



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS APLICADOS A *Pleurotus ostreatus*
PARA SU CONSERVACIÓN EN POSTCOSECHA

TESIS

Que como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta:

MITZY NAYELI ESTRADA RAMÍREZ

Bajo la supervisión de: Salvador Valle Guadarrama, Dr.



DIRECCION GENERAL ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES



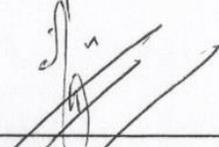
Chapingo, Estado de México Diciembre de 2016

**RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS APLICADOS A *Pleurotus ostreatus*
PARA SU CONSERVACIÓN EN POSTCOSECHA**

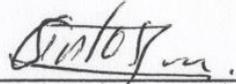
Tesis realizada por Mitzy Nayeli Estrada Ramírez, bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR: 
DR. SALVADOR VALLE ELGUARRAMA

CO-DIRECTOR: 
DR. ELEAZAR AGUIRRE MANDUJANO

ASESOR: 
DR. MARCELO ACOSTA RAMOS

ASESOR: 
M.C. ARMANDO SANTOS MORENO

DEDICATORIA

A mis padres y a mis hermanos, por el incondicional apoyo, la paciencia y los sabios consejos que me han conducido hasta aquí.

¡LEHAIM!

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de Posgrado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por el apoyo otorgado en el marco de becas para tesis de posgrado 2016.

A la Universidad Autónoma Chapingo, al Departamento de Ingeniería Agroindustrial, al Departamento de Parasitología Agrícola y al Departamento de Preparatoria Agrícola por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

Al Dr. Salvador Valle Guadarrama por la dirección, la confianza y la paciencia para la realización de este proyecto.

Al Dr. Eleazar Aguirre Mandujano, al Dr. Marcelo Acosta Ramos y al M.C. Armando Santos Moreno por sus valiosas aportaciones.

Al señor José, a Angy y a la señora Araceli quienes muy amablemente me facilitaron materiales para llevar a cabo la parte experimental de este proyecto.

A Olivia, Karla y Linda por su amistad, comprensión y cariño que hicieron muy amena esta etapa de mi vida, pero muy especialmente a Ceci, quien me ha enseñado tanto con la fortaleza, entereza y perseverancia que la caracteriza.

DATOS BIOGRÁFICOS

Mitzy Nayeli Estrada Ramírez, nació el 22 de junio de 1990 en Ecatepec, Estado de México. Realizó sus estudios de licenciatura en la Universidad Politécnica de Pachuca obteniendo el grado de Ingeniero en Biotecnología en el año 2012 con la tesis denominada “Producción de biofertilizante a partir de lombricomposteo tradicional y lombricomposteo con lixiviado de digestor anaerobio”.

Posteriormente se dedicó a la producción y comercialización de hongo seta durante el periodo de 2013-2014.

RECUBRIMIENTOS POLIMÉRICOS APLICADOS A *Pleurotus ostreatus* PARA SU CONSERVACIÓN EN POSTCOSECHA¹

RESUMEN GENERAL

El alto valor nutricional y terapéutico del hongo seta (*Pleurotus ostreatus*) ha favorecido el incremento de su producción y consumo en los últimos años; sin embargo, su alta perecibilidad requiere de técnicas de conservación que incrementen su vida útil. En el presente trabajo se desarrollaron emulsiones basadas en quitosano (Q), ácido oleico (AO) y aceite esencial de tomillo (AET), para evaluar el efecto de su aplicación como recubrimiento sobre la vida de anaquel de hongo seta en postcosecha. Las emulsiones mostraron comportamiento viscoso con resistencia a la deformación que se redujo conforme aumentó la velocidad de cizallamiento. La presencia de AO afectó la estabilidad de las emulsiones al generar un mayor tamaño de partícula. Las emulsiones se vaciaron en superficies sólidas y formaron películas cuya permeabilidad a vapor de agua y espesor mostraron dependencia con la presencia de AO. La presencia de Q y AET mostró capacidad para reducir la actividad microbiana, pero esta propiedad fue suprimida por la presencia de AO. La aplicación de recubrimientos sobre hongo seta y el manejo en condiciones de 4 °C causó reducción de la pérdida de peso, redujo significativamente el crecimiento microbiano, mantuvo la luminosidad del producto y permitió el alargamiento de la vida de anaquel a 21 d.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, quitosano, ácido oleico, aceite esencial de tomillo, postcosecha.

Tesis de Maestría en Ciencias, Programa de Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Mitzy Nayeli Estrada Ramírez
Director: Salvador Valle Guadarrama

POLYMERIC COATINGS APPLIED TO *Pleurotus ostreatus* FOR POSTHARVEST PRESERVATION²

GENERAL ABSTRACT

The high nutritional and therapeutic value of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* has allowed increasing its production and consumption in recent years; however, due to high perishability conservation techniques are required in order to increase shelf life. In the present work emulsions based on chitosan (Q), oleic acid (OA), and thyme essential oil (TEO) were developed to assess the effect of their application as a coating on the shelf life of oyster mushroom in postharvest. Emulsions showed viscous behavior with resistance to deformation that diminished as shear rate was increased. The presence of OA affected the stability of emulsions, since a larger particle size was caused with presence of such compound. The emulsions were cast on solid surfaces and formed films whose permeability to water vapor and thickness showed dependence with OA presence. The use of Q and TEO showed ability to reduce microbial activity, but this property was suppressed by the presence of OA. When coatings of Q-OA-TEO were applied on oyster mushroom slices at 4 °C the weight loss and the microbial growth were significantly reduced, the product lightness was preserved, and shelf life was lengthened to 21 d.

Key words: *Pleurotus ostreatus*, chitosan, oleic acid, thyme essential oil, postharvest.

Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Mitzy Nayeli Estrada Ramírez
Advisor: Salvador Valle Guadarrama

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. JUSTIFICACIÓN.....	4
3. OBJETIVOS.....	6
3.1 Objetivo general	6
3.2 Objetivos específicos	6
4. REVISIÓN DE LITERATURA	7
4.1 Generalidades de los hongos comestibles	7
4.1.1 <i>Pleurotus ostreatus</i> : Origen y distribución	7
4.1.2 Morfología.....	8
4.2 Composición bromatológica y química	8
4.3 Desarrollo e índices de cosecha	10
4.4 Comportamiento postcosecha del hongo seta	10
4.5 Comercialización en fresco y en forma procesada.....	13
4.6 Técnicas de manejo postcosecha del hongo seta.....	13
4.7 Significado y propiedades funcionales de los recubrimientos	16
4.8 Composición de un recubrimiento comestible	16
4.9 Formación de recubrimientos comestibles	20
4.9.1 Emulsiones	20
4.9.2 Estabilidad de una emulsión	21
4.10 Caracterización de emulsiones para desarrollar recubrimientos y películas.....	22
4.10.1 Distribución del tamaño de partícula.....	23
4.10.2 Comportamiento de flujo.....	24

4.11 Caracterización de películas comestibles.....	25
4.11.1 Evaluación de la permeabilidad a vapor de agua (PVA).....	25
4.11.2 Propiedades mecánicas.....	26
5. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE EMULSIONES DE QUITOSANO, ÁCIDO OLEICO Y ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO	27
5.1 Resumen.....	27
5.2 Abstract	28
5.3 Introducción.....	29
5.4 Materiales y métodos	30
5.4.1 Materiales	30
5.4.2 Formulación y preparación de las emulsiones.....	30
5.4.3 Caracterización de emulsiones.....	31
5.4.4 Preparación y caracterización de las películas comestibles	32
5.4.5 Análisis estadístico	34
5.5 Resultados y discusión.....	35
5.5.1 Color	35
5.5.2 Tamaño y distribución de las partículas de las emulsiones	36
5.5.3 Comportamiento de flujo de las emulsiones	38
5.5.4 Espesor y propiedades mecánicas de las películas comestibles.....	39
5.5.5 Permeabilidad a vapor de agua de las películas	41
5.6 Conclusiones.....	42
6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO SOLO Y COMBINADO CON ÁCIDO OLEICO Y QUITOSANO	44
6.1 Resumen.....	44
6.2 Abstract	45
6.3 Introducción.....	46
6.4 Materiales y métodos	47
6.4.1 Materiales	47
6.4.2 Aislamiento de microorganismos	47
6.4.3 Pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI)	47
6.4.4 Análisis estadístico	48

6.5 Resultados y discusión.....	49
6.6 Conclusiones.....	54
7. APLICACIÓN DEL RECUBRIMIENTO COMESTIBLE Y EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO POSTCOSECHA DEL HONGO <i>PLEUROTUS</i> <i>OSTREATUS</i>	55
7.1 Resumen.....	55
7.2 Abstract	56
7.3 Introducción.....	57
7.4 Materiales y métodos	58
7.4.1 Material vegetal	58
7.4.2 Manejo postcosecha de hongo seta	58
7.4.3 Evaluación de parámetros fisicoquímicos del hongo seta	59
7.4.4 Evaluación microbiológica	61
7.4.5 Análisis estadístico	61
7.5 Resultados y discusión.....	61
7.5.1 Pérdida de peso.....	61
7.5.2 Acidez titulable.....	64
7.5.3 Sólidos solubles totales	65
7.5.4 pH	66
7.5.5 Azúcares totales	70
7.5.6 Metabolitos totales	72
7.5.7 Respiración.....	75
7.5.8 Microorganismos mesófilos aerobios.....	77
7.5.9 Color	79
7.6 Conclusiones.....	86
8. LITERATURA CITADA	88

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición proximal de <i>Pleurotus ostreatus</i>	9
Cuadro 2. Índice de madurez para hongos comunes basado en la abertura del estípite.	10
Cuadro 3. Componentes principales del aceite esencial de Tomillo (AET).....	20
Cuadro 4. Mecanismos de desestabilización de emulsiones.....	22
Cuadro 5. Formulaciones de emulsiones aceite en agua con quitosano, aceite esencial de tomillo y distintas concentraciones de ácido oleico.....	31
Cuadro 6. Valores de los parámetros de color: Luminosidad (L^*), ángulo de tono (hue) y saturación de color (croma) de emulsiones de quitosano, aceite esencial de tomillo y ácido oleico.....	35
Cuadro 7. Diámetro superficial de las gotas en las emulsiones.....	37
Cuadro 8. Espesor, permeabilidad a vapor de agua (PVA), resistencia a la tensión (ET) y capacidad de elongación de películas comestibles formuladas a base de quitosano, ácido oleico y aceite esencial de tomillo.	40
Cuadro 9. Valores percentiles de la distribución de Fisher ($F_{0.05}$) con ($\alpha = 0.05$) y valores F correspondientes al análisis de varianza (Fanova) de la evaluación del efecto inhibitorio (EI) de emulsiones preparadas a base de aceite esencial de tomillo (Tom), quitosano (Qui) y ácido oleico (Ole) aplicadas sobre hongo seta (<i>Pleurotus ostreatus</i>).....	49
Cuadro 10. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la concentración de aceite esencial de tomillo (AET), la presencia de quitosano y la presencia de ácido oleico, sobre el desarrollo de unidades formadoras de colonia por mililitro ($UFC\ mL^{-1}$) en hongo seta.....	50
Cuadro 11. Valores percentiles de la distribución de Fisher ($F_{0.05}$) con ($\alpha=0.05$) y valores de F correspondientes al análisis de varianza de la aplicación de recubrimientos de quitosano, ácido oleico y aceite esencial de tomillo sobre hongo seta (<i>Pleurotus ostreatus</i>).....	62

Cuadro 12. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura y los recubrimientos comestibles sobre la pérdida de peso en hongo seta.	63
Cuadro 13. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre la acidez titulable en hongo seta.....	67
Cuadro 14. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre los sólidos solubles totales en hongo seta.	68
Cuadro 15. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre el pH en hongo seta.....	69
Cuadro 16. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre los azúcares totales en hongo seta.	72
Cuadro 17. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre los metabolitos totales en hongo seta.	73
Cuadro 18. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre la respiración en hongo seta.....	76
Cuadro 19. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre las UFC mL-1 de microorganismos mesófilos aerobios en hongo seta.....	80
Cuadro 20. Valores percentiles de la distribución de Fisher (F0.05) con ($\alpha=0.05$) y valores de F correspondientes al análisis de varianza de los parámetros de color correspondientes a la aplicación de recubrimientos de quitosano, ácido oleico y aceite esencial de tomillo sobre hongo seta (<i>Pleurotus ostreatus</i>).	81
Cuadro 21. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre las variables de color en hongo seta.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del quitosano (Nordby et al., 2003).....	18
Figura 2. Distribución del tamaño de partícula de emulsiones aceite en agua estabilizadas con proteína de suero.....	24
Figura 3. Curva típica de viscosidad-tasa de corte para un polímero que exhibe comportamiento de adelgazamiento al corte (Aho et al. 2015).....	25
Figura 4. Apariencia de emulsiones preparadas:.....	36
Figura 5. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones..	38
Figura 6. Cambios en la viscosidad aparente en función de la tasa de corte de las emulsiones..	40
Figura 7. Efecto de la concentración de aceite esencial de tomillo en cuatro condiciones de tratamiento definidas como quitosano ausente y ácido oleico ausente (Qn-Ln), quitosano ausente y ácido oleico presente (Qn-Ls), quitosano presente y ácido oleico ausente (Qs-Ln), y quitosano ausente con ácido oleico presente (Qs-Ls).....	51
Figura 8. Efecto de la concentración de aceite esencial de tomillo en cuatro combinaciones de tratamientos.	52
Figura 9. Efecto de la aplicación de recubrimientos sobre la pérdida de peso en hongo seta.	65
Figura 10. Acidez titulable en hongo seta almacenado a 20 y 4°C.....	66
Figura 11. Variación del pH en hongo seta almacenado a 20 y 4°C.....	71
Figura 12. Variación de la concentración de azúcares totales en hongo seta almacenado a 20 y 4°C.....	71
Figura 13. Variación de los metabolitos totales en hongo seta almacenado a 20 y 4°C.....	74
Figura 14. Comportamiento de la tasa respiratoria en hongo seta almacenado a 20 y 4°C..	77

Figura 15. Microorganismos mesófilos aerobios en hongo seta almacenado a 20 y 4°C. 81

Figura 16. Luminosidad (A), hue (B) y croma (C) en hongo seta almacenado a 20 y 4°C. 84

Figura 17. Evolución de la apariencia del hongo seta a 20 y 4 °C.....85

1. INTRODUCCIÓN

En México, el cultivo de *Pleurotus ostreatus* ha adquirido mayor relevancia social y económica debido a que su consumo representa una buena fuente de proteínas, fibras, vitaminas y varios compuestos polifenólicos que además poseen propiedades medicinales (Martínez-Carrera, Curvetto, Sobal, Morales & Mora, 2010; Mishra *et al.*, 2013). En todo América, incluidos Canadá y Estados Unidos, México es el principal productor de setas con una producción comercial estimada de 2229 t (SAGARPA, 2015). Actualmente, estos hongos son cultivados en 21 estados de la República, donde los principales productores se concentran en Hidalgo, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Morelos, Puebla, Querétaro y Tlaxcala (Martínez-Carrera, 2012).

Los hongos están entre los productos más perecederos y su tiempo de vida útil se limita a un máximo de 3 d a temperatura ambiente, debido a que poseen alto contenido de agua y elevada tasa respiratoria que los hace susceptibles a ataque microbiológico, a reacciones de pardeamiento enzimático y a daño mecánico, características que representan inconvenientes en la distribución y comercialización del producto fresco (Fernandes, Antonio, Oliveira, Martins & Ferreira, 2012; Jiang, Jahangir, Jiang, Lu & Yinhg, 2010). Por ello, en las últimas décadas se han desarrollado diferentes métodos para extender el tiempo de vida útil del hongo seta. Una de las técnicas más comunes de conservación es el almacenamiento bajo condiciones de refrigeración (Akbarirad, Kazemeini, & Shariaty, 2013). Asimismo, se ha reportado el uso de empaque en atmósfera modificada, en conjunto con la inmersión en sustancias inhibitoras de oscurecimiento como la impregnación a vacío de ácido cítrico y ascórbico que demostró que puede incrementar en un 12.5 % el tiempo de vida

de *Pleurotus ostreatus* (Ruíz, Cortés & Henríquez, 2010; Ventura-Aguilar, Colinas-Leon, Martínez-Damian & Valle-Guadarrama, 2011). Sin embargo, el uso de películas plásticas como polietileno de baja densidad o cloruro de polivinilo ha presentado algunas limitaciones, ya que puede promover la pérdida de agua, lo que resulta en cambios en la textura o bien puede aumentar la formación de condensados de agua que favorecen la proliferación microbológica (Rojas-Grau, Tapia, Rodríguez, Carmona & Martín-Belloso, 2007).

Actualmente, la aplicación de recubrimientos y películas comestibles se ha convertido en una técnica prometedora para mantener las propiedades nutricionales y organolépticas de los productos frescos. Su uso ha sido probado para retener la calidad y extender la vida útil de algunas frutas y verduras como cítricos, manzanas, peras y tomates (Jiang, Feng & Zheng, 2012a; Villalobos-Carvajal, Hernández-Muñoz & Chiralt, 2009). Pocos estudios se han llevado a cabo para preservar la calidad del hongo seta a través del uso de recubrimientos poliméricos. Recientemente, Lozano-Grande (2014) reportó el uso de recubrimientos formulados a base de pectina de tejocote y cera de candelilla, prolongando la vida útil del hongo por 20 d. En otras especies de hongos como *Agaricus bisporus* y *Lentinus edodes* se ha reportado el uso de gomas, derivados de celulosa, alginatos y quitosano, en combinación con aceites esenciales, para mejorar las propiedades antimicrobianas y antioxidantes de las películas (Jiang, Feng & Li, 2012b; Jiang, Feng, & Wang, 2013a).

Los recubrimientos comestibles se obtienen de fuentes renovables, incluyendo lípidos, polisacáridos y proteínas. Su principal función es actuar como barrera al intercambio de gases, aromas y sabores en un sistema alimentario. Sin embargo, algunos materiales son altamente permeables al vapor de agua, lo cual puede causar altas pérdidas de humedad en el producto y por ello actualmente se desarrollan formulaciones con la mezcla de compuestos

hidrofílicos y lipofílicos para mejorar las propiedades de barrera (Lin & Zhao, 2007).

El quitosano es el segundo polímero natural más abundante y debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, capacidad antibacteriana y a sus propiedades mecánicas y de selectividad a la permeación de gases (CO₂ y O₂) ha sido utilizado ampliamente como aditivo alimenticio y en la formulación de películas y recubrimientos comestibles (Elsabee & Abdou, 2013). Sin embargo, las películas de quitosano, debido a su naturaleza hidrofílica, son pobres barreras a la transferencia de humedad, lo cual limita su uso (Pereda, Amica & Marcovich, 2012).

Con la finalidad de mejorar las propiedades de barrera de las películas y recubrimientos comestibles, se han utilizado distintos compuestos hidrofóbicos como lípidos, ácidos grasos saturados e insaturados, entre otros (Perdones, Vargas, Atares & Chiralt, 2014; Vargas, Albors, Chiralt & González-Martínez, 2009). Además, se han incorporado ingredientes activos tales como antioxidantes, pigmentos, nutrientes y antimicrobianos. Entre estos últimos se encuentran los aceites esenciales, que representan una alternativa al uso de sustancias químicas, los cuales, además, han demostrado ser prometedores en la reducción de enfermedades durante el manejo postcosecha de los cultivos hortícolas (Gao, Feng & Jiang, 2014; Leceta, Guerrero, Ibarburu, Dueñas & De la Caba, 2013).

En tal contexto, el presente trabajo se planteó con el objetivo de desarrollar recubrimientos poliméricos hechos a base de quitosano y ácido oleico, enriquecidos con aceite esencial de tomillo, para mantener la calidad y favorecer el alargamiento de la vida útil del hongo *Pleurotus ostreatus* en postcosecha.

2. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de hongos comestibles es quizá el único proceso actual que combina la producción de un alimento rico en nutrientes con la reducción de la contaminación ambiental, ya que su cultivo implica el aprovechamiento de residuos agropecuarios, lo cual permite apreciar de manera directa su impacto ecológico, social y económico (Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

En México, *Pleurotus ostreatus* es el segundo hongo comestible más cultivado y se ha destacado por una rápida aceptación en el mercado (Sánchez, 2010). Sin embargo, su alto contenido de humedad (87-93 %), así como su estructura epidérmica delgada y porosa, favorecen su rápida descomposición después de ser cosechado (Cortés, Ruiz & Henríquez, 2011). A temperatura ambiente, después de un día de almacenamiento, el hongo presenta abertura del sombrero, coloración amarillenta, elongación del estípite y textura que se vuelve suave y esponjosa, dando como resultado inconvenientes para la distribución y comercialización del producto fresco (Fernandes *et al.*, 2012; Guillaume, Schwab, Gastaldi & Gontard, 2010).

La refrigeración es la técnica más común de conservación de productos hortofrutícolas, ya que no sólo reduce la tasa de respiración, sino que, además, induce reducción significativa de la actividad enzimática; sin embargo, en casos donde la refrigeración no está disponible, ya sea por falta de infraestructura o porque esta técnica no siempre es apropiada a las tendencias del mercado y de los consumidores que generalmente adquieren el producto a temperatura ambiente, es necesario complementarla con distintas alternativas (Guillaume *et al.*, 2010). Por lo tanto, la solución para extender el tiempo de vida útil de los productos altamente perecederos, los hongos entre ellos, constituye un reto

científico y económico que puede ser menguado cuando la refrigeración se combina con otras técnicas como la utilización de recubrimientos poliméricos o películas comestibles, que representan una alternativa importante para reducir la acelerada pérdida de calidad.

