa. Las diferencias entre las propiedades de barrera al agua y al crecimiento de microorganismos de los componentes individuales del sistema en comparación con su combinación pueden atribuirse a las posibles interacciones entre estos, lo cual fue evidenciado por los ensayos de infrarrojo.

REFERENCIAS

- Altiok, D., E. Altiok, *et al.*, 2010. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 21(7): 2227-2236.
- Alvarez, M. V., A. G. Ponce, *et al.*, 2013. Antimicrobial efficiency of chitosan coating enriched with bioactive compounds to improve the safety of fresh cut broccoli. *LWT - Food Science and Technology*. 50(1): 78-87.
- Arcila-Lozano, C. C., G. Loarca-Piña, *et al.*, 2004. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 54(1): 100-111.
- Arnon, H., Y. Zaitsev, *et al.*, 2014. Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 87: 21-26.
- Ayala-Zavala, J. F., H. Soto-Valdez, *et al.*, 2008. Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomum zeylanicum*) and garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*. 60(3-4): 359-368.
- Ayala-Zavala, J. F., V. Vega-Vega, *et al.*, 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International*. 44(7): 1866-1874.
- Balau, L., G. Lisa, *et al.*, 2004. Physico-chemical properties of Chitosan films. *Central European Journal of Chemistry*. 2(4): 638-647.
- Baldwin, E. A., J. K. Burns, *et al.*, 1999. Effect of two edible coatings with different permeability characteristics on mango (*Mangifera indica* L.) ripening during storage. *Postharvest Biology and Technology*. 17(3): 215-226.
- Beirão da Costa, S., C. Duarte, *et al.*, 2012. Effect of the matrix system in the delivery and in vitro bioactivity of microencapsulated Oregano essential oil. *Journal of Food Engineering*. 110(2): 190-199.
- Ben-Shalom, N., R. Ardi, *et al.*, 2003. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*. 22(2): 285-290.
- Bosquez-Molina, E., I. Guerrero-Legarreta, *et al.*, 2003. Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum–candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Research International*. 36(9): 885-893.

- Brackett, R. E. 1992. Shelf Stability and Safety of Fresh Produce as Influenced by Sanitation and Disinfection. *Journal of Food Protection*. 55(10): 808-814.
- Brasil, I. M., C. Gomes, *et al.*,. 2012. Polysaccharide-based multilayered antimicrobial edible coating enhances quality of fresh-cut papaya. *LWT-Food Science and Technology*. 47(1): 39-45.
- Brugnerotto, J., J. Lizardi, *et al.*,. 2001. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*. 42(8): 3569-3580.
- Burt, S. A. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94(3): 223-253.
- Burt, S. A. and R. D. Reinders. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters of Applied Microbiology*. 36(3): 162-167.
- Carnide, V. and M. D. R. Barroso. 2006. Las cucurbitáceas: bases para su mejora genética. *Horticultura Internacional*(53): 16-21.
- Carvalho, C. P. P., C. Nunes, *et al.*,. 2012. Control de enfermidades de poscosecha. *CÍTRICOS: CULTIVO*.
- Cazier, J.-B. 2000. Mathematical modelling of gas exchanges in film-wrapped cucumbers.
- CDC. (2011, 12/10/2012). Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved 07/01, 2015, from <http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O157H7-11-12/index.html>.
- CDC. (2012, 12/10/2012). Centers for Disease Control and Prevention. Retrieved 07/01, 2015, from <http://www.cdc.gov/ecoli/2012/O157H7-11-12/index.html>.
- Coma, V., A. Martial-Gros, *et al.*,. 2002. Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Journal of Food Science-Chicago*. 67(3): 1162-1169.
- Cosentino, S., C. Tuberoso, *et al.*,. 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of *Sardinian thymus* essential oils. *Letters of Applied Microbiology*. 29(2): 130-135.
- Charai, M., M. Mosaddak, *et al.*,. 1996. Chemical composition and antimicrobial activities of two aromatic plants: *Origanum majorana* L. and *O. compactum* Benth. *Journal of Essential Oil Research*. 8(6): 657-664.
- Chien, P.-J., F. Sheu, *et al.*,. 2007. Quality assessment of low molecular weight chitosan coating on sliced red pitayas. *Journal of Food Engineering*. 79(2): 736-740.
- Chien, P.-J., F. Sheu, *et al.*,. 2007. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *Journal of Food Engineering*. 78(1): 225-229.
- Chien, P.-J., F. Sheu, *et al.*,. 2007. Effects of edible chitosan coating on quality and shelf life of sliced mango fruit. *J. Food Eng.* 78(1): 225-229.
- Chiumarelli, M. and M. D. Ferreira. 2006. Qualidade pós-colheita de tomates' Débora'com utilização de diferentes coberturas comestíveis e temperaturas de armazenamento. *Horticultura Brasileira*. 24(3): 381-385.