A pesar de la amplia utilización de las películas y recubrimientos comestibles, aquéllas que son formuladas con quitosano como matriz estructural presentan una desventaja considerable al tener pobres propiedades de barrera al vapor de agua, lo cual disminuye su acción como medio de protección. Esto puede ser mejorado si se incluyen diferentes componentes no polares como los ácidos grasos saturados e insaturados, así como aceites esenciales (Fabra, Jiménez, Atarés, Talens & Chiral, 2009; Gao *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2009). En este sentido, el uso de aceites esenciales en la formulación de los recubrimientos no sólo puede reducir la permeabilidad al vapor de agua, sino que también beneficia a los consumidores en aspectos de seguridad al sustituir aditivos químicos. Recientemente, el aceite de tomillo ha ganado cada vez más el interés de los investigadores y de la industria agroalimentaria como un aditivo con potencial antimicrobiano y antioxidante (Jiang *et al.*, 2012a).

Por lo anterior, al combinar el quitosano con ácido oleico y aceite esencial de tomillo para formular un recubrimiento, se pretende que las propiedades de barrera se vean favorecidas y ayuden a prolongar el almacenamiento postcosecha del hongo seta, preservando al mismo tiempo su calidad y de esta forma beneficiando a la industria de los hongos, así como a los consumidores.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Elaborar y caracterizar un recubrimiento comestible hecho a base de quitosano, ácido oleico y aceite esencial de tomillo, para prolongar el tiempo de vida útil del hongo *Pleurotus ostreatus*.

3.2 Objetivos específicos

- Establecer la formulación y el método de elaboración de emulsiones aceite en agua (O/W) a partir de quitosano, ácido oleico y aceite de tomillo.
- Determinar las propiedades reológicas y la distribución del tamaño de partícula de las emulsiones O/W.
- Establecer la formulación y el método de preparación de las películas comestibles a partir de las emulsiones desarrolladas.
- Determinar las propiedades físicas (espesor y color), mecánicas (fuerza de tensión y elongación) y permeabilidad al vapor de agua de las películas comestibles.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de tomillo, para evaluar su capacidad bacteriostática.
- Evaluar el comportamiento postcosecha del hongo *Pleurotus ostreatus* recubierto con un material formulado a base de quitosano, ácido oleico y aceite esencial de tomillo.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Generalidades de los hongos comestibles

Los hongos se encuentran clasificados dentro del reino Fungi que incluye tanto organismos unicelulares como pluricelulares, constituido por un 90 % de hongos inferiores conocidos como mohos y el 10 % restante perteneciente a los hongos macroscópicos o macromicetos que tienen la capacidad de producir cuerpos fructíferos comestibles (Naranjo & Herrera, 2000). La producción y el consumo de hongos comestibles han registrado un aumento considerable en las últimas décadas. Los tres hongos más cultivados a nivel mundial son *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes* y *Pleurotus spp.* Su popularidad se ha incrementado debido a su fácil cultivo, los altos rendimientos y a su alto valor nutricional y medicinal (Mishra *et al.*, 2013).

4.1.1 *Pleurotus ostreatus*: Origen y distribución

Los hongos ostra pertenecen al género *Pleurotus* (Quel.) Fr. del cual se han identificado al menos 70 especies, entre las que se destacan: *P. sajor-caju*, *P. cystidiosus*, *P. eryngii*, *P.tuber-regium*, *P. pulmonarius*, *P. citrinopileatus/P. cornucopiae*, and *P. djamor/P. flabellatus* Este género se incluyó por primera vez dentro del género *Agaricus* por Fries en 1821, pero fue propuesto como un género separado por Quelet en 1886. *Pleurotus ostreatus* (Jacq: Fr.) es la especie más cultivada del género *Pleurotus*. Se distribuye naturalmente en las zonas templadas del hemisferio norte, como Europa, norte de África, Asia y América del Norte, ya que forma cuerpos fructíferos a temperatura relativamente baja en comparación con otras especies de *Pleurotus* (Shukla & Jaitly, 2011). Es un hongo que crece en el suelo, en troncos o sobre desechos agrícolas o agroindustriales que están constituidos principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (Boa, 2005). Respecto a su cultivo de manera comercial,

esta especie ha sido ampliamente cultivada en todo el mundo debido a que las tecnologías de producción son relativamente sencillas y de bajo nivel de inversión. Además, se han desarrollado cepas comerciales con amplio rango de temperaturas de fructificación y sustratos de cultivo, así como por sus propiedades nutricionales y medicinales (Gaitán-Hernández, Salmones, Pérez-Merlo & Mata, 2006; Martínez-Carrera *et al.*, 2010).

4.1.2 Morfología

Los hongos se componen de hilos finos conocidos como hifas las cuales en conjunto forman el micelio. Las hifas especializadas producen esporas que se dispersan de distintas maneras. Una hifa madura forma fructificaciones, que en la mayoría de los casos sobresale de la superficie del sustrato. Estas fructificaciones se componen de dos partes básicas: el píleo y el estípite o sombrero que pueden tomar varias formas, tamaños y colores (Ares, Lareo & Lema, 2007). *Pleurotus ostreatus* es un hongo típico, que a menudo se encuentra recubierto de una capa micelial en la base y presenta carne delgada y blanca, el píleo, regularmente en forma de ostra u oreja, mide de 4 a 13 cm de diámetro, aunque puede presentar tamaños mayores de acuerdo a las condiciones de fructificación. La tonalidad de su sombrero puede adoptar tonos grises, blanco aperlado o pardo, sus laminillas son blancas, delgadas y de bordes lisos (Naranjo & Herrera, 2000).

4.2 Composición bromatológica y química

Las setas se caracterizan por ser una buena fuente de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. También es posible encontrar compuestos biológicamente activos reconocidos como excelentes antioxidantes y con la capacidad de modular el sistema inmune, inhibir el crecimiento de tumores, prevenir la alta presión sanguínea y con actividad hipoglucémica y antitrombótica (Fernandes *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2013). Sin embargo, es importante mencionar que existe una gran variación en la composición química del hongo seta, lo que se debe a las diferentes condiciones que se presentan

durante su cultivo, es decir, a la calidad del sustrato, la humedad, la temperatura de crecimiento y desarrollo del cuerpo fructífero, como también a las condiciones postcosecha, incluyendo el almacenamiento y el procesamiento (Papayspiridi, Aliggianis, Christakopoulos, Skaltsounis & Fokialakis, 2010). En el Cuadro (1) se muestran datos representativos de la composición química de distintas cepas de *Pleurotus ostreatus*.

Cuadro 1. Composición proximal de *Pleurotus ostreatus*.

	Jaworska et al 2011	Beluhan y Ranogajec 2011	USDA 2010	Chirinang e Intarapichet 2009	Obodai y Apertorgbor 2008	Bonnati et al 2004
Materia seca	8.8	11.7	10.8	-	9.1	11.9- 14.4
Carbohidratos	70.9	61.9	56.3	78.0	70.4	71.2- 74.5
Proteína	16.7	24.9	30.6	15.3	20.0	13.1- 16.9
Fibra dietética total	-	-	21.3	47.6	-	-
Lípidos	5.5	2.1	3.8	0.6	2.0	6.0-6.3
Cenizas	6.7	7.6	9.3	6.1	7.6	5.6-6.1

Fuente: OECD, 2013.

En general los hongos tienen proteínas de buena calidad junto con lisina y triptófano. Los hidratos de carbono se encuentran en la forma de glucógeno, quitina y de hemicelulosa en lugar de almidón. El nivel de grasa que contienen es bajo y es rico en ácido linoleico, un ácido graso esencial. Por otra parte, las setas son muy buena fuente de vitamina C y vitaminas del complejo B, especialmente tiamina, riboflavina, niacina y biotina. El ácido fólico y la vitamina B₁₂, que están ausentes en la mayoría de las verduras, están presentes en los hongos de este tipo, además de que también suministran una gama de minerales valiosos, especialmente potasio y hierro (Mishra *et al.*, 2013).

4.3 Desarrollo e índices de cosecha

Existen varios índices para determinar la calidad de los hongos tales como la blancura, la abertura del píleo, elongación del estípite, textura y deterioro microbiológico (Kim, Ko, Lee, Park & Hanna, 2006). Uno de los aspectos más importantes para preservar la calidad de los hongos es el momento adecuado para su recolección. Una vez que el sombrero de los hongos adultos tenga cierto grado de madurez en función de la turgencia y antes de que sus orillas se enrollen hacia arriba estarán listos para cosecharse (Gaitán- Hernández *et al.*, 2006). Adicionalmente, se han desarrollado índices de cosecha basados en la abertura del sombrero, clasificándolos en una escala de siete puntos (Cuadro 2), que van desde una cubierta apretada hasta una completamente abierta (Ares *et al.*, 2007).

Cuadro 2. Índice de madurez para hongos comunes basado en la abertura del estípite.

Escala	Descripción
1	Velo o cubierta apretada
2	Velo o cubierta intacta
3	Velo o cubierta parcialmente rota
4	Velo o cubierta rota
5	Velo completamente roto
6	Sombrero abierto y branquias desarrolladas
7	Sombrero y branquias completamente abiertas

Fuente: Ares *et al.*, 2007.

4.4 Comportamiento postcosecha del hongo seta

Debido a la estructura epidérmica delgada y porosa, así como a la alta tasa de respiración, el hongo seta es altamente perecedero y tiende a deteriorarse justo después de ser cosechado. Su tiempo de vida útil es inferior a 3 d a temperatura ambiente y de 4-7 d a 4 °C (Jafri, Jha & Bunkar, 2013; Oliveira,

Sousa-Gallagher, Mahajan & Texeira, 2012). Los principales cambios que ocurren después de la cosecha y que contribuyen a la pérdida de calidad de las setas son (i) cambios de color, (ii) la pérdida de peso, (iii) cambios en la textura y (iv) cambios morfológicos (Akbarirad *et al.*, 2013).

4.4.1 Cambios de color

El oscurecimiento enzimático es una reacción indeseable en la mayoría de las frutas y hortalizas que provoca el oscurecimiento de los tejidos. Los factores más importantes que determinan la velocidad de esta reacción son la concentración de la enzima polifenoloxidasa, pH, temperatura, actividad de agua y disponibilidad de oxígeno (Cortés *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2014). La polifenoloxidasa, presente en el estípite y píleo de los hongos, es una enzima que contiene cobre, el cual cataliza dos diferentes reacciones: la hidroxilación de monofenoles a compuestos *o*-dihidroxiados y la oxidación de fenoles *o*-dihidroxiados a *o*-quinonas, las cuales producen pigmentos de melanina marrón, que confieren a los hongos una apariencia menos atractiva, además de pérdidas en la calidad nutricional (Fernandes *et al.*, 2012; Saboury, 2009). Por otro lado, la presencia de altas poblaciones de bacterias genera lesiones de color marrón. La velocidad de deterioro de los hongos frescos está relacionada directamente con la carga microbiana inicial. *Pseudomonas tolaasii* es considerada como un constituyente normal en la microflora de los hongos, produce un metabolito tóxico bajo ciertas condiciones, que provoca daños en los hongos (Simón, González-Fandos & Vázquez, 2010). Otras bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas fluorescens* y levaduras como *Candida sake* también afectan la calidad de los hongos. Los mohos como *Verticillium maltousei* provocan puntos café sobre el sombrero de los cuerpos fructíferos (Beaulieu, D'Aprano & Lacroix, 2002; Jiang *et al.*, 2012b).

4.4.2 Pérdida de peso

Los hongos carecen de una estructura epidérmica especializada, por lo cual experimentan una rápida deshidratación superficial, sobre todo considerando

que el 90 % del peso de las setas es agua (Mehta, Jain, Sharma, Doshi & Jain, 2011). Esta deshidratación causa importantes pérdidas económicas para los productores y también influye en la velocidad de deterioro del hongo. Este proceso depende de la temperatura, la humedad relativa circundante y del aumento de la tasa de respiración y da como resultado la pérdida de agua que incide directamente en la pérdida de peso (Fernandes *et al.*, 2012). Después de ser cosechados los hongos mantienen su actividad metabólica. La respiración es un proceso metabólico por el cual los carbohidratos, lípidos y ácidos orgánicos se degradan a moléculas más simples como CO₂ y agua. En el caso de los hongos, la velocidad de respiración es un factor determinante en la velocidad de deterioro. Los hongos muestran altas tasas respiratorias comparadas con otras frutas y hortalizas. La velocidad de respiración de hongos frescos varía de 17.8 a 178 CO₂ kg⁻¹ s⁻¹ (Ares *et al.*, 2007). Pocos estudios se han reportado sobre la tasa respiratoria de *Pleurotus spp*, Ventura-Aguilar *et al.* (2011) reportó valores de 97.07-101.22 mL CO₂ kg⁻¹ s⁻¹ en *Pleurotus ostreatus* envasado en bolsas de polietileno.

4.4.3 Cambios morfológicos y de textura

Entre los principales cambios asociados al deterioro de las setas están los cambios en la textura, el ablandamiento de los hongos o la pérdida de firmeza, que está directamente relacionada con cambios en la membrana. También se ha relacionado con la degradación de proteínas y polisacáridos y con la disrupción de la vacuola central (Ares *et al.*, 2007). Varios factores como el tratamiento térmico, el almacenamiento en diferentes intervalos de pH y los daños mecánicos producidos por el manejo rudo deterioran la textura de los hongos (Jiang *et al.*, 2010). Además, como consecuencia de la actividad metabólica se presentan cambios morfológicos en las setas, entre los que sobresalen la abertura del sombrero y la elongación del tallo, aspectos que deprecian el valor comercial (Guillaume *et al.*, 2010).

4.5 Comercialización en fresco y en forma procesada

Una vez cosechados, los hongos se pueden consumir, comercializar en fresco o almacenar. Singh, Langowski y Wanib (2010) mencionan que sólo alrededor del 45 % de los hongos producidos se consumen en forma fresca y el 55 % restante se procesa (5 % en forma deshidratada y el 50 % en lata), ya que su vida útil en fresco es muy corta. En años recientes, la tendencia dominante en el procesamiento moderno de alimentos ha estado encaminada hacia los alimentos “listos para cocinar” y “listos para comer”. En este sentido, se ofrecen al consumidor presentaciones de hongos en rodajas contenidas en bandejas envueltas con una película estirable perforada con poca o ninguna modificación de la atmósfera (Jaworska, Bernas & Mickowska, 2011; Oliveira *et al.*, 2012).

En México, las setas representan el 4.86% de la producción nacional de hongos frescos y son producidos a pequeña y gran escala. Martínez-Carrera (2012) menciona que del año 2000 al 2011 se incrementó en 9.8% el consumo de los hongos comestibles en la región central del país registrando un consumo de 600 gramos de hongos por persona, al año, con una tendencia a incrementarse de manera consistente. Sin embargo, si el objetivo es la comercialización en fresco, una tecnología de procesamiento es fundamental, ya que las setas sufren un rápido deterioro postcosecha a temperatura ambiente. Una práctica muy común para la venta en fresco de los hongos, es el lavado de los mismos, con el fin de remover impurezas en su superficie y reducir el contenido de fenoles solubles. Sin embargo, este tratamiento deteriora más rápidamente a las setas, debido a la acción de bacterias durante el almacenamiento (Gaitán-Hernández *et al.*, 2006).

4.6 Técnicas de manejo postcosecha del hongo seta

Hoy en día, el estilo de vida, un mayor poder de compra, y los consumidores cada vez más conscientes de la salud han hecho subir la demanda de frutas y vegetales mínimamente procesados. El procesamiento de estos productos implica pelar, cortar, rallar y rebanar. Sin embargo, estas operaciones podrían causar daño celular en los tejidos, produciendo trastornos bioquímicos y

fisiológicos y promover el crecimiento microbiano, lo que acorta la vida útil del producto en comparación con el producto fresco (Kim *et al.*, 2006). Es por ello que las técnicas del manejo postcosecha del hongo seta son necesarias para poder extender el tiempo de vida útil del producto.

4.6.1 Refrigeración

La temperatura es el factor ambiental más importante en la vida postcosecha de los productos frescos y, cuando disminuye su nivel, causa una reducción en la velocidad de las reacciones bioquímicas y consecuentemente un aumento de la vida útil (Oliveira *et al.*, 2012). La refrigeración es una de las medidas más comunes para estos fines, cuando la temperatura se mantiene entre 0-4 °C la tasa de respiración, el pardeamiento, la deshidratación y el crecimiento microbiano en el hongo seta se reduce considerablemente. Sin embargo, se ha reportado que después de 9 d a 3 °C las cuentas microbianas pueden superar los 9 log de UFC g⁻¹ (Simón *et al.*, 2010). Por ello la necesidad de combinar técnicas que proporcionen tiempos más factibles de conservación.

4.6.2 Atmosferas modificadas

Otra alternativa para extender la vida útil durante el almacenamiento postcosecha corresponde a las atmósferas modificadas, las cuales consisten en recluir a los hongos en una atmósfera esencialmente empobrecida en O₂, entre el 2 y el 8 %, y enriquecida en CO₂ entre el 5 y 15 % con respecto al aire respirable. La inyección de mezclas conocidas de gases (O₂, CO₂, CO y N₂) o la generación interna de atmósferas por parte de la interacción producto-envase prolonga generalmente la vida útil. Al disminuir la concentración de O₂ se inhiben o reducen las reacciones enzimáticas de pardeamiento, disminuye la tasa de respiración y consecuentemente el agotamiento de la seta (Ares *et al.*, 2007; Simón & González-Fandos, 2011). El empaque en atmósfera modificada ha sido utilizado en combinación con distintos tratamientos químicos para prolongar la vida útil de hongos comestibles. Ruíz *et al.* (2010) reportan el uso de una solución conservante a base de ácido cítrico, ascórbico, pectina y calcio junto con el almacenamiento en una atmósfera de 10 % de O₂, 10 % CO₂ y 80

% N₂, alcanzando un incremento de 12.5 % en la vida útil de hongos enteros de *P. ostreatus*. Por otro lado, Jafri *et al.* (2013) lograron retener la calidad del hongo *P. florida* y aumentar su tiempo de vida a 25 d mediante el uso de una solución de 0.05 % de sorbitol, 3 % de ácido cítrico y 1 % de CaCl₂ en combinación con empaque en atmosfera modificada (10 % O₂ y 5 % CO₂).

4.6.3 Recubrimientos poliméricos o películas comestibles

Los recubrimientos o películas comestibles obtenidos de fuentes renovables, incluyendo lípidos, polisacáridos y proteínas, pueden funcionar como barreras al vapor de agua, gases y también como portadores de ingredientes funcionales como agentes antimicrobianos y antioxidantes, mejorando así la calidad y ampliando la vida útil de frutas y vegetales frescos y mínimamente procesados (Lin & Zhao, 2007). Se han aplicado recubrimientos a base de complejos de quitosano-glucosa, quitosano-aceite esencial de tomillo, goma arábica-natamicina y alginato-nanopartículas de plata en el hongo comestible *Lentinus edodes*. En todos los casos, los hongos mantuvieron su firmeza, inhibieron el aumento de la velocidad de respiración y disminuyeron las cuentas microbianas (Jiang *et al.*, 2012a; Jiang *et al.*, 2013a; Jiang, Luo & Ying, 2015). En cuanto al hongo *Agaricus bisporus*, Gao *et al.* (2014) estudiaron el efecto de recubrimientos de aceite esencial de tomillo, clavo y cinamaldehído, sobre el índice de oscurecimiento, la firmeza, la pérdida de peso y las cuentas microbianas, obteniendo efectos positivos en el mejoramiento de la calidad postcosecha de los hongos. Por otro lado, pocos son los estudios que se han llevado a cabo con la aplicación de recubrimientos comestibles al hongo *Pleurotus ostreatus*. Lozano-Grande (2014) reportó el uso de pectina de tejocote y cera de candelilla para la conservación de hongo seta mínimamente procesado bajo almacenamiento en frío, y sus resultados lograron reducir la pérdida de peso, mantener firmeza del tejido y mayor luminosidad, así como prolongar la vida útil del hongo por 20 d.

4.7 Significado y propiedades funcionales de los recubrimientos

Un recubrimiento comestible se define como una matriz continua y delgada, que se estructura alrededor del alimento generalmente mediante la inmersión del mismo en una solución formadora del recubrimiento (Ramos-García, Bautista-Baños & Barrera-Necha, 2010). A menudo suelen emplearse los términos recubrimiento y película comestible indistintamente; sin embargo, ésta última hace referencia a la matriz que se preforma previamente a su utilización en forma de recubrimiento sobre el alimento (Quintero, Falguera & Muñoz, 2010). La principal función de los recubrimientos comestibles es extender la vida útil de los alimentos frescos y mínimamente procesados, mediante la generación de una atmósfera modificada que controla la transferencia de humedad, oxígeno, dióxido de carbono, aroma y sabor en un sistema alimentario (Lin & Zhao, 2007). Además, ofrecen ventajas tales como la comestibilidad, biocompatibilidad, apariencia estética, no toxicidad, no contaminante y su bajo costo. Recientemente se han utilizado como portadores de aditivos alimenticios principalmente de antioxidantes, antimicrobianos, pigmentos, nutrientes y sabores que mejoran aún más la estabilidad, la calidad, funcionalidad y la seguridad de los alimentos (Bonilla, Atarés, Vargas & Chiralt, 2012).

4.8 Composición de un recubrimiento comestible

Los recubrimientos comestibles se componen fundamentalmente de biopolímeros obtenidos de productos y/o subproductos agrícolas (Elsabee & Abdou, 2013). Esta variedad de materiales biológicos incluye lípidos, polisacáridos, y proteínas, solos o en combinaciones que proporcionen una matriz macromolecular con resistencia cohesiva alta. La adición de plastificantes, agentes tensoactivos y emulsificantes proporcionan a los sistemas de recubrimiento una amplia gama de valores funcionales (Bosquez-Molina, 2003; Villalobos-Carbajal *et al.*, 2009). Recientemente, las investigaciones se han enfocado en la elaboración de películas y recubrimientos multicomponentes para explorar las ventajas de la asociación entre matrices estructurales hidrofílicas e hidrofóbicas y con ello mejorar a funcionalidad de los

componentes puros especialmente respecto a sus propiedades de barrera al vapor de agua (Galus & Kadzinska, 2015). Las principales proteínas de origen vegetal empleadas en la obtención de recubrimientos comestibles son la de soya, gluten de trigo y la zeína de maíz, mientras que las proteínas lácteas, el colágeno y la queratina están entre las proteínas de origen animal más frecuentemente utilizadas (Martín-Belloso, Soliva-Fortuny & Baldwin, 2005). Las películas obtenidas a partir de sustancias lipídicas ofrecen buenas propiedades de barrera al vapor de agua, pero son opacas, poco flexibles y frágiles. Los compuestos lipídicos comprenden los ácidos grasos, las ceras, los triacilglicerolos, monoglicéridos acetilados y alcoholes grasos. Estos recubrimientos se han empleado para aportar brillo a frutas y hortalizas, así como para reducir la pérdida de humedad y la tasa de respiración (Martín-Belloso *et al.*, 2005). Los polisacáridos son excelentes materiales para la formación de películas y recubrimientos, ya que presentan buenas propiedades estructurales y mecánicas y, además, por su naturaleza hidrofílica que permite la permeabilidad a los gases, resultan deseables en atmósferas modificadas, aumentando el tiempo de vida del producto sin crear anaerobiosis (Falguera, Quintero, Jiménez, Muñoz & Ibarz, 2011; Martín-Belloso *et al.*, 2005). Algunos polisacáridos que han sido evaluados o utilizados para la formación de películas y recubrimientos son el almidón y sus derivados, derivados de celulosa, alginato, carragenina, varias gomas de origen vegetal y microbiano, quitosano y pectinas (Lin & Zhao, 2007).

Ácido oleico. Es el ácido graso monoinsaturado más abundante en la naturaleza y se puede sintetizar a partir del ácido esteárico. Su nombre sistemático es *cis*-9-octadecenoico, ya que posee 18 carbonos y se encuentra principalmente en el aceite de oliva, canola, girasol y cártamo (Coronado-Herrera, Vega y León, Gutierrez-Tolentino, García-Fernandez & Díaz-González, 2006). Vargas *et al.* (2009) mencionan que la incorporación de ácido oleico a películas de quitosano puede mejorar las propiedades de barrera a vapor de agua. Además, demostraron que el uso de recubrimientos formulados

con estos componentes fue capaz de aumentar el tiempo de vida útil de fresas bajo condiciones de almacenamiento en frío.

Quitano. Es un polisacárido lineal de alto peso molecular obtenido del proceso de desacetilación de la quitina, que se extrae del exoesqueleto de crustáceos, insectos y hongos (Coma *et al.*, 2002). Se compone de unidades de β (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi-D-glucosa (Figura 1), cuyos grupos funcionales están disponibles para reacciones químicas. Se comporta como un polielectrolito, en medio ácido, ya que presenta una alta densidad de carga positiva, atribuida a las unidades de glucosamina, por lo que interactúa fuertemente con estructuras aniónicas como proteínas y polisacáridos y otras moléculas de carga negativa (Trejo, Aragón & Miranda, 2001). Debido a su biodegradabilidad, biocompatibilidad, no toxicidad y capacidad antibacteriana, el quitano es un material con gran potencial para su uso como película y recubrimiento de alimentos (Leceta *et al.*, 2013; Liu, Cai, Jiang, Wu & Le, 2016). Además, es un excelente material formador de películas ya que les confiere permeabilidad selectiva a gases y buenas propiedades mecánicas (Elsabee & Abdou, 2013).

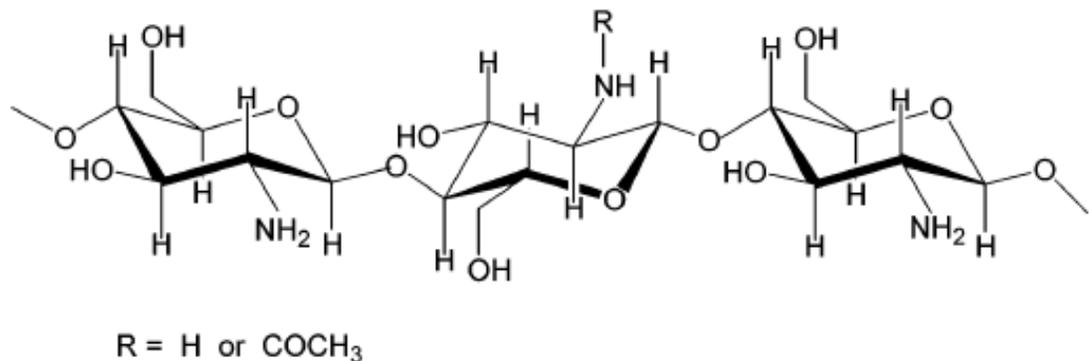


Figura 1. Estructura del quitano (Nordby, Kjoniksen, Nystrom & Roots, 2003).

Sin embargo, las películas hechas de quitano puro son frágiles y altamente permeables al vapor de agua, lo cual limita su uso. Para mejorar tanto las propiedades mecánicas como las de barrera se han incorporado a las formulaciones compuestos hidrofóbicos como ceras y ácidos grasos.

Recientemente la incorporación de aceites esenciales representa una alternativa interesante a los lípidos (Shen & Kamdem, 2015). Además, estos compuestos poseen actividad antimicrobiana o antioxidante que al ser incorporados a las películas pueden lograr una mayor efectividad debido a que proveen una liberación continua de estos ingredientes en la superficie de los alimentos (Falguera *et al.*, 2011). Los aceites esenciales son extraídos de plantas y especias y se constituyen de terpenos, aldehídos y compuestos fenólicos. Sin embargo, su potencial para ser usados en la industria alimenticia se ve reducido a causa de su aroma intenso, problemas de toxicidad y los posibles cambios en las características organolépticas del alimento (Shem & Kamdem, 2015). Entre la gran variedad de aceites esenciales, el aceite esencial de limón, tomillo y canela han ganado mayor aceptación debido a sus mejores evaluaciones sensoriales y a sus propiedades antimicrobianas (Fisher & Philips, 2008; Peng & Li, 2014).

Aceite esencial de tomillo. El tomillo (*Thymus vulgaris L.*) es una planta aromática y medicinal perteneciente a la familia de las *Lamiáceas*. Actualmente ha incrementado el interés en esta planta dado que su aceite esencial tiene actividad biológica y capacidad antioxidante con amplias aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética, agroalimentaria, agrícola y ganadera (López-Ambrocio, Delgadillo-Martínez & Ruíz-Posadas, 2015). El aceite esencial de tomillo contiene altas concentraciones de compuestos aromáticos (Cuadro 3). Se ha demostrado que el timol, componente principal de este aceite, presenta actividad inhibitoria contra bacterias, levaduras y hongos (Chang, Lin, Wu & Tsai, 2015). Ha sido utilizado para asegurar la calidad microbiológica de melón cantalupo y para reducir la colonización de hongos patógenos en tomate (Maissa, Emna, Machroui & Walid, 2015; Zhang , Ma, Critzer, Davidson & Zhong, 2016).

Cuadro 3. Componentes principales del aceite esencial de Tomillo (AET).

γ -Terpineno	Componentes de AET (%)				Referencia
	<i>p</i> -Cymeno	<i>Carvacrol</i>	Timol	Linalool	
16.5	18.6	2.4	44.7	-	Porte y Godoy (2008)
3.2	11.7	70.3	0.6	2.2	Pina-Vaz <i>et al.</i> (2004)
0.3	21.6	4.2	29.4	0.7	Nowak <i>et al.</i> (2013)
-	43.19	0.45	44.33	4.67	Ramadan <i>et al.</i> (2013)

Fuente: Mandal y DebMandal, 2016.

4.9 Formación de recubrimientos comestibles

En estudios recientes las tecnologías de películas y recubrimientos se han enfocado en desarrollar combinaciones de lípidos e hidrocoloides para mejorar la funcionalidad de los recubrimientos. Los recubrimientos compuestos pueden ser de dos tipos: una cubierta en bicapa o un recubrimiento emulsificado. En el caso de las películas en bicapa, los lípidos generalmente forman una capa adicional sobre el polisacárido o proteína, mientras que los lípidos en los recubrimientos emulsificados se dispersan y se atrapan en la matriz de proteína o polisacárido. En general, las películas en bicapa son más efectivas en sus propiedades de barrera al vapor de agua, sin embargo, su principal inconveniente es que su preparación requiere de dos aplicaciones y dos etapas de secado, lo cual limita su uso y hace más factible la utilización de recubrimientos emulsificados, que pueden aplicarse fácilmente sobre el producto mediante la técnica de esparado a alta presión (60-80 psi) o a través de la inmersión directa del producto en la emulsión (Lin & Zao, 2007; Tavassoli-Kafrani, Shekarchizadeh, & Masoudpour-Behabadi, 2015).

4.9.1 Emulsiones

Una emulsión se puede definir como un sistema donde un líquido inmisible es dispersado (fase dispersa) en forma de glóbulos en otra fase continua o líquido inmisible (Lim, Wong, Law, Samyudia & Dol, 2015). Las emulsiones se pueden clasificar de acuerdo a la manera en que se dispersan la fase oleosa y acuosa. Las emulsiones aceite en agua (O/W) se forman cuando las gotas de aceite se

dispersan en una fase acuosa que puede contener una variedad de ingredientes solubles en agua como azúcares, sales, ácidos, surfactantes, polisacáridos etc. Las emulsiones agua en aceite (W/O) consisten en gotas de agua dispersadas en una fase oleosa. También existen las emulsiones múltiples que se caracterizan por ser emulsiones simples, ya sea agua en aceite o aceite en agua dispersadas en otra fase inmiscible (Wong, Lim & Dol, 2015).

4.9.2 Estabilidad de una emulsión

Las emulsiones son sistemas termodinámicamente inestables lo que provoca que después de un tiempo de reposo las gotas se agreguen hasta llegar a una completa separación de fases. La velocidad a la cual una emulsión se desestabiliza y los mecanismos por los cuales este proceso ocurre dependen de su composición y microestructura, así como de las condiciones ambientales a las que se someterán a lo largo de su vida útil. En el Cuadro 3 se presentan algunos de los mecanismos de desestabilización de emulsiones. Es posible formar emulsiones que sean cinéticamente estables (metaestables) durante un período de tiempo razonable incluyendo sustancias conocidas como estabilizantes, ya sea emulsificantes o sustancias que modifican la textura. Los emulsificantes se adsorben a la superficie de las gotas recién formadas formando una membrana protectora que evita que se acerquen a otras gotas vecinas y se agreguen, entre los emulsificantes más comunes utilizados en la industria alimenticia se encuentran las proteínas, polisacáridos, fosfolípidos y surfactantes (Guzey & McClements, 2006). Por otro lado, las sustancias que modifican la textura pueden aumentar la viscosidad o la fuerza del gel de la fase continua y retardar el movimiento de las gotas y con ello mejorar la estabilidad de la emulsión (Chung & McClements, 2014). Adicionalmente, el tamaño de partícula también juega un rol importante para prevenir la desestabilización de emulsiones.

Cuadro 4. Mecanismos de desestabilización de emulsiones

Mecanismo	Descripción
Cremado	Ocurre cuando las gotas tienen una densidad menor al líquido que las rodea y provoca que tiendan a moverse hacia arriba.
Sedimentación	Las gotas tiene mayor densidad que el líquido circundante y tienden a moverse hacia abajo.
Floculación	Proceso por el cual dos o más gotas se juntan para formar un agregado en el cual cada gota mantiene su integridad individual. Puede aumentar la viscosidad de la emulsión e incluso conducir a la formación de geles.
Coalescencia	Proceso por el cual dos o más gotas se fusionan para formar una sola gota más grande.
Maduración de Ostwald	Proceso por el cual el tamaño de las gotas de aceite de una emulsión aumenta con el tiempo debido a la difusión de moléculas de aceite desde gotas pequeñas a gotas grandes a través de la intervención de la fase acuosa.
Inversión de fase	Puede ocurrir bajo condiciones donde el surfactante llega a ser soluble en la fase oleosa y así producir una emulsión agua en aceite (W/O).

Fuente: McClements, 2005.

4.10 Caracterización de emulsiones para desarrollar recubrimientos y películas

El tamaño y la distribución del tamaño de partícula de una emulsión así como las propiedades reológicas juegan un rol importante en las propiedades de los recubrimientos y películas comestibles. La evaporación de agua durante el proceso de secado de la película conduce a la floculación, coalescencia y

cremado de las gotas de aceite, la medida en la que ocurren estos procesos de desestabilización depende del tamaño de partícula y su distribución, de la viscosidad de la fase continua, de las interacciones entre las gotas y de las propiedades reológicas de la interfase (Morillon, Debeaufort, Blond, Capelle, & Voilley). Además, la estabilidad de la emulsión afecta la microestructura de la matriz de la película, en este sentido la caracterización de algunos factores de estabilidad contribuye a la comprensión de las diferencias entre las propiedades de las películas. El análisis de la distribución del tamaño de partícula permite obtener un criterio de estabilidad (McClements, 2007). Por otro lado, el análisis del comportamiento reológico además de ser útil como criterio de estabilidad puede definir la técnica de aplicación de un recubrimiento a un producto en particular (Vargas *et al.*, 2009).

4.10.1 Distribución del tamaño de partícula

El tamaño y la distribución del tamaño de las partículas que contiene una emulsión determina muchas de sus propiedades importantes, en particular, las que tienen que ver con su estabilidad, sus propiedades ópticas, su reología y sus atributos sensoriales (McClements, 2007). El tamaño promedio de gota puede expresarse de distintas maneras: 1) diámetro medio ponderado por la superficie $D_{3,2} = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2}$ y 2) diámetro medio ponderado por volumen $D_{4,3} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$, donde n_i es el número de glóbulos y d_i el diámetro de partícula. Generalmente, el diámetro medio ponderado por volumen es más sensible a la presencia de partículas grandes por lo que a menudo proporciona la prueba más rigurosa de la estabilidad física de una emulsión, sin embargo, la manera más extendida e informativa de presentar los datos de tamaño de partícula es a través del $D_{3,2}$. Si todas las gotas son de un mismo tamaño en la emulsión, se denomina emulsión monodispersa. Por el contrario, si existe variación en los tamaños es denominada polidispersa. Una emulsión polidispersa es caracterizada por su distribución del tamaño de partícula (Figura 2), que define la concentración de gotas en diferentes clases de tamaños, y puede ser representada como monomodal, bimodal o multimodal en función de la cantidad de picos presentes (Piorkowski & McClements, 2014).

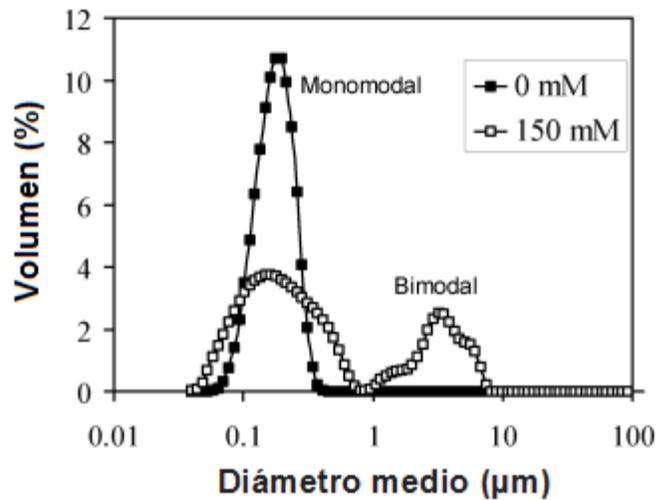


Figura 2. Distribución del tamaño de partícula de emulsiones aceite en agua estabilizadas con proteína de suero que contienen 0 o 150 mM de NaCl (pH 7). En ausencia de sal hay una distribución monomodal, pero en presencia de sal hay una distribución bimodal.

4.10.2 Comportamiento de flujo

Las propiedades reológicas son importantes para caracterizar las emulsiones debido a que determinan no sólo la ingeniería de producción de los alimentos, sino que también gran medida de sus propiedades sensoriales. Además proporcionan ideas fundamentales sobre la organización estructural y las interacciones de los componentes dentro de las emulsiones (Derkach, Zhabyco, Voronko & Maklakova, 2015). Las emulsiones son materiales estructuralmente complejos que pueden exhibir diferentes comportamientos reológicos desde fluidos de baja viscosidad a sólidos bastante duros. Existen tres tipos de fluidos: 1) Newtonianos donde existe proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación, 2) No Newtonianos, donde no hay proporcionalidad entre el esfuerzo cortante y la velocidad de deformación y 3) Viscoelásticos que se comportan como líquidos y sólidos presentando propiedades de ambos.

Las emulsiones son, en general, fluidos no newtonianos. La mayoría de los fluidos no Newtonianos exhiben un comportamiento adelgazante al corte (Figura 3) en donde las unidades estructurales se descomponen debido a las

fuerzas hidrodinámicas que se generan durante el cizallamiento, lo que provoca una disminución en la viscosidad aparente (Rao, 2007).

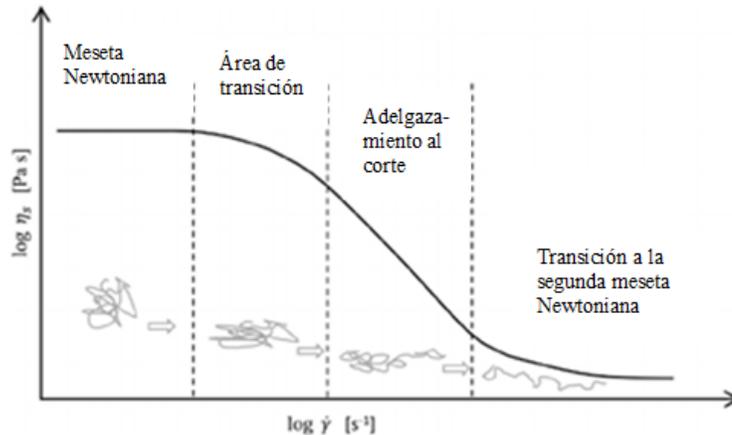


Figura 3. Curva típica de viscosidad-tasa de corte para un polímero que exhibe comportamiento de adelgazamiento al corte (Aho, Boetker, Baldursdottir & Rantanen, 2015).

4.11 Caracterización de películas comestibles

Las películas comestibles se caracterizan a través de sus propiedades mecánicas y sobre todo de sus propiedades de barrera al vapor de agua, parámetros que determinan la efectividad de una película para proteger y prolongar el tiempo de vida de frutas y vegetales (Flores *et al.*, 2016).

4.11.1 Evaluación de la permeabilidad a vapor de agua (PVA)

El principal interés en las películas comestibles se centra en el potencial que muestran cuando actúan como barrera al vapor de agua. Esta cualidad depende de la polaridad relativa de los componentes que forman la película. El método más utilizado para determinar este parámetro es el ATSM E96-95 modificado por McHugh, Avena-Bustillos y Krochta, (1993) definen la permeancia al vapor de agua como la velocidad de transmisión de vapor de agua por unidad de área, inducido por una unidad de diferencia de presión de vapor entre las dos superficies de la película, a una temperatura y humedad relativa específica. Este método, basado en determinaciones gravimétricas, consiste en colocar la película sobre un recipiente que contiene una disolución

que genera una determinada humedad relativa en el espacio de cabeza en contacto con la película. Este recipiente se coloca en una cámara con otra humedad relativa, asegurando la convección suficiente del gas para mantener constante la humedad relativa en la superficie externa de la película. Se monitorean las diferencias de peso del recipiente con el tiempo y una vez alcanzado el estado estacionario, puede estimarse la velocidad de transmisión de vapor de agua, dividiendo la pendiente de la curva de variación de peso del recipiente por el área de la película (Martín-Belloso *et al.*, 2005).