- Dávila-Aviña, J., J. Villa-Rodríguez, *et al.*, 2011. Effect of edible coatings, storage time and maturity stage on overall quality of tomato fruits. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*. 6(1): 162-171.
- De Azeredo, G. A., T. L. M. Stamford, *et al.*, 2011. Combined application of essential oils from *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. to inhibit bacteria and autochthonous microflora associated with minimally processed vegetables. *Food Research International*. 44(5): 1541-1548.
- Debeaufort, F., J.-A. Quezada-Gallo, *et al.*, 2000. Lipid hydrophobicity and physical state effects on the properties of bilayer edible films. *Journal of Membrane Science*. 180(1): 47-55.
- Devlieghere, F., A. Vermeulen, *et al.*, 2004. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*. 21(6): 703-714.
- Dhall, R. 2013. Advances in edible coatings for fresh fruits and vegetables: a review. *CRC Critical Reviews of Food Science*. 53(5): 435-450.
- Dorman, H. and S. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88(2): 308-316.
- Du, W.-X., C. W. Olsen, *et al.*, 2008. Storage Stability and Antibacterial Activity against *Escherichia coli* O157:H7 of Carvacrol in Edible Apple Films Made by Two Different Casting Methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(9): 3082-3088.
- Durango, A. M., N. F. F. Soares, *et al.*, 2006. Microbiological evaluation of an edible antimicrobial coating on minimally processed carrots. *Food Control*. 17(5): 336-341.
- Dutta, P., S. Tripathi, *et al.*, 2009. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*. 114(4): 1173-1182.
- El Ghaouth, A., J. Arul, *et al.*, 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science*. 56(6): 1618-1620.
- El Ghaouth, A., R. Ponnampalam, *et al.*, 1992. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *Horticultural Science*. 27(9): 1016-1018.
- El Ghaouth, A., R. Ponnampalam, *et al.*, 1992. Chitosan coating to extend the storage life of tomatoes. *HortScience*. 27(9): 1016-1018.
- Embuscado, M. E. and K. C. Huber. 2009. *Edible films and coatings for food applications*. Springer.
- Endlein, E. and K. H. Peleikis. 2011. Natural Waxes—Properties, Compositions and Applications. *SÖFW-Journal*. 137(4).
- Falguera, V., J. P. Quintero, *et al.*, 2011. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Science and Technology*. 22(6): 292-303.
- FDA. (2014, 07/21/2014). Food and Drug Administration. Retrieved 06/30, 2015, from <http://www.fda.gov/Food/RecallsOutbreaksEmergencies/Outbreaks/ucm315879.htm>.
- Giménez-Miralles, M. A. 2013. Efectos del etileno y el 1-MCP sobre la calidad poscosecha de los frutos de diferentes variedades de calabacín