4.11.2 Propiedades mecánicas

La composición y la estructura de las películas comestibles afectan la eficiencia de las propiedades mecánicas. La fuerza de punción, el módulo de elasticidad, la tensión y el porcentaje de elongación al corte, son las propiedades mecánicas más comúnmente determinadas. La tensión de fractura expresa el estrés máximo desarrollado en una película al someterse a una prueba de extensión, mientras que el valor de elongación representa la extensibilidad de la película (Martín-Belloso *et al.*, 2005). Los hidrocoloides tienen buenas propiedades mecánicas; sin embargo, al ser mezclados con componentes lipídicos para mejorar las propiedades de barrera, las películas sufren un descenso en la tensión de fractura y en la extensibilidad. Con la finalidad de mejorar las propiedades mecánicas se pueden incorporar plastificantes a la matriz polimérica, los cuales reducen las interacciones entre los polímeros, generando películas suaves y flexibles (Santacruz, Rivadeneira & Castro, 2015).

5. RECUBRIMIENTOS COMESTIBLES A BASE DE EMULSIONES DE QUITOSANO, ÁCIDO OLEICO Y ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO

5.1 Resumen

El desarrollo de recubrimientos y películas comestibles ha adquirido mayor importancia debido a la demanda de disponer de estrategias de conservación para aumentar la vida de anaquel de productos frescos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y caracterizar recubrimientos de quitosano (Q) y ácido oleico (AO) enriquecidos con aceite esencial de tomillo (AET). Se prepararon emulsiones con Q, AO y AET en concentraciones de 1.0, 0.0-2.4 y 0.1 %, respectivamente. Se determinó el color, el tamaño de partícula y el comportamiento reológico de las emulsiones. El tamaño de gota osciló entre 0.89-2.45 μm y todas las emulsiones exhibieron un comportamiento adelgazante al corte. Las emulsiones se vaciaron sobre superficies sólidas y formaron películas que se evaluaron en términos de sus propiedades mecánicas y de barrera. Se registraron altos valores de esfuerzo de tensión entre 10.7-14.3 MPa con porcentajes de elongación entre 8.4-17.1 %. El espesor fue mayor a medida que aumentó la concentración de ácido oleico. De manera contraria, la permeabilidad a vapor de agua disminuyó con el aumento del ácido oleico.

Palabras clave: Películas poliméricas, propiedades mecánicas, permeabilidad a vapor de agua, recubrimientos poliméricos.

EDIBLE COATINGS BASED ON EMULSIONS OF CHITOSAN, OLEIC ACID ANT THYME ESSENTIAL OIL¹

5.2 Abstract

The development of edible coatings and edible films has acquired more importance because of the demand to dispose preservation strategies to increase shelf-life of fresh produce. The aim of this work was to develop and characterize chitosan (Q) and oleic acid (OA) coatings enriched with thyme essential oil (TEO). Emulsions with Q, OA, and TEO in concentration of 1.0, 0.0-2.4, and 0.1 %, respectively, were prepared. Color, particle size, and rheological behavior were determined. The drop size varied between 0.89-2.45 μm and all emulsions showed shear-thinning behavior. Emulsions were cast on solid surfaces and formed films that were evaluated in terms of their mechanical and barrier properties. Tensile strength varied between 10.7-14.3 MPa and elongation capacity between 8.4-17.1 %. Thickness was higher as concentration of OA increased. In contrast, water vapor permeability decreased when OA was present in higher concentration.

Keywords: Edible coatings, edible films, mechanical properties, water vapor permeability.

Thesis. Universidad Autónoma Chapingo.
Author: Mitzy Nayeli Estrada Ramírez
Advisor: Salvador Valle Guadarrama

5.3 Introducción

Las películas y recubrimientos comestibles se han utilizado ampliamente para retener la calidad y prolongar el tiempo de vida útil de algunas frutas y vegetales. Recientemente se ha incrementado el interés en el desarrollo de estas tecnologías, debido a las preocupaciones ambientales que genera el uso de materiales de empaque no biodegradables (Elsabee & Abdou, 2013). Varios materiales son utilizados para elaborar películas y recubrimientos, los cuales generalmente se pueden incluir en tres categorías: hidrocoloides (polisacáridos y proteínas), lípidos (ácidos grasos y ceras) y compuestos. La mayoría de los recubrimientos compuestos están asociados a matrices estructurales hidrofílicas y a compuestos lipídicos hidrofóbicos, lo cual da como resultado el incremento de la efectividad de la película, especialmente en sus propiedades de barrera al vapor de agua (Galus & Kadzinska, 2015). El quitosano es uno de los materiales más atractivos para la elaboración de recubrimientos comestibles, ya que, además de ser biodegradable, confiere buenas propiedades mecánicas a las películas y se ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos (Pereda *et al.*, 2012). Sin embargo, su principal inconveniente es su pobre barrera a la humedad, la cual puede ser mejorada a través de la incorporación de compuestos lipídicos como el ácido oleico, el cual al ser un ácido graso insaturado está asociado a varios efectos benéficos a la salud (Pereda *et al.*, 2012). Enfoques actuales contemplan la incorporación de aceites esenciales a las formulaciones de los recubrimientos con la finalidad de extender sus propiedades funcionales, debido a que estos extractos poseen propiedades antimicrobianas y antioxidantes (Peng & Li, 2014). En este sentido, la elaboración de recubrimientos comestibles utilizando quitosano como material estructural, ácido oleico como regulador del balance hidrofílico-lipofílico o y aceite esencial de tomillo como ingrediente activo representa una mezcla multicomponente que no ha sido reportada y que por lo tanto exige su caracterización en términos de su tamaño de partícula, sus propiedades reológicas, así como de sus propiedades mecánicas y de permeabilidad al vapor de agua.

5.4 Materiales y métodos

5.4.1 Materiales

Para la formación de emulsiones aceite en agua (O/W) se utilizó quitosano como matriz estructural, (peso molecular medio, grado de desacetilación de 75-85 %, Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V., Toluca, Edo. Méx., México). La fase oleosa estuvo constituida por ácido oleico (Meyer[®], S.A de C.V México, D.F), aceite esencial de tomillo (Droguería Cosmópolis S.A. de C.V., México) y Tween 80 (Hycel de México S.A. de C.V., Mexico) como emulsificante. Otros reactivos utilizados fueron ácido acético glacial (J.T. Baker, S.A. de C.V. México) e hidróxido de sodio (NaOH) 1N (Sigma Aldrich Inc., USA). En todos los experimentos se utilizó agua desionizada como disolvente.

5.4.2 Formulación y preparación de las emulsiones

Se prepararon seis emulsiones aceite en agua, a partir de una solución acuosa de quitosano (1 % p/p), dispersado en ácido acético glacial (1 % p/p). La fase lipídica estuvo constituida por aceite esencial de tomillo a una concentración constante de 0.1 % (p/p) y ácido oleico, cuya concentración varió entre 0 y 2.4 % (Cuadro 5), considerando una relación quitosano: fase lipídica de 1.0:0.1 a 1:2. Cabe señalar que se adicionó Tween 80 (0.1 % p/p en relación a la fase lipídica) como emulsificante y se ajustó el pH de la solución de quitosano a 5.2 con NaOH 1N.

El método general para la preparación de las emulsiones se basó en lo propuesto por Vargas *et al.* (2009) con ligeras modificaciones. La fase acuosa se preparó previamente con dispersiones de quitosano en ácido acético y Tween 80, usando agitación magnética a temperatura ambiente durante 15 h. Una vez disperso el polímero se realizó el ajuste de pH. Posteriormente, se agregó la fase oleosa gota a gota y se homogeneizó la mezcla con un equipo Ultra-Turrax (modelo T25 basic, IKA Labortechnik, Staufen, Alemania) operado a 13500 rpm durante 4 min a temperatura de 10 °C.

Cuadro 5. Formulaciones de emulsiones aceite en agua con quitosano, aceite esencial de tomillo y distintas concentraciones de ácido oleico.

Código	Quitosano (%)	Aceite de tomillo (%)	Ácido oleico (%)	Relación Q:L
E1	1	0.1	0.0	0.1
E2	1	0.1	0.4	0.5
E3	1	0.1	0.9	1.0
E4	1	0.1	1.4	1.5
E5	1	0.1	1.9	2.0
E6	1	0.1	2.4	2.5

5.4.3 Caracterización de emulsiones

Evaluación del color

La determinación del color se evaluó con un colorímetro (HunterLab, MiniScan® XE Plus, USA), usando parámetros en escala CielAB (a^* , b^* , L^*). Para ello, se colocaron 10 mL de cada emulsión en una celda que tenía una placa blanca estándar. Se calculó el ángulo de matiz (H^*) con base en la Ecuación (1) y la cromaticidad con la Ecuación (2). Asimismo, el valor de L^* se tomó como luminosidad (McGuire, 1992). Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

$$H^* = \arctan(b^*/a^*) \quad (1)$$

$$C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{0.5} \quad (2)$$

Determinación del tamaño de gota

El tamaño de gota de las emulsiones se midió mediante la técnica de dispersión de luz láser con un equipo Master Sizer 3000® (Malvern Instruments, Ltd. Worcestershire, Inglaterra) y se expresó como diámetro medio volumétrico superficial ($D_{3,2}$). Para llevar a cabo la medición, cada una de las muestras se dispersó en agua destilada hasta que se leyó en el equipo un índice de

oscuración en el rango de 5-10 %. El índice de refracción de una mezcla 1:1 de aceite esencial de tomillo y de ácido oleico se determinó previamente y fue de 1.46 y el del agua fue de 1.33.

Comportamiento de flujo de las emulsiones

Con objeto de determinar el efecto de las propiedades de flujo de las emulsiones sobre las propiedades mecánicas y de barrera de las películas, las emulsiones fueron sometidas a pruebas dinámicas, variando la tasa de corte en el rango de 10^{-3} a $10^3 \cdot s^{-1}$ y midiendo la viscosidad aparente en un reómetro MRC 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania) a temperatura de 4 °C (Physica TEK 150P), usando una geometría cono-plato, con diámetro de 50 mm y ángulo de 1° en el cono (CP50-1-SN29993). Se utilizaron 2 mL de cada emulsión y todas las medidas se efectuaron por triplicado.

5.4.4 Preparación y caracterización de las películas comestibles

El método de preparación de las películas fue mediante la técnica de vaciado en placa de cada una de las seis emulsiones, de acuerdo a lo reportado por Bosquez-Molina, Guerrero-Legarreta y Vernon-Carter (2003). Se vertieron 10 g de cada emulsión en placas de plástico de 9 cm de diámetro. Se secaron en un horno de convección (Thermo Scientific, USA) a 30 ± 2 °C durante 12 h. Posteriormente, se removieron las películas de las cajas Petri con ayuda de pinzas de disección y se mantuvieron almacenadas a una humedad relativa de (65 %) por 24 h previas a su caracterización.

Determinación de espesor

El espesor de las películas se midió con un micrómetro manual (Starret, model 216, USA) en cinco zonas distintas de cada película. Para evitar tocar directamente las muestras se utilizó un par de cubreobjetos y se determinó su grosor (final). Posteriormente se colocó la película entre los cubreobjetos y se realizó la medición (inicial). El valor del grosor se calculó por diferencia del valor inicial menos el valor final.

Propiedades mecánicas

Las pruebas mecánicas consistieron en la determinación del esfuerzo de tensión (ET) y el porcentaje de elongación (%E). Las mediciones se realizaron de acuerdo con el método ASTM-882 reportado por Galus y Lenart (2013), utilizando un texturómetro TA-XT2i (Stable Micro Systems UK, Surrey RU), con una celda de 5 kg. Se utilizaron muestras rectangulares de 5.0 cm x 2.5 cm, a las cuales se les determinó el grosor en cinco posiciones aleatorias. Posteriormente, las probetas se colocaron en mordazas de sujeción del equipo con una separación entre éstas de 4 cm y se aplicó una rutina de estiramiento hasta ruptura a velocidad de 1 mm s^{-1} . El ET se calculó por la división de la fuerza máxima ejercida sobre la película durante la fractura entre el área de la sección transversal (grosor promedio de las películas x ancho). El %E se determinó considerando la distancia hasta la ruptura de la muestra y se calculó por la división de dicho parámetro respecto a la longitud inicial de la muestra multiplicado por 100.

Permeabilidad al vapor de agua (PVA)

La permeabilidad a vapor de agua se determinó con el método de la copa, definido como método gravimétrico estándar de la ASTM, E 96-80 (ASTM, 1989) con ligeras modificaciones. Se utilizaron cajas Petri de plástico (9 cm de diámetro y 1.5 cm de altura) como celdas de ensayo, las cuales se cubrieron con muestras de las películas y se sellaron con pegamento instantáneo y parafina. En el interior de cada caja se colocaron 10 mL de una solución saturada de KNO_3 para generar una humedad relativa constante de 97 %. Posteriormente, las celdas se colocaron en una cámara de ambientación a temperatura constante de $22.5 \text{ }^\circ\text{C}$ y se monitoreó el cambio de humedad relativa (Hr) con una unidad Kestrel® 4000 NV Pocket Weather®, Meter, Nielsem-Kellerman Company, EUA). Dado que la Hr dentro de la cámara era más baja respecto a la de la solución contenida en las cajas, se propició la migración del vapor de agua desde el interior de la celda, atravesando la película, hacia el exterior, y con ello se favoreció la pérdida de peso de las

celdas de ensayo. Las variaciones en el peso se monitorearon durante 24 h a intervalos de 6 h, hasta alcanzar un peso constante. La permeabilidad a vapor de agua (PVA) se calculó con el uso de la Ecuación (3):

$$PVA = \frac{\Delta m * x}{A * \Delta t * \Delta p} = \frac{VTVA * x}{P_1 - P_2} \quad (3)$$

donde Δm es pérdida de peso (g) de la celda después de 24 h; x es espesor de la película (m); A es área de la película (m²); Δt es periodo de tiempo de evaluación (s); P_1 y P_2 son presiones parciales de vapor. La presión parcial en el interior de las celdas fue corregida en la forma propuesta por Gennadios Weller y Gooding (1994), considerando el efecto de difusión gaseosa a través de la película estática en la vecindad de la película y utilizando la Ecuación (4):

$$P_1 = (P_{atm} - Pv^*) \exp \frac{VTVA * RT \Delta z}{P_{atm} D} \quad (4)$$

donde Pv^* es presión de vapor de saturación = $10^{8.10765 - \frac{1750.286}{T(^{\circ}C) + 235}}$; $VTVA$ es velocidad de transferencia del vapor de agua (mol m⁻² s⁻¹); T es temperatura absoluta (K); Δz es altura (m) entre la solución salina y el recubrimiento; R es la constante universal de los gases (8.214 J mol⁻¹ K⁻¹) y D es coeficiente de difusión del vapor de agua en el aire (m² s⁻¹). Asimismo, la presión parcial de vapor en el exterior de las celdas se determinó con la Ecuación (5):

$$P_2 = \frac{Hr}{100} * Pv^* \quad (5)$$

La permeabilidad a vapor de agua se calculó en unidades kg m s⁻¹ m⁻¹ Pa.

5.4.5 Análisis estadístico

Esta fase experimental se condujo en forma congruente con un diseño completamente al azar, considerando la formulación de las emulsiones como única fuente de variación. Los datos se sometieron a análisis de varianza complementado con rutinas de comparación de medias con el estadístico de Tukey (0.05). Todo el análisis se realizó con el paquete estadístico SAS (SAS Institute, 1999).

5.5 Resultados y discusión

5.5.1 Color

Se registraron diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en las variables de color medidas en las emulsiones (Cuadro 6). El aumento en la concentración de ácido oleico generó valores más altos de luminosidad que confirieron una apariencia blanca a las emulsiones 4, 5 y 6, mientras que la emulsión 1, al poseer un valor más bajo de luminosidad, se mostró ligeramente transparente (Figura 4). Los atributos de color influyen ampliamente en la aceptabilidad del consumidor. En este sentido, las películas y recubrimientos comestibles deben ser incoloros en lo posible para no alterar el aspecto del producto al que se van a aplicar (Galus & Lenart, 2013).

Los valores del ángulo de tono (hue) indicaron que las emulsiones se encuentran en el rango que va de los tonos amarillos, para las dos primeras emulsiones, hasta los tonos naranja para las emulsiones restantes. Respecto a la saturación del color, los valores fueron bajos, lo cual indica que las tonalidades que representa el valor de hue son poco intensas.

Cuadro 6. Valores de los parámetros de color: Luminosidad (L^*), ángulo de tono (hue) y saturación de color (croma) de emulsiones de quitosano, aceite esencial de tomillo y ácido oleico.

Emulsión	L^*	Hue	Croma
1	69.07±1.19 ^{cb}	64.24±4.58 ^a	1.47±0.09 ^{bc}
2	67.29±1.66 ^c	64.51±4.52 ^a	2.16±0.42 ^a
3	72.24±1.62 ^{ab}	53.06±2.24 ^b	1.63±0.11 ^b
4	73.83±2.54 ^a	51.37±2.49 ^b	1.39±0.02 ^{bc}
5	76.33±1.94 ^a	49.48±1.60 ^b	1.38±0.04 ^{bc}
6	75.74±2.36 ^a	48.10±4.58 ^b	1.21±0.06 ^c

^z Superíndices distintos indican que las medias difieren significativamente ($p < 0.05$). Los datos indican medias \pm desviación estándar.

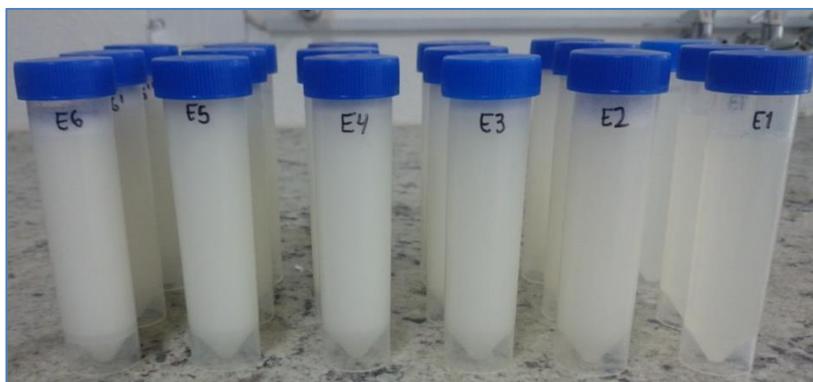


Figura 4. Apariencia de emulsiones preparadas: E1 (AET 0.1 % +Q1 %), E2 (AET 0.1 %+ Q1 %+AO 0.4 %), E3 (AET 0.1 %+ Q 1 %+AO 0.9 %), E4 (AET 0.1 %+ Q1 %+AO 1.4 %), E5 (AET 0.1 %+ Q1 %+AO 2.1 %) y E6 (AET 0.1 %+ Q1 %+AO 2.1 %). AET: aceite esencial de tomillo, Q: quitosano, AO: ácido oleico.

5.5.2 Tamaño y distribución de las partículas de las emulsiones

El tamaño de gota es un factor determinante para la estabilidad de una emulsión, así como para la apariencia, el sabor y la textura (Galus & Kazinska, 2015). En el Cuadro 7 se muestra el diámetro volumétrico superficial ($D_{3,2}$) de las gotas de aceite (constituidas por ácido oleico y aceite esencial de tomillo) de las emulsiones. Cabe destacar que conforme aumentó la concentración de ácido oleico (AO) se incrementó significativamente el tamaño de las gotas, las cuales variaron en un rango de 0.89 a 2.45 μm . Este comportamiento puede originarse debido a que en el pH al que se realizaron las emulsiones (5.2) los grupos amino del quitosano se encuentran cargados positivamente y se adsorben a los carboxilatos del ácido oleico que están cargados negativamente, dando como resultado partículas más grandes que además evitan la agregación de las gota y en consecuencia favorecen la estabilidad de la emulsión. Resultados similares han sido reportados por Vargas *et al.* (2009) quienes determinaron que el $D_{3,2}$ fue mayor en las emulsiones que contenían concentraciones más altas de ácido oleico (2 y 4 %).

Cuadro 7. Diámetro superficial de las gotas en las emulsiones.

Emulsión	$d_{3,2}$ (μm)
E1	0.89 ± 0.09^d
E2	1.42 ± 0.19^c
E3	1.77 ± 0.43^{bc}
E4	2.08 ± 0.58^{ab}
E5	2.11 ± 0.46^{ab}
E6	2.45 ± 0.35^a

^z Superíndices distintos indican que las medias difieren significativamente ($p < 0.05$). Los datos indican medias \pm desviación estándar.

En la Figura 5 se muestra la distribución del tamaño de partícula. Todas las emulsiones presentaron una distribución monomodal, lo cual indica que la fase lipídica en cada emulsión se distribuye en forma homogénea en la fase dispersante. En el caso de emulsiones utilizadas para bebidas, una distribución monomodal y estrecha se asocia con una mejor estabilidad a largo plazo (Piorkowski & McClements, 2014). Estos resultados se pueden correlacionar con el tamaño de los glóbulos de lípido, ya que entre menor es éste más homogénea es la distribución. Además, Galus y Kazinska (2015) mencionaron que un alto grado de compatibilidad de los componentes de una emulsión es responsable de este tipo de comportamiento, lo cual favorece la formación de películas con menores defectos estructurales.

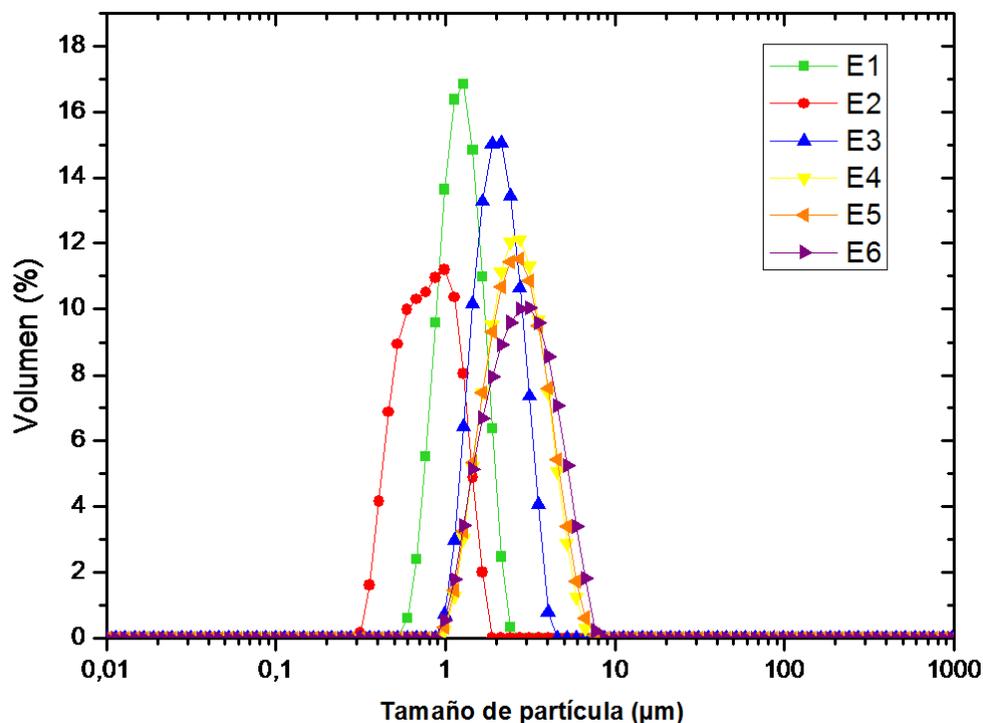


Figura 5. Distribución del tamaño de partícula de las emulsiones. E1 (AET 0.1 % +Q1 %), E2 (AET 0.1 % + Q1 % +AO 0.4 %), E3 (AET 0.1 % + Q 1 % +AO 0.9 %), E4 (AET 0.1 % + Q1 % +AO 1.4 %), E5 (AET 0.1 % + Q1 % +AO 2.1 %) y E6 (AET 0.1 % + Q1 % +AO 2.1 %). AET: aceite esencial de tomillo, Q: quitosano, AO: ácido oleico.

5.5.3 Comportamiento de flujo de las emulsiones

Todas las emulsiones presentaron un perfil de viscosidad aparente vs tasa de corte similares (Figura 6). No se presentaron regiones newtonianas en ninguna de ellas, solamente existió un comportamiento de adelgazamiento al corte, lo cual puede deberse a la que el número de enlaces que se rompen por la acción de los esfuerzos cortantes es mayor que aquellos que se regeneran, provocando un cambio neto en la estructura de la emulsión y una disminución gradual de la viscosidad aparente, en todo el rango de tasas de corte. Resultados similares han sido reportados por Hayati, Ching y Rozaina (2016), donde las curvas de flujo de emulsiones de goma guar y goma xantana no presentaron región Newtoniana para la estimación de la viscosidad limitante a tasa de corte cero. A bajas tasas de corte ($0.001-0.1 \text{ s}^{-1}$) la ruptura de enlaces predomina sobre la formación de nuevas estructuras, originando con ello

diferencias en el valor de la viscosidad aparente de las emulsiones. A medida que la concentración de ácido oleico aumento, la viscosidad aparente disminuyó. Este comportamiento se pudo originar dado que el tamaño de partícula de las emulsiones E5 y E6 (que poseían las concentraciones más altas de AO) fue mayor. Pal (2000) menciona que cuando el tamaño de partícula aumenta, el número de gotas por unidad de volumen disminuye y la distancia media de separación entre las gotas es más grande, por lo tanto, las gotas se vuelven más móviles y muestran menos resistencia al flujo debido a la disminución de la interacción hidrodinámica. A tasas de corte relativamente altas ($0.1-1 \text{ s}^{-1}$) se registró una menor ruptura o destrucción de la estructura de las emulsiones, dando como resultado que los valores de viscosidad aparente presentaran una ligera tendencia a permanecer constantes. Este comportamiento fue más evidente en las emulsiones 3, 5 y 6 y probablemente sea consecuencia de una mayor estabilidad asociada a las interacciones electroestáticas entre el quitosano y el ácido oleico. Cuando se incrementó la magnitud de la tasa de corte ($10-1000 \text{ s}^{-1}$) nuevamente la ruptura de enlaces fue mayor a la reorganización de los mismos, provocando la alineación de las moléculas en la dirección del flujo y disminuyendo progresivamente la viscosidad aparente. Este último comportamiento, denominado pseudoplástico, es característico de emulsiones, dispersiones floculadas y fluidos poliméricos (Evans, Ratcliffe & Williams., 2013).

5.5.4 Espesor y propiedades mecánicas de las películas comestibles

El espesor de las películas es una característica importante ya que puede modificar las propiedades mecánicas y la permeabilidad al vapor de agua (Zamudio-Flores *et al.*, 2015). La película elaborada con la concentración más alta de ácido oleico (2.4 %, emulsión E6) presentó mayor grosor respecto a las películas elaboradas a partir de las emulsiones E1 y E2, que contenían sólo aceite de tomillo al 0.1 % y ácido oleico al 0.4 %, respectivamente (Cuadro 8). Esto indica que la adición de ácido oleico afectó significativamente esta variable.

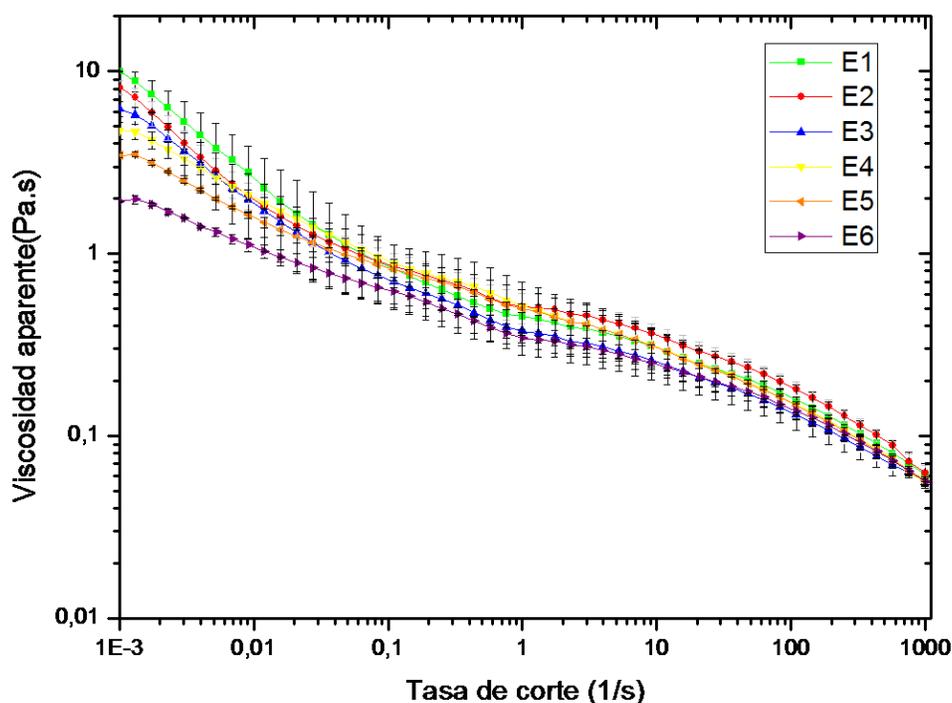


Figura 6. Cambios en la viscosidad aparente en función de la tasa de corte de las emulsiones. E1 (AET 0.1 % +Q1 %), E2 (AET 0.1 %+ Q1 %+AO 0.4 %), E3 (AET 0.1 %+ Q 1 %+AO 0.9 %), E4 (AET 0.1 %+ Q1 %+AO 1.4 %), E5 (AET 0.1 %+ Q1 %+AO 2.1 %) y E6 (AET 0.1 %+ Q1 %+AO 2.1 %). AET: aceite esencial de tomillo, Q: quitosano, AO: ácido oleico.

Cuadro 8. Espesor, permeabilidad a vapor de agua (PVA), resistencia a la tensión (ET) y capacidad de elongación de películas comestibles formuladas a base de quitosano, ácido oleico y aceite esencial de tomillo.

Película	Espesor (mm)	PVA	ET	Elongación
		(g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)	(MPa)	(%)
E1	0.029±0.013 ^b	3.18 x10 ^{-11ab}	14.30±1.27 ^a	8.40±1.29 ^b
E2	0.031±0.006 ^b	3.21 x10 ^{-11a}	11.04±2.57 ^a	12.55±3.27 ^{ab}
E3	0.037±0.012 ^{ab}	2.89 x10 ^{-11ab}	12.14±0.72 ^a	17.18±2.53 ^a
E4	0.045±0.024 ^{ab}	2.90 x10 ^{-11ab}	11.03±2.92 ^a	15.10±4.77 ^{ab}
E5	0.063±0.013 ^{ab}	1.97 x10 ^{-11b}	11.01±5.37 ^a	12.01±0.65 ^{ab}
E6	0.076±0.016 ^a	2.29 x10 ^{-11ab}	10.72±1.00 ^a	9.94±3.38 ^b

^z Superíndices distintos indican que las medias difieren significativamente (p <0.05). Los datos indican medias ± desviación estándar.

Los valores de esfuerzo o resistencia a la tensión (ET) y el porcentaje de elongación al corte (%E) de las películas comestibles se muestran en el Cuadro (7). Ninguna de estas propiedades mecánicas se vio afectada significativamente por el incremento en la concentración de ácido oleico, lo cual se debió probablemente a que la diferencia de concentración entre emulsiones varió poco (0.5 mL). Resultados similares han sido reportados por Ghanbarzadeh y Almasi (2011) en películas de carboximetilcelulosa y ácido oleico a concentraciones de 0.3, 0.6 y 0.8 %. Por otro lado, Vargas *et al.* (2009) caracterizaron películas de quitosano con concentraciones de 1, 2 y 4 % de ácido oleico y reportaron valores de esfuerzo de tensión de 7.4-18.0 MPa, mientras que el porcentaje de elongación varió entre 11 y 17 %. Respecto a este último, cabe mencionar que en el presente estudio se registraron valores bajos, que pueden ser consecuencia de la falta de un material plastificante, distinto al ácido oleico, dentro de la formulación de las emulsiones. En contraste, Fabra, Talens y Chiralt (2008), mencionaron que el ácido oleico puro o combinado con cera de abeja ejercen un efecto plastificante en las películas elaboradas con caseinato de sodio, aumentando su elasticidad y flexibilidad. Varios autores han estudiado el efecto de adicionar aceites esenciales a películas de quitosano basadas en emulsiones y han concluido que todas las propiedades mecánicas disminuyen cuando a una película de quitosano se le incorpora un lípido (Sánchez-González, Chiralt, González-Martínez & Cháfer, 2011). Dada la amplia variación entre los resultados reportados en la literatura acerca de estas propiedades, Pereda *et al.* (2012) concluyeron que este comportamiento se puede atribuir al grado de desacetilación y al peso molecular del quitosano, a la humedad relativa, a la presencia de diversos plastificantes y a la temperatura de secado de las películas, entre otros factores.

5.5.5 Permeabilidad a vapor de agua de las películas

Los valores de permeabilidad al vapor de agua de las películas registraron diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 8). Las películas hechas a base de las emulsiones con las relaciones más altas de quitosano:fase lipídica,

es decir, 1:2 y 1:2.5 son las que presentaron los valores más bajos de PVA, lo cual ocurrió dado que la fracción lipídica de la emulsión está constituida por aceite de tomillo y ácido oleico. Este último es un ácido graso insaturado que debido a su naturaleza hidrofóbica tiene la función de bloquear el transporte de humedad a través de la película, impartiendo hidrofobicidad a la misma e incluso constituyendo una red a lo largo de la cadena polimérica lo cual contribuye al aumento de la tortuosidad para el transporte de moléculas de agua a través de las películas (Fabra *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior, las películas hechas a partir de las emulsiones E5 y E6 fueron las que presentaron mayor espesor y varios autores han mencionado que existe una relación inversamente proporcional entre este parámetro y la PVA (Falguera *et al.*, 2011; Trejo *et al.*, 2001; Zamudio-Flores *et al.*, 2015).

La PVA de las películas varió entre 1.97×10^{-11} y 3.21×10^{-11} $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$. Vargas *et al.* (2009) mostraron resultados similares en películas de quitosano con ácido oleico, mientras que Leceta *et al.* (2013) reportaron valores en películas de quitosano y glicerol del orden de 8.07×10^{-11} - 10.2×10^{-11} $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$, por su parte Peng y Li (2014) obtuvieron 7.52×10^{-11} - 9.36×10^{-11} $\text{g m}^{-1} \text{s}^{-1} \text{Pa}^{-1}$ en películas de quitosano con aceite esencial de tomillo, de limón y de canela.

5.6 Conclusiones

La incorporación de ácido oleico a las emulsiones de quitosano y aceite esencial de tomillo afectó significativamente las variables de luminosidad y tamaño de partícula.

Todas las emulsiones presentaron un comportamiento pseudoplástico o adelgazante al corte.

El aumento en la concentración de ácido oleico aumentó significativamente el espesor y como consecuencia redujo la permeabilidad al vapor de agua.

Las propiedades mecánicas de las películas no se vieron afectadas por el aumento en la concentración de la fase lipídica de las emulsiones. Además, se comprobó que el ácido oleico no confirió flexibilidad a las películas comestibles.

6. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE ACEITE ESENCIAL DE TOMILLO SOLO Y COMBINADO CON ÁCIDO OLEICO Y QUITOSANO

6.1 Resumen

El ataque de microorganismos patógenos es uno de los principales factores que disminuyen la calidad postcosecha de los productos frescos. El hongo seta es afectado por bacterias del género *Pseudomonas* que modifican severamente su apariencia y calidad. El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración mínima de aceite esencial de tomillo (AET) solo o combinado con ácido oleico y quitosano para inhibir el crecimiento de un consorcio bacteriano asociado al deterioro del hongo seta. La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de tomillo fue de 600 ppm. Se encontró un efecto sinérgico para inhibir el crecimiento microbiano entre la mezcla de quitosano al 1 % y AET a 400 ppm. La mezcla de AET con ácido oleico (0.9 %) promovió el crecimiento bacteriano en todas las combinaciones ensayadas.

Palabras clave: *Pseudomonas*, concentración mínima inhibitoria, aceite esencial de tomillo, ácido oleico, quitosano.

1

Tesis de Maestría en Ciencias, Programa de Ciencia y Tecnología Agroalimentaria. Universidad Autónoma Chapingo.
Autor: Mitzy Nayeli Estrada Ramírez
Director de tesis: Salvador Valle Guadarrama

MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF THYME ESSENTIAL OIL ALONE AND COMBINED WITH OLEIC ACID AND CHITOSAN

6.2 Abstract

The attack of pathogenic microorganisms is one of the main factors that reduces post-harvest quality of fresh produce. The oyster mushroom is affected by bacteria of the *Pseudomonas* genus that severely alter their appearance and quality. The aim of this study was to determine the minimum concentration of thyme essential oil (TEO) alone or in combination with oleic acid and chitosan to inhibit growth of a bacterial consortium associated with deterioration of the oyster mushroom. Six hundred ppm was the minimum inhibitory concentration of thyme essential oil. A synergistic effect was found to inhibit microbial growth between chitosan 1 % and TEO at 400 ppm. TEO mixture with oleic acid (0.9 %) promoted bacterial growth in all tested combinations.

Key words: *Pseudomonas*, chitosan, minimum inhibitory concentration, oleic acid, thyme essential oil.

6.3 Introducción

Entre los productos naturales, los aceites esenciales son reconocidos por sus propiedades antioxidantes, antibacterianas y antifúngicas. Son ampliamente utilizados en la conservación de alimentos ya que pueden sustituir a los aditivos químicos utilizados para el control de microorganismos patógenos (Adrar, Oukil & Bedjou, 2015). El aceite esencial de tomillo contiene más de 60 compuestos, la mayoría de ellos muestran propiedades antimicrobianas contra un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Los compuestos activos más importantes que posee son el carvacrol y el timol (Perdones, Chiralt & Vargas, 2016). De igual manera, el quitosano tiene propiedades antifúngicas y antibacterianas que lo hacen apto para su uso en la preservación de alimentos (Elsabee & Abdou, 2013). En este sentido, en el presente trabajo se desarrollaron emulsiones a base de quitosano combinadas con aceite esencial de tomillo y ácido oleico con la intención de extender el tiempo de vida útil del hongo *Pleurotus ostreatus*. Considerando que bacterias del género *Pseudomonas* se han asociado al daño postcosecha en el hongo seta, se decidió evaluar la capacidad antibacteriana y determinar la concentración mínima inhibitoria tanto del aceite esencial de tomillo solo y de las respectivas combinaciones con quitosano y ácido oleico para tener una referencia de los posibles efectos *in vivo* de las emulsiones. Varios métodos son utilizados para evaluar la sensibilidad antimicrobiana, incluyendo la difusión en agar, la dilución en cultivo y las modificaciones entre éstos. El método de dilución en cultivo es menos utilizado debido a que es más complejo, consume más tiempo y además es más costoso, sin embargo, este método permite claramente cuantificar las concentraciones del agente antimicrobiano a las cuales el organismo muestra resistencia (Boer, Heuer, Hussein & McDougall, 2015). Por ello, en el presente trabajo se optó por utilizar el método de dilución para realizar las pruebas antimicrobianas.

6.4 Materiales y métodos

6.4.1 Materiales

Se utilizaron ejemplares de hongo seta de la variedad blanca de *Pleurotus ostreatus* obtenidos de un mercado local del municipio de Texcoco, Estado de México. Otros materiales fueron agar King B (Sigma-Aldrich Química, S.L., México). En todos los experimentos se utilizó agua estéril.

6.4.2 Aislamiento de microorganismos

Para realizar el aislamiento directo de la carga microbiana del hongo seta se siguió el procedimiento descrito por Munsch, Geoffroy, Alatossava y Meyer (2000). Se seleccionaron tejidos del hongo que presentaban flacidez y pudrición. Posteriormente, se suspendieron en agua estéril y se agitaron vigorosamente. Se dejó reposar el tejido durante 15 min hasta que el agua se volvió turbia, con lo cual se obtuvo un caldo de cultivo. Con un asa flameada se tomó una gota de la suspensión y se sembró en caja Petri con agar King B por el método de estría cruzada. Después de 48 h de incubación a una temperatura de 25 ± 2 °C se realizaron tinciones de Gram a las diferentes colonias y se sembraron en diferentes cajas con el mismo medio. Después del periodo de incubación se repitió el procedimiento anteriormente descrito y se realizó la tercera resiembra.

6.4.3 Pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se obtuvo un inóculo tomando cuatro asadas de las colonias desarrolladas en las cajas Petri de la tercera resiembra y se suspendieron en agar nutritivo para bacterias. El inóculo obtenido se mantuvo a 25 ± 2 °C y 150 rpm en un agitador orbital con incubación (Thermo Scientific MaxQ-4450) durante 24 h. Se preparó agar King B, se esterilizó, se enfrió a 50 °C y se repartió en siete partes, las cuales se mezclaron con aceite esencial de tomillo en concentración de 0 (T_0), 300, (T_3), 400 (T_4), 500 (T_5), 600 (T_6), 700 (T_7) y 800 (T_8) ppm. La mezcla se realizó mediante homogeneización con un equipo Ultra Turrax T25 (IKA

Labortechnik, Staufen, Germany) que operó a 10000 rpm por 10 min. De cada volumen se obtuvieron cuatro sub-fracciones que fueron manejadas con quitosano (a 1 % de concentración) presente (Qs) o ausente (Qn) y ácido oleico (a 0.9 % de concentración) presente (Ls) o ausente (Ln). De esta manera se formaron 28 tratamientos denominados T₀QsLs, T₀QsLn, T₀QnLs, T₀QnLn, T₃QsLs, T₃QsLn, T₃QnLs, T₃QnLn, T₄QsLs, T₄QsLn, T₄QnLs, T₄QnLn, T₅QsLs, T₅QsLn, T₅QnLs, T₅QnLn, T₆QsLs, T₆QsLn, T₆QnLs, T₆QnLn, T₇QsLs, T₇QsLn, T₇QnLs, T₇QnLn, T₈QsLs, T₈QsLn, T₈QnLs, y T₈QnLn. Posteriormente, se realizaron diluciones decimales del inóculo en secuencia y se sembraron 100 µL de las diluciones 10⁻⁵ y 10⁻⁶ en los medios de cultivo antes mencionados. Se utilizó medio King B puro como testigo. Las cajas Petri se incubaron a 25±2 °C durante 24 h, tras lo cual se revisaron y se cuantificaron las unidades formadoras de colonia por mL (UFC mL⁻¹) con ayuda de un contador de colonias (Bantex Colony Counter 920A, BioSurplus Inc., USA). Todo el procedimiento se realizó por triplicado.