- conservados en frío. Ingeniero Técnico Agrícola. Universidad de Almería. Almería España.
- González-Aguilar, G. A., E. Valenzuela-Soto, *et al.*, 2009. Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya 'Maradol'. *Journal of Science and Food Agriculture*. 89(1): 15-23.
- Guarda, A., J. F. Rubilar, *et al.*, 2011. The antimicrobial activity of microencapsulated thymol and carvacrol. *International Journal of Food Microbiology*. 146(2): 144-150.
- Guilbert, S., N. Gontard, *et al.*, 1995. Technology and applications of edible protective films. *Packaging Technology and Science*. 8(6): 339-346.
- Gutiérrez-Larraínzar, M., J. Rúa, *et al.*, 2012. Evaluation of antimicrobial and antioxidant activities of natural phenolic compounds against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Food Control*. 26(2): 555-563.
- Hernández-Munoz, P., E. Almenar, *et al.*, 2008. Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria ananassa*) quality during refrigerated storage. *Food Chemistry*. 110(2): 428-435.
- Jiang, Y. and Y. Li. 2001. Effects of chitosan coating on postharvest life and quality of longan fruit. *Food Chemistry*. 73(2): 139-143.
- Kaminski, W. and Z. Modrzejewska. 1997. Equilibrium studies for the sorption of metal ions onto chitosan. *Separation Science and Technology*. 32(16): 2659-2668.
- Kamper, S. and O. Fennema. 1984. Water vapor permeability of an edible, fatty acid, bilayer film. *Journal of Food Science*. 49(6): 1482-1485.
- Kazarian, S. G., M. F. Vincent, *et al.*, 1996. Specific Intermolecular Interaction of Carbon Dioxide with Polymers. *Journal of the American Chemical Society*. 118(7): 1729-1736.
- Kim, J., M. R. Marshall, *et al.*, 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43(11): 2839-2845.
- Kong, M., X. G. Chen, *et al.*, 2010. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*. 144(1): 51-63.
- Lambert, R. J. W. and J. Pearson. 2000. Susceptibility testing: accurate and reproducible minimum inhibitory concentration (MIC) and non-inhibitory concentration (NIC) values. *Journal of Applied Microbiology*. 88(5): 784-790.
- Lemoine, M. L., P. M. Civello, *et al.*, 2007. Influence of postharvest UV-C treatment on refrigerated storage of minimally processed broccoli (*Brassica oleracea* var. Italica). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 87(6): 1132-1139.
- Li, B., X. Wang, *et al.*, 2008. Antibacterial activity of chitosan solution against *Xanthomonas* pathogenic bacteria isolated from *Euphorbia pulcherrima*. *Carbohydrate Polymers*. 72(2): 287-292.
- Lin, D. and Y. Zhao. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviewa in Food Science and Food Safety*. 6(3): 60-75.

- Liu, J., S. Tian, *et al.*, 2007. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 44(3): 300-306.
- Lopez-Reyes, J. G., D. Spadaro, *et al.*, 2010. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples in vivo. *Flavour and Fragrance Journal*. 25(3): 171-177.
- Maldonado, G. V. 2015. Uso de ceras orgánicas como recubrimiento en la vida de postcosecha de la calabacita zucchini (*Cucurbita pepo* L.). Ingeniero Agrónomo en Horticultura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
- Martínez-Camacho, A. P., M. O. Cortez-Rocha, *et al.*, 2010. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. *Carbohydrate Polymers*. 82(2): 305-315.
- Martínez-Romero, D., F. Guillén, *et al.*, 2007. Influence of carvacrol on survival of *Botrytis cinerea* inoculated in table grapes. *International Journal of Food Microbiology*. 115(2): 144-148.
- Martiñon, M. E., R. G. Moreira, *et al.*, 2014. Development of a multilayered antimicrobial edible coating for shelf-life extension of fresh-cut cantaloupe (*Cucumis melo* L.) stored at 4 °C. *LWT - Food Science and Technology*. 56(2): 341-350.
- McGuire, R. G. and G. J. Hallman. 1995. Coating guavas with cellulose-or carnauba-based emulsions interferes with postharvest ripening. *Horticultural Science*. 30(2): 294-295.
- Melgarejo-Flores, B. G., L. A. Ortega-Ramírez, *et al.*, 2013. Antifungal protection and antioxidant enhancement of table grapes treated with emulsions, vapors, and coatings of cinnamon leaf oil. *Postharvest Biology and Technology*. 86: 321-328.
- Mohamed, C., K. A. Clementine, *et al.*, 2013. Antimicrobial and physical properties of edible chitosan films enhanced by lactoperoxidase system. *Food Hydrocolloids*. 30(2): 576-580.
- Moreira, M. d. R., S. I. Roura, *et al.*, 2011. Effectiveness of chitosan edible coatings to improve microbiological and sensory quality of fresh cut broccoli. *LWT - Food Science and Technology*. 44(10): 2335-2341.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, N. 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: eleventh informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, P. A.
- Navarro, D., H. M. Díaz-Mula, *et al.*, 2011. Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* with Aloe vera gel alone or with the addition of thymol. *International Journal of Food Microbiology*. 151(2): 241-246.
- Oms-Oliu, G., R. Soliva-Fortuny, *et al.*, 2008. Using polysaccharide-based edible coatings to enhance quality and antioxidant properties of fresh-cut melon. *LWT-Food Science and Technology*. 41(10): 1862-1870.
- Ouattara, B., R. E. Simard, *et al.*, 2000. Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*. 62(1-2): 139-148.
- Paris, H. S. 2001. History of the Cultivar: Groups of *Cucurbita pepo*. *Horticultural Reviews*, 25: 71-170.