6.4.4 Análisis estadístico

Esta fase experimental se condujo en forma congruente con un arreglo factorial 7×2×2, alojado en un diseño completamente al azar. La concentración de aceite esencial de tomillo constituyó uno de los factores de variación y tuvo siete niveles (0, 300, 400, 500, 600, 700 y 800 mg L⁻¹). La ausencia (Qn) o presencia de quitosano (Qs) constituyó el segundo factor de variación y, asimismo, la ausencia (Ln) o presencia (Ls) de ácido oleico el tercer factor. Los datos de unidades formadoras de colonias (UFC mL⁻¹) se sometieron a análisis de varianza complementado con pruebas de comparación de medias (Tukey, 0.05). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado. Se utilizó el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 1999).

6.5 Resultados y discusión

El efecto de la concentración de tomillo fue significativo ($P \leq 0.05$) en la actividad antimicrobiana de las mezclas formuladas con varias proporciones de este aceite esencial (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores percentiles de la distribución de Fisher (F, 0.05) con ($\alpha = 0.05$) y valores F correspondientes al análisis de varianza (Fanova) de la evaluación del efecto inhibitorio (EI) de emulsiones preparadas a base de aceite esencial de tomillo (Tom), quitosano (Qui) y ácido oleico (Ole) aplicadas sobre hongo seta (*Pleurotus ostreatus*).

Factor de variación	Grados de libertad	F _{0.05}	F _{anova}	Coefficiente de variación
Tom	6	2.26	94.12 *	9.25
Qui	1	4.01	113.60 *	--.---
Ole	1	4.01	3792.71 *	--.---
TomxQui	6	2.26	22.03 *	--.---
TomxOle	6	2.26	94.00 *	--.---
QuixOle	1	4.01	0.47 ns	--.---
TomxQuixOle	6	2.26	11.66 *	--.---
Error	56	--.---	--.---	--.---

²Los símbolos * y ns significan efecto significativo y no significativo, respectivamente, de los factores de variación sobre el efecto inhibitorio (EI) de emulsiones.

Las mayores concentraciones de aceite esencial de tomillo (AET) causaron los menores desarrollos de UFC mL⁻¹, en tanto que con menores concentraciones el desarrollo fue mayor ($P \leq 0.05$; Cuadro 10). Diversos estudios han demostrado que el AET posee alto poder antimicrobiano y atribuyen esta característica a su contenido de compuestos fenólicos, principalmente carvacrol y timol, que son capaces de desintegrar la membrana celular de las bacterias (Siroli, Patrignani, Gradini & Lanciotti, 2015). La presencia de quitosano causó que el crecimiento microbiano fuera significativamente menor ($P \leq 0.05$) a cuando este compuesto estuvo ausente. Esta situación era un resultado esperado, pues se ha reportado que el quitosano ejerce un efecto en contra del

desarrollo de diversos microorganismos (Elsabee & Abdou, 2013). En cuando al efecto de la presencia de ácido oleico, que fue incorporado a las emulsiones para reducir el balance hidrofílico-lipofílico (Vargas *et al.*, 2009) y para proveer características de flexibilidad (Fabra *et al.*, 2008), se obtuvo un resultado no esperado, pues la presencia de este compuesto causó un incremento significativo en el desarrollo microbiano ($P \leq 0.05$; Cuadro 9).

Cuadro 10. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la concentración de aceite esencial de tomillo (AET), la presencia de quitosano y la presencia de ácido oleico, sobre el desarrollo de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC mL⁻¹) en hongo seta.

Fuente de variación	UFC mL ⁻¹	DSH
<u>Concentración de tomillo</u>		
T0	343.08 (± 21.01) c	30.03
T3	502.17 (± 60.63) a	
T4	398.58 (± 98.58) b	
T5	315.25 (± 99.43) cd	
T6	268.42 (± 101.62) e	
T7	282.83 (± 107.28) de	
T8	254.67 (± 97.29) e	
<u>Presencia (Qs) o ausencia (Qn) de quitosano</u>		
Qs	301.50 (± 89.99) b	13.67
Qn	374.21 (± 95.51) a	
<u>Presencia (Ls) o ausencia (Ln) de ácido oleico</u>		
Ls	547.93 (± 37.42) a	13.67
Ln	127.79 (± 59.91) b	

^z Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). Los valores entre paréntesis corresponden a error estándar. DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

Por otro lado, se encontró que tanto las interacciones dobles Tom×Qui y Tom×Ole, y la interacción triple Tom×Qui×Ole fueron significativas ($P \leq 0.05$; Cuadro 8), lo cual sugiere que los resultados de los efectos mayores debe

analizarse con más detalle. Para ello, se analizó el efecto de la adición de AET al interior de cuatro combinaciones de tratamientos: Qn-Ln, Qn-Ls, Qs-Ln y Qs-Ls (Figura 7). Fue evidente que la presencia de ácido oleico (Ls) redujo la eficiencia de acción antimicrobiana de las emulsiones (Figura 8). Con base en el comportamiento del tamaño de partícula de la fase dispersa de las emulsiones, en el sentido de que la presencia de este compuesto causó incremento en esta dimensión, se cree que el ácido disolvió al aceite esencial, con lo cual redujo su dispersión en la emulsión, dando como resultado una reducción del contacto con la carga microbiana. Este hecho es importante pues, en vez de obtener el efecto benéfico de reducción del balance hidrofílico-lipofílico, se produjo un efecto adverso, lo cual sugiere que se debe valorar el uso de este tipo de aditivos cuando el objetivo es ejercer un control sobre la carga microbiana.

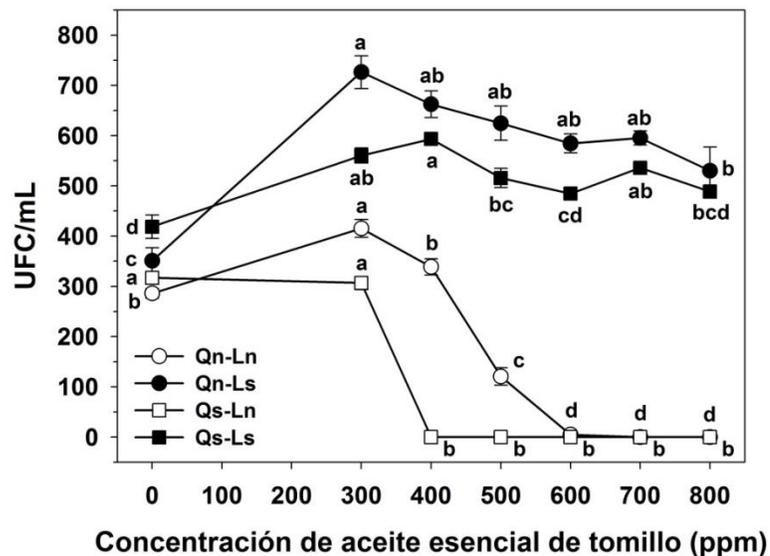


Figura 7. Efecto de la concentración de aceite esencial de tomillo en cuatro condiciones de tratamiento definidas como quitosano ausente y ácido oleico ausente (Qn-Ln), quitosano ausente y ácido oleico presente (Qn-Ls), quitosano presente y ácido oleico ausente (Qs-Ln), y quitosano ausente con ácido oleico presente (Qs-Ls). Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa al interior de cada tratamiento (Tukey, 0.05).

En tres de los cuatro casos (Qn-Ln, Qn-Ls y Qs-Ls) la presencia de aceite esencial en concentración de 300 mg L⁻¹ permitió mayor desarrollo de UFC mL⁻¹, lo cual también fue un resultado no esperado. En este caso, la hipótesis que se tiene es una respuesta de la carga microbiana ante una condición adversa, dada por la presencia del aceite esencial, estando éste presente aún en concentraciones bajas.

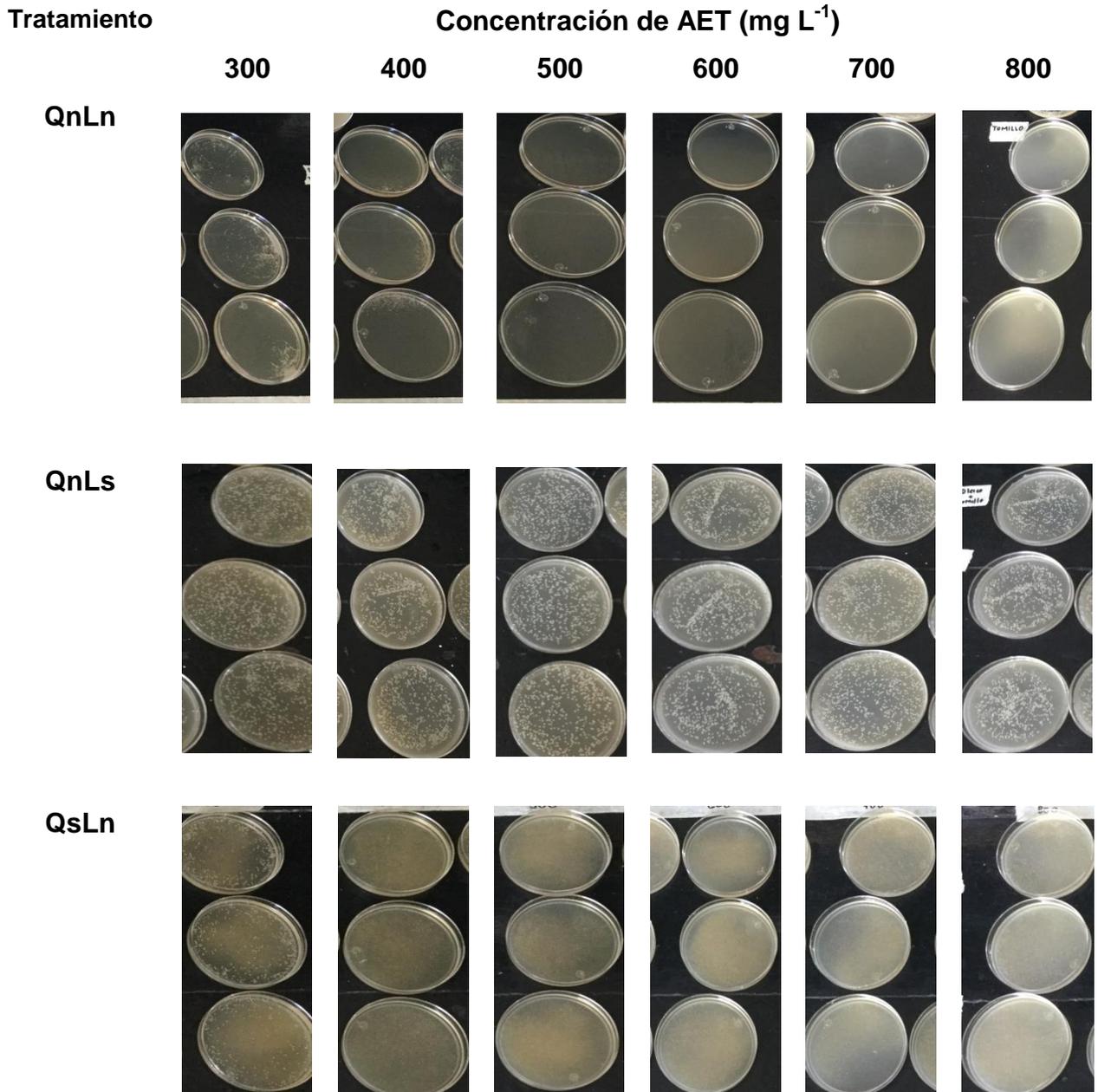


Figura 8. Efecto de la concentración de aceite esencial de tomillo en cuatro combinaciones de tratamientos.

QsLs

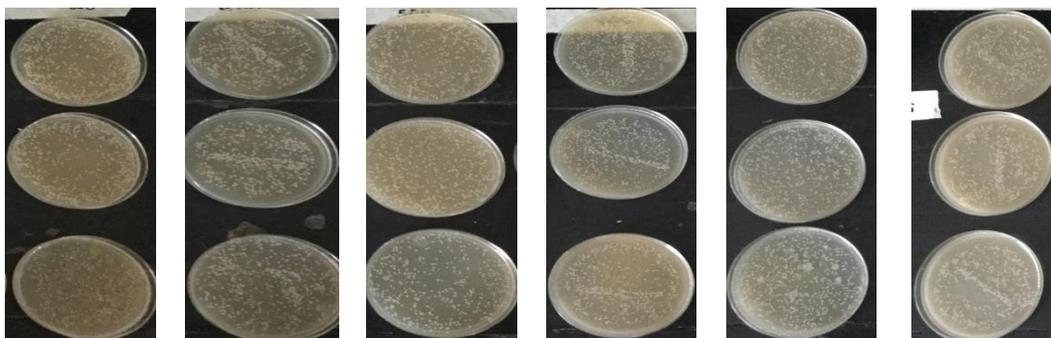


Figura 8. Efecto de la concentración de aceite esencial de tomillo en cuatro combinaciones de tratamientos (cont).

Por otro lado, en el tratamiento sin quitosano y sin ácido oleico (Qn-Ln) a partir de una concentración de 400 mg L^{-1} de aceite esencial se observó un decremento significativo ($P \leq 0.05$) en el desarrollo de la UFC mL^{-1} y a partir de una concentración de 600 ppm el desarrollo microbiano fue nulo (Figura 7), lo que identificó a este nivel como la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la carga microbiana del hongo seta. Estos resultados fueron similares a los reportados por Chang, McLandsborough y McClements (2015), quienes determinaron que se necesitan más de 400 mg L^{-1} de aceite de tomillo para inhibir el crecimiento de la levadura *Zygosaccharomyces bailii*. Sin embargo, el valor de la CMI fue menor cuando la emulsión libre de ácido oleico fue incorporada con quitosano (Figura 8), pues a partir de 400 ppm el desarrollo microbiano fue nulo, lo cual indicó que ocurrió un efecto sinérgico entre el aceite esencial y el quitosano, pues la presencia de este último potenció el efecto del primero. En general, está reportado el efecto antimicrobiano del quitosano y se ha determinado que su acción depende de factores tales como el peso molecular, el grado de desacetilación, el contenido de cargas positivas así como el pH y la temperatura, mismos que pudieron afectar su comportamiento frente al consorcio bacteriano utilizado (Chang *et al.*, 2015).

6.6 Conclusiones

La concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de tomillo fue de 600 mg L⁻¹.

La mezcla binaria de quitosano al 1 % y aceite esencial de tomillo a 400 mg L⁻¹ inhibió por completo el crecimiento bacteriano.

El ácido oleico, al encapsular al aceite esencial de tomillo limitó su efecto antimicrobiano y además originó un aumento de las UFC mL⁻¹.

7. APLICACIÓN DEL RECUBRIMIENTO COMESTIBLE Y EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO POSTCOSECHA DEL HONGO *PLEUROTUS OSTREATUS*

7.1 Resumen

El uso de recubrimientos comestibles es una tecnología prometedora para prolongar el tiempo de vida del hongo *Pleurotus ostreatus*. Se aplicaron cuatro diferentes técnicas de conservación sobre hongo seta rebanado: lavado con hipoclorito de sodio (T1), inmersión en solución antioxidante (T2) y aplicación de recubrimiento con quitosano al 1 % y aceite esencial de tomillo al 0.01 % (T3) y quitosano al 1 %, aceite esencial de tomillo al 0.01 % y ácido oleico al 0.4 % (T4). Los resultados indicaron que la luminosidad, la acidez, los sólidos solubles totales y las UFC mL⁻¹ de microorganismos mesófilos varían significativamente con la temperatura de almacenamiento, pero no con el tipo de tratamiento aplicado. La tasa de respiración, la pérdida de peso y la cantidad de azúcares totales disminuyeron con la aplicación de los recubrimientos comestibles, manteniendo la calidad del hongo seta y extendiendo su vida postcosecha. Esto sugiere que el almacenamiento a 4°C y la combinación de tratamientos puede extender la vida útil hasta 21 d.

Palabras clave: *Pleurotus ostreatus*, postcosecha, recubrimientos poliméricos.

APPLICATION OF EDIBLE COATING AND EVALUATION OF POST-HARVEST BEHAVIOR OF *PLEUROTUS OSTREATUS* MUSHROOM

7.2 Abstract

The use of edible coatings is a promising technology to prolong shelf-life of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. Four different conservation techniques were applied on slices of oyster mushroom: washing with sodium hypochlorite (T1), immersion in antioxidant solution (T2), coating application of chitosan 1 % and thyme essential oil 0.01 % (T3) and chitosan 1 %, thyme essential oil 0.01 % and oleic acid and 0.4 % (T4). Results indicated that lightness, acidity, total soluble solids, and mesophilic microorganisms vary significantly with temperature storage but not with the type of treatment. Respiration rate, weight loss and the amount of total sugars decreased with the application of edible coatings maintaining the quality of the oyster mushroom and extending postharvest life. Storage at 4 °C and the combination of treatments can extend shelf life up to 21 d.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*, coatings, weight loss, respiration, shelf-life.

7.3 Introducción

El hongo *Pleurotus ostreatus*, comúnmente conocido como hongo seta u hongo ostra, es el tercer hongo comestible más producido a nivel mundial, después de *Agaricus bisporus* y *Lentinus edodes* (Correa, Brugnari & Bracht, 2016). La producción de este hongo se ha incrementado en las últimas décadas debido a que el crecimiento del micelio y del cuerpo fructífero es rápido, los costos de producción son bajos, raramente es afectado por enfermedades y su adaptación a las condiciones ambientales requiere de un monitoreo mínimo (Fernandes *et al.*, 2015). Adicionalmente, se le ha considerado como un alimento nutracéutico, ya que además de ser una buena fuente de carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales tiene la capacidad de acumular metabolitos bioactivos con actividades terapéuticas (Mishra *et al.*, 2013).

Los hongos comestibles son altamente perecederos, principalmente por su alto contenido de agua, por la actividad enzimática y por la presencia de microorganismos (Jaworska *et al.*, 2011). Las bajas temperaturas (1-4 °C) son esenciales para extender el tiempo de vida útil de los productos frescos (Simón *et al.*, 2010). Sin embargo, no son suficientes para preservar la calidad de hongos enteros y rebanados. Uno de los métodos más comunes de tratamiento postcosecha en hongos comestibles es el lavado con soluciones antioxidantes. Otras formas de conservación incluyen el uso de humectantes, aplicación de inhibidores de tirosinasa, empaque en atmósfera modificada y aplicación de recubrimientos comestibles (Wrona, Bentayeb & Nerin, 2015). Respecto al uso de recubrimientos comestibles en hongo seta, la información reportada es escasa. Por ello, el objetivo de esta parte de la investigación fue aplicar los recubrimientos desarrollados y caracterizados previamente y evaluar el efecto producido sobre los parámetros físicos, químicos y microbiológicos del hongo seta mínimamente procesado.

7.4 Materiales y métodos

7.4.1 Material vegetal

Se utilizaron cuerpos fructíferos de hongo *Pleurotus ostreatus* provenientes de la empresa Niebla ubicada en San Felipe Teotitlán, Nopaltepec, Estado de México. Se cosecharon 30 kg de hongos de una sola nave de producción con la finalidad de evitar las posibles variaciones causadas por las condiciones ambientales.

7.4.2 Manejo postcosecha de hongo seta

El material vegetal se trasladó a una cámara frigorífica del Departamento de Ingeniería Agroindustrial de la Universidad Autónoma Chapingo, donde se mantuvo a 4 ± 1 °C durante 1 h. Posteriormente, se lavó y desinfectó sumergiéndolo en una solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio durante 3 min. Se cortaron tiras de hongo de aproximadamente 2 cm de ancho y 5 cm de largo, las cuales, para prevenir oscurecimiento, se trataron en la forma sugerida por Ventura-Aguilar *et al.* (2012), con una solución antioxidante de 1 % de ácido cítrico y 0.5 % de eritorbato de sodio. Se consideró un lote de hongo sin tratamiento antioxidante para tener oportunidad de deslindar el efecto de este tratamiento preliminar y a dicho lote se le nombró como T (testigo). En forma simultánea a la preparación del material vegetal se prepararon las formulaciones correspondientes a la emulsión de quitosano al 1 % y aceite esencial de tomillo al 0.01 % (E1) y la emulsión de quitosano al 1 %, aceite esencial de tomillo al 0.01 % y ácido oleico al 0.4 % (E2), éstas se aplicaron por el método de aspersión con una pistola de pintura (Paint Zoom). Se formaron 240 lotes de 125 g de hongo mínimamente procesado de los cuales se formaron ocho grupos de 30 lotes cada uno para establecer los siguientes tratamientos: (1) Testigo, (2) Solución antioxidante, (3) Solución antioxidante+E1 y (4) Solución antioxidante+E2. Cuatro grupos se almacenaron a temperatura ambiente (20 ± 2 °C) y los otros cuatro a una temperatura de refrigeración (4 ± 1 °C).

7.4.3 Evaluación de parámetros fisicoquímicos del hongo seta

Pérdida de peso

El peso se midió con una balanza electrónica con precisión de 0.01 g (Ohaus, USA). La pérdida de peso se expresó como el porcentaje de pérdida de peso con respecto al peso inicial. Los resultados se expresaron como un promedio de tres repeticiones.