- Park, S. I., M. A. Daeschel, *et al.*, 2004. Functional Properties of Antimicrobial Lysozyme-Chitosan Composite Films. *Journal of Food Science*. 69(8): M215-M221.
- Parras-Jurado, A. 2014. Análisis microbiológico de alimentos vegetales Licenciatura en Biología.
- Pascual, M. E., K. Slowing, *et al.*, 2001. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology*. 76(3): 201-214.
- Peniche, C., W. Argüelles-Monal, *et al.*, 2008. Chitin and chitosan: major sources, properties and applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*: 517-542.
- Pérez-Alfonso, C., D. Martínez-Romero, *et al.*, 2012. The effects of essential oils carvacrol and thymol on growth of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* involved in lemon decay. *International Journal of Food Microbiology*. 158(2): 101-106.
- Pérez-Gago, M. B. and J. M. Krochta. 2005. Emulsion and bilayer edible films. *Innovations in Food Packaging*: 384.
- Phan The, D., F. Debeaufort, *et al.*, 2002. Arabinoxylan–Lipid-Based Edible Films and Coatings. 3. Influence of Drying Temperature on Film Structure and Functional Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50(8): 2423-2428.
- Pol, I. E. and E. J. Smid. 1999. Combined action of nisin and carvacrol on *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 29(3): 166-170.
- Poverenov, E., S. Danino, *et al.*, 2013. Layer-by-Layer Electrostatic Deposition of Edible Coating on Fresh Cut Melon Model: Anticipated and Unexpected Effects of Alginate–Chitosan Combination. *Food and Bioprocess Technology*: 1-9.
- Poverenov, E., S. Danino, *et al.*, 2014. Layer-by-Layer Electrostatic Deposition of Edible Coating on Fresh Cut Melon Model: Anticipated and Unexpected Effects of Alginate–Chitosan Combination. *Food and Bioprocess Technology*. 7(5): 1424-1432.
- Pranoto, Y., S. K. Rakshit, *et al.*, 2005. Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT - Food Science and Technology*. 38(8): 859-865.
- Pranoto, Y., V. M. Salokhe, *et al.*, 2005. Physical and antibacterial properties of alginate-based edible film incorporated with garlic oil. *Food Research International*. 38(3): 267-272.
- Prudent, D., F. Perineau, *et al.*, 1995. Analysis of the Essential Oil of Wild Oregano from Martinique (*Coleus aromaticus* Benth.)—Evaluation of Its Bacteriostatic and Fungistatic Properties. *Journal of Essential Oil Research*. 7(2): 165-173.
- Quirós-Sauceda, A., J. Ayala-Zavala, *et al.*, 2014. Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. *Journal of Food Science and Technology*: 1-12.
- Rabea, E. I., M. E. T. Badawy, *et al.*, 2003. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*. 4(6): 1457-1465.