Determinación del color

Las mediciones se realizaron utilizando un colorímetro HunterLab (MiniScan XE® Plus, Hunter Associates Laboratory Inc., Reston VA, EUA). Se efectuaron tres lecturas por cada repetición, que se tomaron en ubicaciones aleatorias de ambas caras del hongo. Los valores se obtuvieron en la escala CIE LAB (a^* , b^* , L^*) y se calculó el ángulo de matiz (H^*) y la cromaticidad en la forma mostrada por las Ecuaciones (1) y (2).

pH. La determinación del pH se llevó a cabo utilizando un potenciómetro (Conductronic modelo pH120, Micro precision calibration Inc. EUA). Para ello 10 g de hongo se molieron en un mortero con 40 mL de agua destilada y posteriormente la mezcla se filtró con papel Whatman No. 1. Las mediciones se reportaron como el valor medio de tres lecturas realizadas por cada tratamiento.

Acidez titulable. Se utilizaron 25 mL de la mezcla obtenida para la medición del pH, los cuales se titularon agregando NaOH 0.1 N hasta que el vire del indicador se ajustara a un pH de 8.2 (Villaescusa y Gil, 2003). Los resultados se expresaron en gramos de ácido cítrico por cada 100 mL extracto de hongo seta.

Sólidos solubles totales

Para determinar el contenido de los sólidos solubles totales se siguió el procedimiento descrito por Jiang *et al.* (2012b), en donde 5 g de muestra se molieron en un mortero y el jugo obtenido se analizó directamente en un refractómetro digital (Atago, Tokyo, Japan).

Etanol y acetaldehído

Las concentraciones de etanol y acetaldehído se determinaron adaptando el método de Davis y Chase (1969), en el que 10 g de muestra se cortaron finamente y se almacenaron en viales herméticos a una temperatura de (-20 °C). Posteriormente y previo al análisis, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se mantuvieron durante 10 min a 60 °C. Una vez transcurrido ese tiempo se obtuvo 1 mL de aire del espacio de cabeza de cada vial y se inyectó en un cromatógrafo de gases Varian (3400CX, USA), con columna capilar Chrompack® tipo poraplot Q, detector de conductividad térmica (TCD), detector por ionización de flama (FID) y las condiciones de trabajo utilizadas fueron de 160, 170 y 170 °C en la columna, inyector y detectores respectivamente.

Velocidad de respiración

La respiración se determinó a través de un método estático en la forma descrita por García-Cruz, Valle-Guadarrama, Salinas-Moreno & Luna-Morales (2016), el cual consistió en colocar el hongo seta de cada unidad experimental en un recipiente herméticamente cerrado por un lapso de 1 h. Inmediatamente después se tomó una muestra de 3 mL del volumen libre del recipiente y se colocó en un tubo de vidrio hermético (Vacutainer®, Becton Dickinson de México, S.A. de C.V.) para poder determinar la concentración final de CO₂. Posteriormente, se preparó una solución de trabajo de NaHCO₃ al 0.5 % (p/p) a la cual se le adicionaron unas gotas de azul de bromotimol al 0.02 % hasta que se obtuvo una transmitancia de 33.0. De dicha solución se inyectaron 4 mL a cada tubo, se aplicó agitación vigorosa durante 15 s y se leyó transmitancia (%T) en un espectrofotómetro (DR 500 UV-vis HACH) a 615 nm. La cuantificación de CO₂ se obtuvo a partir de una curva tipo que se realizó utilizando mezclas de concentración conocida en un rango de 0.2 a 12.5 %.

7.4.4 Evaluación microbiológica

Se determinó la cuenta de bacterias mesófilas aerobias en placa de acuerdo a Jiang *et al.* (2012a) con algunas modificaciones. Se tomaron asépticamente 25 g de muestra de cada una de las unidades experimentales y se diluyeron en 200 mL de agua estéril aplicando agitación vigorosa durante 30 s. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas (10^{-1} - 10^{-6}) en tubos que contenían 9 mL de agua estéril. De cada tubo se inocularon 0.1 mL en cajas Petri y posteriormente se agregaron 15 mL de agar nutritivo para bacterias (Bioxon Becton Dickinson de México, S.A. de C.V), se mezclaron hasta lograr una completa incorporación del inóculo en el medio y se dejaron solidificar. La incubación se llevó a cabo en estufa (Thermo Scientific, USA), a una temperatura de 35 ± 2 °C durante 48 h. Transcurrido este tiempo se procedió a contar las colonias desarrolladas y los resultados se expresaron en UFC g⁻¹.

7.4.5 Análisis estadístico

Esta fase experimental se condujo en forma congruente con un arreglo factorial $2\times 4\times 9$, alojado en un diseño completamente al azar. La temperatura constituyó uno de los factores de variación y tuvo dos niveles (4 y 20 °C). Los tratamientos constituyeron el segundo factor de variación y, asimismo, el tiempo el tercer factor. Los datos de las variables respuesta se sometieron a análisis de varianza complementado con pruebas de comparación de medias (Tukey, 0.05). Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado. Se utilizó el paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 1999).

7.5 Resultados y discusión

7.5.1 Pérdida de peso

El efecto de la temperatura y la aplicación de recubrimientos comestibles fueron significativos ($P \leq 0.05$) en la pérdida de peso del hongo seta (Cuadro 11).

Cuadro 11. Valores percentiles de la distribución de Fisher (F0.05) con ($\alpha=0.05$) y valores de F correspondientes al análisis de varianza de la aplicación de recubrimientos de quitosano, ácido oleico y aceite esencial de tomillo sobre hongo seta (*Pleurotus ostreatus*).

Variable	Factor de variación							Error	CV (%)
	T (°C)	R (trat)	Φ (día)	TxR	Tx Φ	Rx Φ	TxRx Φ		
gl	1	3	8	3	2	24	6	96	
F _{0.05}	3.94	2.70	2.04	2.70	3.09	1.63	2.19		
	Variables respuesta								
%PP	693*	66.97*	218.24*	5.15*	57.68*	6.71*	1.52 ^{ns}		12.50
Acidez	1313.14*	1.47 ^{ns}	549.65*	0.28 ^{ns}	256.30*	0.99 ^{ns}	0.58 ^{ns}		10.51
SST	40.94*	1.06 ^{ns}	12.29*	2.42 ^{ns}	9.75*	2.52*	1.45 ^{ns}		11.30
pH	579.70*	61.73*	218.77*	20.62*	41.79*	11.97*	32.21*		2.58
Azúcares	689.11*	35.95*	76.81*	4.45*	1.10 ^{ns}	9.77*	19.71*		19.11
Metabolitos	1598.02*	39.15*	89.44*	10.11*	50.00*	9.51*	16.20*		10.63
Respiración	108.99*	245.47*	39.45*	11.12*	158.96*	7.52*	10.79*		32.77
Mesófilos	1031.19*	2.21 ^{ns}	76.60*	3.78*	298.55*	0.45 ^{ns}	1.21 ^{ns}		49.91

^z Los símbolos * y ns significan efecto significativo y no significativo, respectivamente, de los factores de variación sobre el efecto de la aplicación de recubrimientos.

La mayor pérdida de peso se concentró en los hongos almacenados a temperatura ambiente (Cuadro 12). Este comportamiento era esperado ya que la velocidad a la cual se pierde la humedad depende del gradiente de presión de vapor de agua que existe entre el hongo y la atmósfera circundante y se dice que a menor temperatura la diferencia de presión se reduce y consecuentemente se evita la pérdida de peso (Jiang *et al.*, 2012b). Los recubrimientos hechos a base de emulsiones de quitosano-tomillo (tratamiento 3) y quitosano-tomillo-oleico (tratamiento 4) causaron que la pérdida de peso fuera significativamente menor respecto al tratamiento con antioxidante. Esto muy probablemente se debió a los compuestos lipídicos presentes en los recubrimientos, los cuales actúan como barreras y restringen la transferencia de agua.

Cuadro 12. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura y los recubrimientos comestibles sobre la pérdida de peso en hongo seta.

Fuente de variación	de	% Pérdida de peso	DSH
<u>Temperatura</u>			
20 °C		9.62 a	0.38
4 °C		7.54 b	
<u>Tratamientos</u>			
(1) Testigo		7.20 b	0.62
(2) Antioxidante		10.63 a	
(3) E. Q+T		7.08 b	
(4) E. Q+T+L		7.32 b	
<u>Días</u>			
3		3.37 e	1.19
6		7.17 cd	
9		8.93 b	
12		6.13 d	
15		8.12 bc	
18		9.16 b	
21		8.53 b	
24		12.72 a	
27		13.04 a	

^z Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). Los valores entre paréntesis corresponden a error estándar. DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

En la Figura 9 se muestra el efecto del tiempo en la pérdida de peso de los ocho tratamientos. Al cabo de 9 d los cuatro tratamientos a temperatura ambiente mostraron un deterioro completo y pérdidas de peso superiores al 12 %, en contraste con el tratamiento testigo y el tratamiento de Tom.Qui.Ole en refrigeración, que lograron mantenerse hasta los 27 d con pérdidas entre 9-11 %. A los 3 d de almacenamiento, los tratamientos ensayados a temperatura ambiente presentaron una pérdida de peso entre el 4-5 %, mientras que aquéllos almacenados en refrigeración registraron pérdidas similares, pero hasta el día 12, lo cual pone de manifiesto el efecto de la temperatura para reducir las pérdidas. Comúnmente, una pérdida de 5-6 % del peso fresco en frutas y vegetales conduce a la depreciación del valor comercial (Guillaume *et*

al., 2010). Por lo tanto, las muestras del tratamiento testigo y el recubrimiento de tomillo a 4 °C podrían apreciarse comercialmente dentro de los primeros 15 d de almacenamiento, las muestras correspondientes al tratamiento de Tom.Qui.Ole dentro de los primeros 12 d y todas las demás sólo dentro de los tres primeros días. Varios autores han reportado entre 2-20 % de pérdida de peso para diferentes tipos de hongos comestibles y bajo múltiples circunstancias de almacenamiento y de tratamientos (Jiang *et al.*, 2012b; Jiang, Feng, Zheng & Li, 2013b; Jafri *et al.*, 2013; Lozano-Grande, 2014). Sin embargo, en su mayoría han reportado dichos resultados para hongos enteros. En el presente trabajo, los hongos fueron cortados en tiras y con ello se incrementó el área superficial de contacto que generó mayor susceptibilidad a la deshidratación (Villaescusa y Gil, 2003). No obstante de lo anterior, las pérdidas no superaron el 17 % y el tiempo se pudo extender por más de 20 d, demostrando la efectividad de los tratamientos ensayados.

7.5.2 Acidez titulable

El efecto de la temperatura fue significativo ($P \leq 0.05$) en la acidez titulable del hongo seta. Por el contrario, el efecto de los tratamientos fue no significativo (Cuadro 11). En el caso de los hongos almacenados a temperatura ambiente la acidez titulable disminuyó a lo largo del tiempo (Figura 10). Similar comportamiento mostraron los hongos almacenados en refrigeración; sin embargo, a partir del día 15 y hasta el día 27 el comportamiento de esta variable fue constante (Cuadro 13). Los valores obtenidos para acidez oscilan entre los 0.020 g de ácido cítrico 100 mL⁻¹ al tercer día de almacenamiento y 0.02 g y 0.05 g después de 9 d para los hongos a temperatura ambiente y 27 d para los hongos en refrigeración, respectivamente.

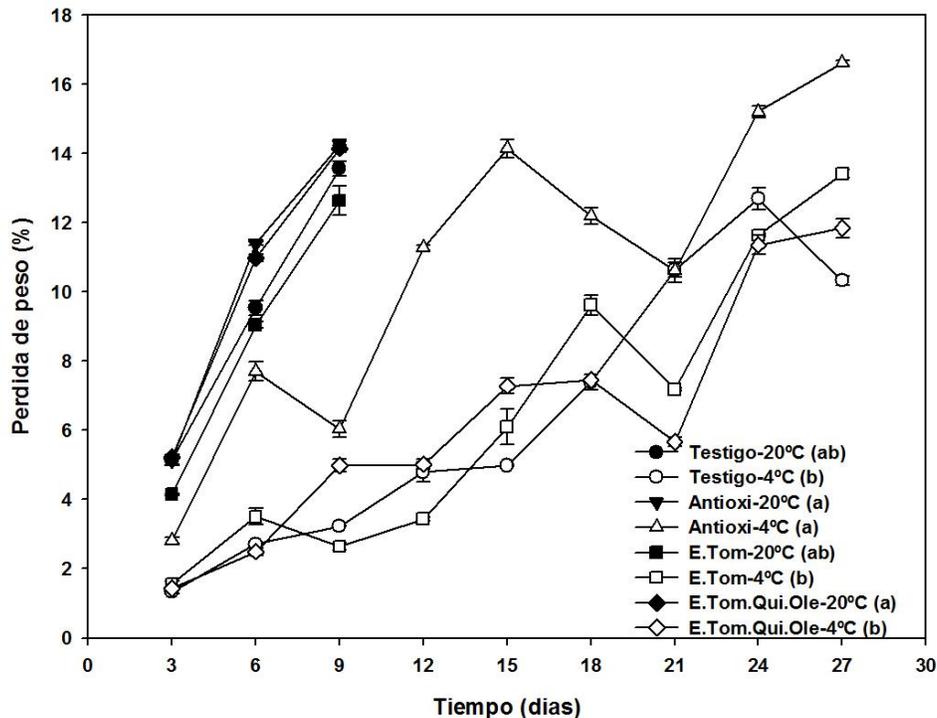


Figura 9. Efecto de la aplicación de recubrimientos sobre la pérdida de peso en hongo seta. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos (DMS, 0.05). La barra en cada punto corresponde al error estándar.

Los resultados obtenidos concuerdan con los reportado por Villaescusa y Gil (2003), quienes reportan valores entre 0.10-0.09 g de ácido cítrico en hongo seta después de 11 d de almacenamiento.

7.5.3 Sólidos solubles totales

El efecto de la temperatura fue significativo ($P \leq 0.05$) en los sólidos solubles totales (SST) del hongo seta (Cuadro 11). La temperatura de refrigeración produjo que los SST fueran significativamente mayores en el hongo seta (Cuadro 14). Tao, Zhang, Hangqing y Jincai, (2006) han reportado un aumento de los SST en *Agaricus bisporus* a una temperatura de 4 ± 1 °C. La aplicación de los recubrimientos de quitosano, aceite esencial de tomillo y ácido oleico no afectó significativamente el contenido de SST, por lo cual, podemos inferir que la actividad metabólica de los hongos recubiertos fue similar a la de los hongos del tratamiento testigo, dando por hecho que los recubrimientos no aceleraron

el proceso de senescencia. Resultados similares han sido reportados por Bautista-Baños, Hernández-López, Bosquez-Molina y Wilson (2003), quienes aplicaron un recubrimiento de quitosano en papaya y encontraron los mismos SST en las muestras testigo. Respecto al efecto del tiempo, se observó un aumento significativo ($P \leq 0.05$; Cuadro 13) de los SST a partir del día 12 y registrando el valor más alto al día 27. A medida que aumenta el tiempo de almacenamiento se solubilizan los polisacáridos de la pared celular, lo cual puede contribuir al aumento de los SST (Jiang *et al.*, 2012a).

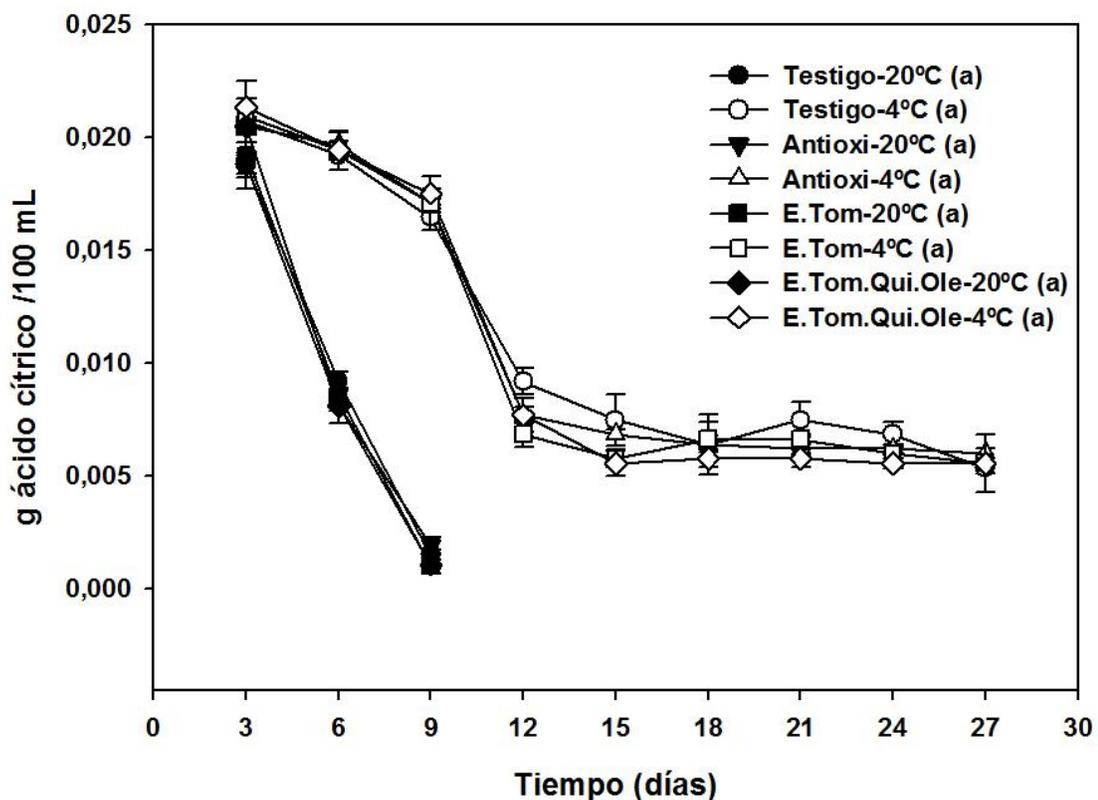


Figura 10. Acidez titulable en hongo seta almacenado a 20 y 4°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos basada en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra en cada punto corresponde al error estándar.

7.5.4 pH

La temperatura y la aplicación de recubrimientos comestibles fueron efectos significativos ($P \leq 0.05$) en el pH del hongo seta (Cuadro 11).

Cuadro 13. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre la acidez titulable en hongo seta.

Fuente de variación	Acidez titulable	DSH
<u>Temperatura</u>		
20 °C	0.0097 b	0.0004
4 °C	0.0106 ^a	
<u>Tratamientos</u>		
(1) Testigo	0.0107 a	0.0007
(2) Antioxidante	0.0104 a	
(3) E. Q+T	0.0102 a	
(4) E. Q+T+L	0.0103 a	
<u>Días</u>		
3	0.0200 a	0.0013
6	0.0139 b	
9	0.009 c	
12	0.007 d	
15	0.006 e	
18	0.006 e	
21	0.006 e	
24	0.006 e	
27	0.005 e	

²Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

El pH fue mayor cuando la temperatura de almacenamiento fue de 20 °C, por lo cual este resultado se puede asociar a un mayor deterioro en los hongos dado que las reacciones bioquímicas y fisiológicas se ven favorecidas a esas condiciones afectando la calidad y la madurez de los hongos en postcosecha (Fernandes *et al.*, 2012). El tratamiento testigo y el tratamiento del recubrimiento de quitosano, aceite esencial de tomillo y ácido oleico no mostraron diferencias significativas en el pH (Cuadro 15). El tratamiento con antioxidante presentó el pH más bajo, lo cual era de suponerse ya que la

solución con la que se asperjaron los hongos tenía ácido cítrico. El efecto del tiempo fue significativo aumentando en una unidad el pH del día 3 al día 27.

Cuadro 14. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre los sólidos solubles totales en hongo seta.

Fuente de variación	Sólidos solubles totales °Brix	DSH
<u>Temperatura</u>		
20 °C	2.40 b	0.127
4 °C	3.15 a	
<u>Tratamientos</u>		
(1) Testigo	3.10 a	0.206
(2) Antioxidante	2.93 a	
(3) E. Q+T	2.89 a	
(4) E. Q+T+L	2.91 a	
<u>Días</u>		
3	2.47 f	0.396
6	2.85 def	
9	2.62 ef	
12	3.01 cde	
15	3.25 bc	
18	3.18 bcd	
21	2.91 cde	
24	3.49 ab	
27	3.77 a	

^z Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

Cuadro 15. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre el pH en hongo seta.

Fuente de variación	pH	DSH
<u>Temperatura</u>		
20 °C	7.23 a	0.066
4 °C	6.54 b	
<u>Tratamientos</u>		
(1) Testigo	6.87 a	0.106
(2) Antioxidante	6.48 c	
(3) E. Q+T	6.60 b	
(4) E. Q+T+L	6.89 a	
<u>Días</u>		
3	6.30 de	0.204
6	6.35 d	
9	7.55 a	
12	6.28 de	
15	6.13 e	
18	6.14 e	
21	6.72 c	
24	7.24 b	
27	7.63 a	

^z Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

En la Figura 11 se puede observar el comportamiento del pH a través del tiempo de cada uno de los tratamientos aplicados en hongo seta. El aumento del pH por arriba de las ocho unidades al cabo de 9 d provocó alcalinización en los hongos almacenados a temperatura ambiente y, por ende, una rápida descomposición, mientras que los hongos en refrigeración alcanzaron tales

valores hasta el día 27. Algunos autores reportan que el pH se mantiene constante a bajas temperaturas, lo cual pudo propiciar un mayor tiempo de conservación del hongo. Para los tratamientos almacenados a 20 °C el pH varió de manera significativa entre 5.5-8.5 unidades. En cuanto a los tratamientos almacenados en refrigeración las tendencias de comportamiento fueron similares y no se registraron diferencias significativas en tres de estos tratamientos.