- Rangel, D. M., J. S. Cepeda, *et al.*, 2004. Efecto de las condiciones de almacenamiento y el encerado en el estatus hídrico y la calidad poscosecha de pepino de mesa. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 27(2): 157-165.
- Robinson, R. and D. Decker-Walters (1999). *Cucurbits*. CAB International, Wallingford, Oxford, UK.
- Rodriguez-Garcia, I. 2013. Aceite esencial de orégano adicionado a recubrimientos de pectina como tratamiento antifúngico, antioxidante y saborizante en frutos de tomate. Master. Maestría en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. Hermosillo, Sonora, México.
- Romanazzi, G., F. Nigro, *et al.*, 2002. Effects of pre-and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science-Chicago*. 67(5): 1862-1867.
- Ruiz-Navajas, Y., M. Viuda-Martos, *et al.*, 2013. *In vitro* antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. *Food Control*. 30(2): 386-392.
- Sauceda, E. N. R. 2011. Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai*. 7(1): 153-170.
- Saucedo-Pompa, S., R. Rojas-Molina, *et al.*, 2009. Edible film based on candelilla wax to improve the shelf life and quality of avocado. *Food Research International*. 42(4): 511-515.
- Sellamuthu, P. S., M. Mafune, *et al.*, 2013. Thyme oil vapour and modified atmosphere packaging reduce anthracnose incidence and maintain fruit quality in avocado. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93(12): 3024-3031.
- Sepúlveda-Jiménez, G., H. Porta-Ducoing, *et al.*, 2004. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21: 355-363.
- SIAP-SAGARPA. (2004). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Retrieved 16/07, 2015.
- Silva-Weiss, A., M. Ihl, *et al.*, 2013. Natural Additives in Bioactive Edible Films and Coatings: Functionality and Applications in Foods. *Food Engineering Reviews*. 5(4): 200-216.
- Siller, J. 2000. Análisis de la horticultura en México. *Productores de Hortalizas*. 10: 8-12.
- Sivropoulou, A., E. Papanikolaou, *et al.*, 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44(5): 1202-1205.
- Snowdon, A. L. 2010. Post-harvest diseases and disorders of fruits and vegetables: Volume 2: Vegetables. Manson Publishing.
- Soliman, K. M. and R. I. Badeaa. 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chemistry Toxicology*. 40(11): 1669-1675.

- Sultanbawa, Y., A. Cusack, *et al.*, 2009. An innovative microplate assay to facilitate the detection of antimicrobial activity in plant extracts. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 17(4): 519-534.
- Tepe, B., D. Daferera, *et al.*, 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (*Lamiaceae*). *Food Chemistry*. 90(3): 333-340.
- Tsai, G.-J., W.-H. Su, *et al.*, 2002. Antimicrobial activity of shrimp chitin and chitosan from different treatments and applications of fish preservation. *Fisheries Science*. 68(1): 170-177.
- UCDAVIS. (2013). Cucumber: Recommendations for Maintaining Postharvest Quality. Retrieved June, 11, 2015, from <http://postharvest.ucdavis.edu/pfvegetable/Cucumber/>.
- Ultee, A. 2000. Bactericidal action of carvacrol towards the food pathogen *Bacillus cereus*: a case study of a novel approach to mild food preservation. Wageningen Universiteit.
- Ultee, A., M. Bennik, *et al.*, 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied Environmental Microbiology*. 68(4): 1561-1568.
- Valencia-Chamorro, S. A., L. Palou, *et al.*, 2011. Performance of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC)-lipid edible coatings with antifungal food additives during cold storage of 'Clemenules' mandarins. *LWT-Food Science and Technology*. 44(10): 2342-2348.
- Valles, M. V., P. A. Salinas, *et al.*, 2014. Efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* en la supervivencia de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, *Salmonella parathypi* y *Salmonella enteritidis* en carne de cerdo pasteurizada y refrigerada. *Revista Rebiol*. 34(1): 57-68.
- Vargas, M., C. Pastor, *et al.*, 2008. Recent advances in edible coatings for fresh and minimally processed fruits. *CRC Critical Reviews in Food Science*. 48(6): 496-511.
- Velickova, E., E. Winkelhausen, *et al.*, 2013. Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions. *LWT-Food Science and Technology*. 52(2): 80-92.
- Velickova, E., E. Winkelhausen, *et al.*, 2013. Impact of chitosan-beeswax edible coatings on the quality of fresh strawberries (*Fragaria ananassa* cv Camarosa) under commercial storage conditions. *LWT-Food Science and Technology*.
- Weller, C. L., A. Gennadios, *et al.*, 1998. Edible Bilayer Films from Zein and Grain Sorghum Wax or Carnauba Wax. *LWT-Food Science and Technology*. 31(3): 279-285.
- Zagory, D. 1999. Effects of post-processing handling and packaging on microbial populations. *Postharvest Biology and Technology*. 15(3): 313-321.
- Zivanovic, S., S. Chi, *et al.*, 2005. Antimicrobial Activity of Chitosan Films Enriched with Essential Oils. *Journal of Food Science*. 70(1): M45-M51.