7.5.5 Azúcares totales

El efecto de la temperatura, la aplicación de recubrimientos comestibles y el tiempo fueron significativos ($P \leq 0.05$) en la concentración de azúcares totales del hongo seta (Cuadro 11). La cantidad de azúcares presentes en los hongos almacenados a 4 °C fue estadísticamente superior respecto a la temperatura de 20 °C. En cuanto a los tratamientos, los hongos lavados con la solución antioxidante de ácido cítrico y eritorbato de sodio lograron retener la mayor cantidad de azúcares en sus tejidos, seguidos por los hongos del tratamiento control. Atri, Sharma, Joshi, y Gulati, (2013) reportaron la presencia de sacarosa (0.34-2.01 %), glucosa (0.553-0.791 %) y xilosa (0.01 %) cuando analizaron distintas especies de hongos del género *Pleurotus*. La cantidad de azúcares totales tuvo un comportamiento irregular a lo largo del tiempo, ya que se mantuvo constante en los primeros 12 d de almacenamiento y al día 15 presentó una concentración máxima, para posteriormente disminuir significativamente (Cuadro 16).

En la Figura 12 se observa el cambio en la concentración de azúcares totales de los hongos sometidos a los diferentes tratamientos. Las tendencias en el comportamiento de los tratamientos a 4 °C son muy irregulares, sin embargo, se puede observar en general una tendencia a la disminución de los azúcares en todos los casos.

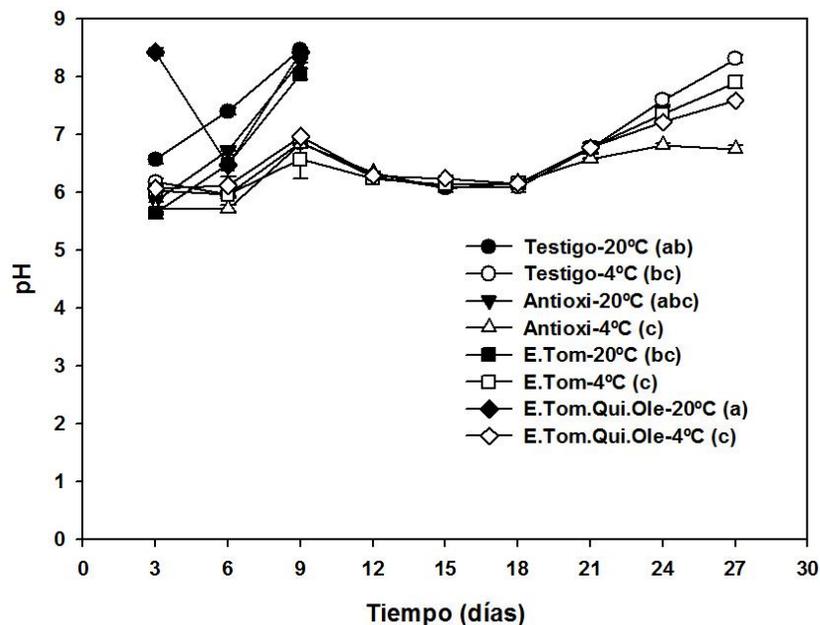


Figura 11. Variación del pH en hongo seta almacenado a 20 y 4 °C. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos basada en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra en cada punto corresponde al error estándar.

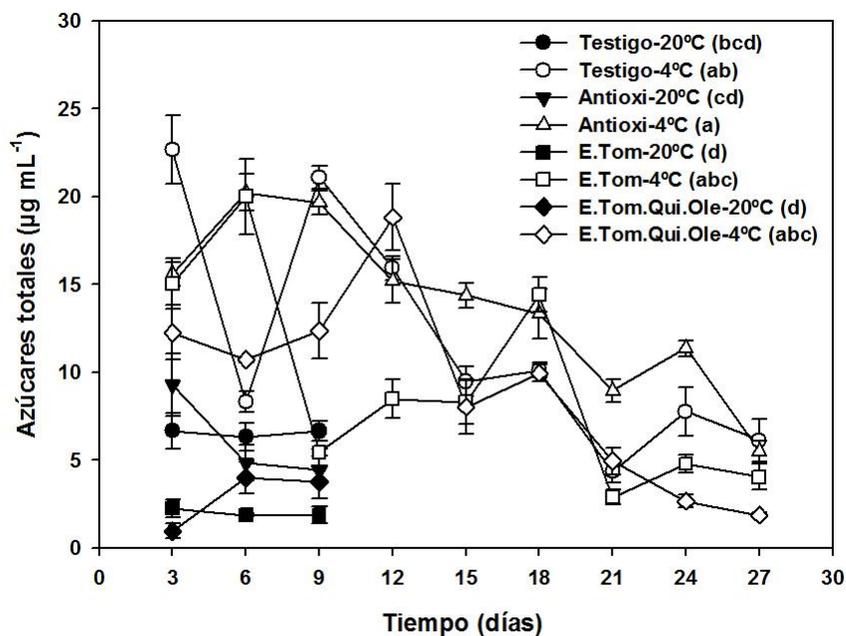


Figura 12. Variación de la concentración de azúcares totales en hongo seta almacenado a 20 y 4°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos basada en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra en cada punto corresponde al error estándar.

Cuadro 16. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre los azúcares totales en hongo seta.

Fuente de variación	Azúcares totales	DSH
<u>Temperatura</u>		
20 °C	4.08 b	0.669
4 °C	10.85 a	
<u>Tratamientos</u>		
(1) Testigo	10.28 b	1.072
(2) Antioxidante	11.79 a	
(3) E. Q+T	7.32 c	
(4) E. Q+T+L	7.32 c	
<u>Días</u>		
3	10.03 bc	2.071
6	9.32 c	
9	9.15 c	
12	14.60 a	
15	10.04 bc	
18	11.95 b	
21	5.28 de	
24	6.64 d	
27	4.38 e	

^z Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

7.5.6 Metabolitos totales

El efecto de la temperatura, la aplicación de recubrimientos comestibles y el tiempo fueron significativos ($P \leq 0.05$) en la producción de metabolitos totales en el hongo seta (Cuadro 11). La producción de metabolitos anaerobios (etanol y acetaldehído) está asociada a la actividad fermentativa de los hongos y ésta a su vez se ve influenciada por distintos factores, entre ellos la disposición de

oxígeno y la temperatura. A 4 °C la concentración de metabolitos totales fue significativamente menor que a 20 °C (Cuadro 17). Las bajas temperaturas reducen de manera considerable el metabolismo y consecuentemente la producción de los productos de fermentación.

Cuadro 17. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre los metabolitos totales en hongo seta.

Fuente de variación	de	Metabolitos totales	DSH
<u>Temperatura</u>			
20 °C		6.99 a	0.160
4 °C		2.95 b	
<u>Tratamientos</u>			
(1) Testigo		3.39 d	0.259
(2) Antioxidante		3.79 c	
(3) E. Q+T		4.47 a	
(4) E. Q+T+L		4.17 b	
<u>Días</u>			
3		4.65 bc	0.497
6		5.09 ab	
9		5.26 a	
12		4.26 c	
15		4.46 cc	
18		3.60 d	
21		2.85 e	
24		1.43 f	
27		1.14 f	

^z Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$. E.Q+T: Emulsión de quitosano al 1 % y aceite esencial de tomillo al 0.1 %. E.Q+T+L: Emulsión de quitosano al 1 % , aceite esencial de tomillo al 0.1 % y ácido oleico al 0.9 %.

Respecto a los tratamientos, la aplicación de los recubrimientos 3 y 4 propició un aumento significativo en los metabolitos totales, debido quizá a la disminución en la disponibilidad de oxígeno. En este sentido, las propiedades de barrera a los gases de los recubrimientos comestibles aplicados juegan un

rol importante en el cambio de las concentraciones internas de O₂. En los 9 primeros días se observaron las concentraciones más altas de los metabolitos, esto se debe a la interacción del factor temperatura con el factor tiempo (Cuadro 11), ya que los hongos almacenados en temperatura ambiente presentaron una rápida descomposición que no permitió el monitoreo de los parámetros químicos más allá de 9 d.

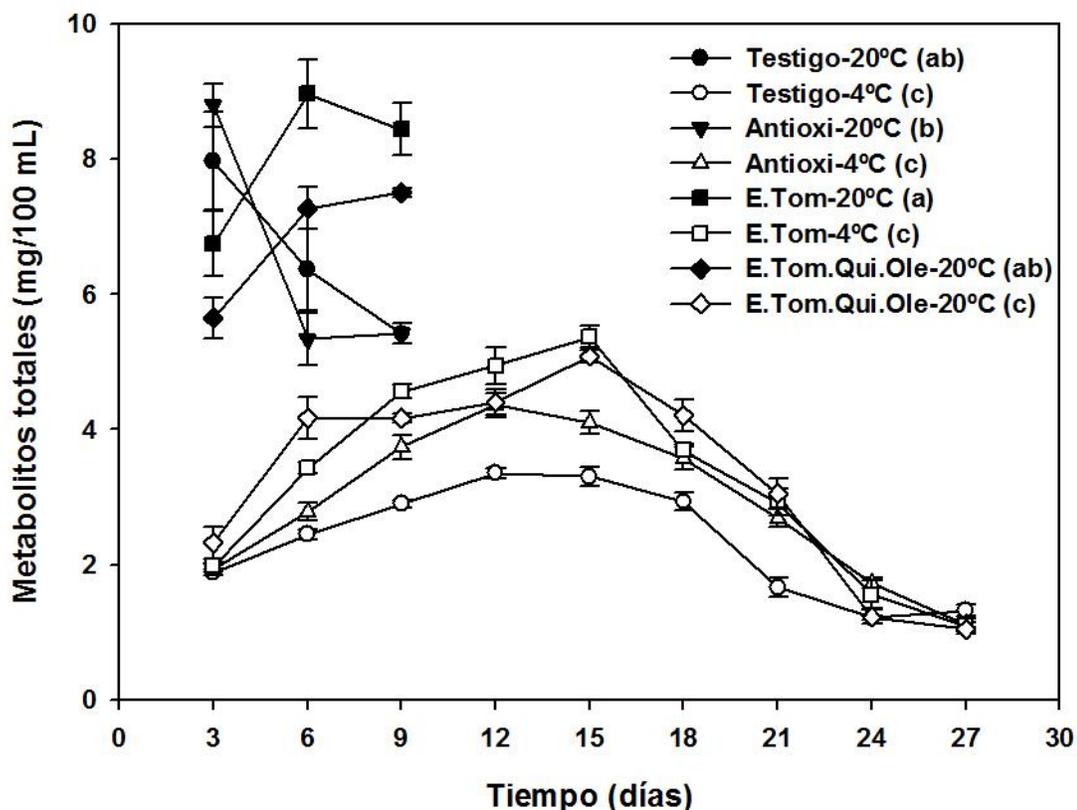


Figura 13. Variación de los metabolitos totales en hongo seta almacenado a 20 y 4°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos basada en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra en cada punto corresponde al error estándar.

El comportamiento de la concentración de metabolitos totales no presentó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos almacenados a 4 °C (Figura 13) Por otro lado, el tratamiento que consistió en la aplicación del recubrimiento de quitosano y aceite esencial de tomillo y el almacenamiento a

20 °C registró la mayor cantidad de metabolitos totales. Las diferencias entre las concentraciones de los tratamientos a temperatura ambiente y los de refrigeración fueron sumamente drásticas, ya que en el caso de éstos últimos en ningún día se superaron los 5 mg 100 mL⁻¹, mientras que para los tratamientos a 20 °C las concentraciones fueron superiores desde los primeros días del experimento, incidiendo nuevamente en el efecto del factor temperatura sobre esta variable.

7.5.7 Respiración

El efecto de la temperatura, la aplicación de recubrimientos comestibles y el tiempo fueron significativos ($P \leq 0.05$) en la respiración, reportada como producción de CO₂, en el hongo seta (Cuadro 11). La producción de CO₂ en la condición de temperatura ambiente fue significativamente mayor respecto a la producción registrada en refrigeración (Cuadro 18). Por ello, la descomposición de los hongos fue sumamente evidente en el almacenamiento a 20 °C. Las bajas temperaturas (1-4 °C) son el principal factor responsable para extender el tiempo de vida de hongos enteros y rebanados, ya que reducen los procesos que causan la pérdida de calidad, entre ellos la respiración (Simón *et al.*, 2010).

Los hongos sujetos al tratamiento control mostraron las concentraciones más altas de CO₂, indicando que su velocidad de respiración fue mayor. Los hongos tratados con los recubrimientos mostraron baja producción de CO₂, lo cual pudo ser consecuencia de las barreras semipermeables al intercambio de gases que producen los recubrimientos comestibles. Oms-Oliu, Soliva-Fortuny y Martín-Belloso (2008) reportaron que los recubrimientos formulados con polisacáridos han sido ampliamente utilizados para extender el tiempo de vida útil de frutas y vegetales por el efecto en la reducción de la respiración. Respecto al periodo de almacenamiento, la mayor tasa respiratoria se encontró en el tercer día y a partir de ahí se observó un decremento significativo en esta variable, estableciéndose un comportamiento constante desde el día 12 hasta el día 27.

Cuadro 18. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre la respiración en hongo seta.

Fuente de variación	de	Respiración mL kg⁻¹ h⁻¹	DSH
<u>Temperatura</u>			
20 °C		76.06 a	5.97
4 °C		38.24 b	
<u>Tratamientos</u>			
(1) Testigo		113.84 a	9.63
(2) Antioxidante		26.65 b	
(3) E. Q+T		28.30 b	
(4) E. Q+T+L		21.99 b	
<u>Días</u>			
3		100.47 a	18.49
6		45.81 b	
9		24.19 c	
12		46.14 b	
15		37.00 b	
18		47.61 b	
21		31.38 bc	
24		31.40 bc	
27		37.87 bc	

^z Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$. E.Q+T: Emulsión de quitosano al 1 % y aceite esencial de tomillo al 0.1 %. E.Q+T+L: Emulsión de quitosano al 1 %, aceite esencial de tomillo al 0.1 % y ácido oleico al 0.9 %.

En la Figura 14 se puede observar que el tratamiento testigo a 20 °C presentó las concentraciones más altas de CO₂, hecho que favoreció la rápida descomposición de los hongos. Varios autores mencionan que el tiempo de vida útil de los hongos a temperatura ambiente es de 1-3 d y que esto se debe principalmente a las altas tasas de respiración, que hacen de las setas un alimento sumamente perecedero (Ares *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2012). En

general, el patrón de comportamiento de la tasa respiratoria de los tratamientos almacenados a 4 °C fue muy parecido y no registró diferencias significativas. Por el contrario, el tratamiento testigo almacenado a esa temperatura tuvo una mayor producción de CO₂, lo que puede representar que los recubrimientos ejercieron una barrera al intercambio de O₂ y CO₂. Jiang *et al.* (2012b) reportaron que el uso de recubrimientos de glucosa-quitano fue efectivo en reducir la tasa de respiración del hongo shiitake y atribuyeron este resultado a la eficiencia de los recubrimientos para restringir el intercambio de gases entre el hongo y la atmósfera durante el almacenamiento.

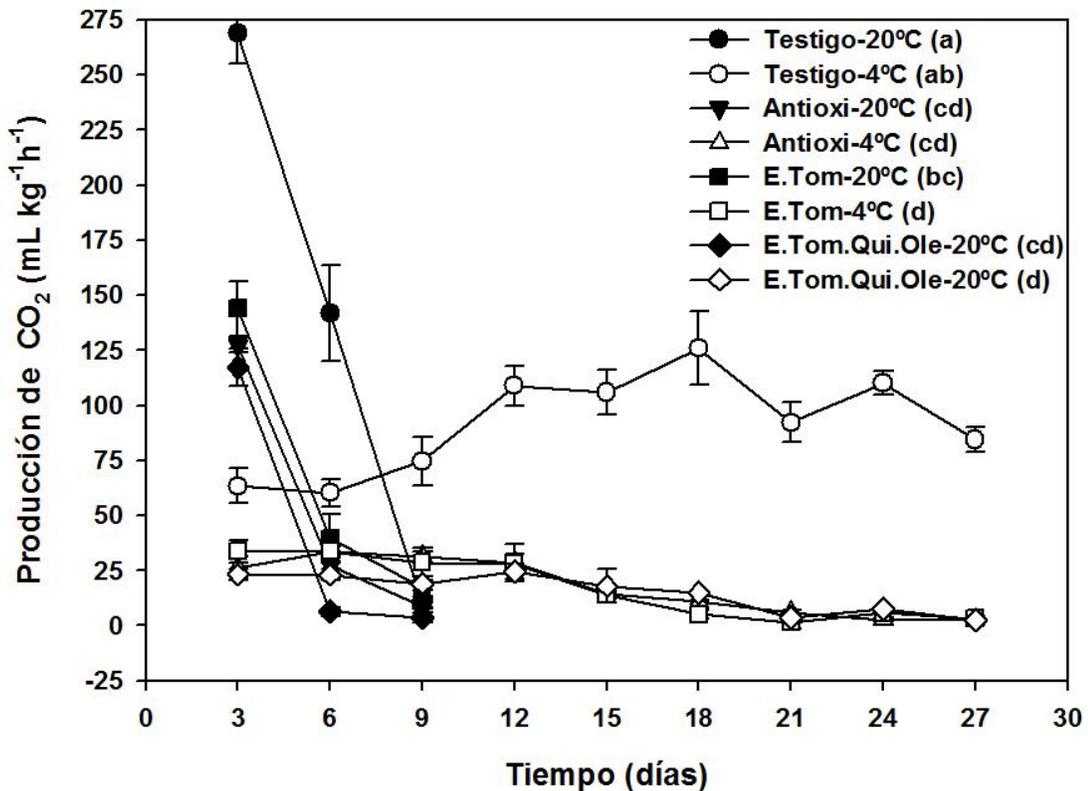


Figura 14. Comportamiento de la tasa respiratoria en hongo seta almacenado a 20 y 4 °C. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos basada en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra en cada punto corresponde al error estándar.

7.5.8 Microorganismos mesófilos aerobios

La temperatura y el tiempo afectaron significativamente las UFC mL⁻¹ de microorganismos mesófilos aerobios en hongo seta, pero no así los

tratamientos ($P \leq 0.05$; Cuadro 11). La cantidad de bacterias mesófilas encontradas en los hongos a temperatura ambiente fue estadísticamente superior a la cantidad registrada en los hongos a temperatura de refrigeración (Cuadro 19). Este comportamiento fue consecuencia del aumento en la velocidad de las reacciones químicas y enzimáticas de las células que condujeron a un incremento en el crecimiento bacteriano (Madigan, Martinko & Parker, 2003).

La respuesta de los hongos a los cuatro tratamientos no mostro diferencia significativa, hecho no esperado, pues en la fase anterior previa se realizaron pruebas *in vitro* de la capacidad antibacteriana de los componentes de las emulsiones que constituían los tratamientos 3 y 4 obteniendo resultados positivos. Además, Simón *et al.* (2010) reportaron que la aplicación de una solución de 10 g L^{-1} de ácido cítrico en hongos rebanados produjo una reducción de 1.3 log en los microorganismos mesófilos. Es probable que la baja concentración de aceite esencial de tomillo utilizada en esta fase de investigación (1000 mg L^{-1}) sea la responsable de no haber encontrado diferencias respecto al testigo, ya que varios autores reportan actividad antimicrobiana en concentraciones que van desde 1-10 %. Por otro lado, las cuentas microbianas aumentaron drásticamente del día 3 al día 9, posteriormente se mantuvieron constantes por espacio de 12 días y finalmente volvieron a registrar un aumento significativo en las últimas etapas del experimento.

El patrón de comportamiento de las unidades formadoras de colonias (UFC mL^{-1}) de las bacterias mesófilas fue muy similar entre los cuatro tratamientos almacenados a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 15). El primer conteo de bacterias se realizó al día 3 y las UFC mL^{-1} no superaron los 4 log, hecho que se atribuye al lavado con la solución de hipoclorito de sodio que se efectuó previo a la aplicación de los tratamientos, ya que algunos autores mencionan que las cargas iniciales de microorganismos mesófilos en hongos cultivados oscilan entre los 6.2-7.2 log UFC g^{-1} (Simón *et al.*, 2010). La incidencia de bacterias fue más severa en el día 9, ya que las cuentas superaron los 7 log. En este punto los hongos

almacenados a 20 °C mostraban un alto grado de deterioro y el final de su vida útil se pudo deber precisamente a las altas poblaciones microbianas que causan el reblandecimiento de los tejidos y la coloración café (Gao *et al.*, 2014), cambios que eran visibles en todos los tratamientos. Respecto a los tratamientos almacenados a 4 °C, al cabo de 27 d las cuentas no fueron mayores a 7 log, denotando nuevamente la influencia de la temperatura para retardar los daños provocados por los microorganismos.

7.5.9 Color

La temperatura y el tiempo afectaron significativamente los parámetros de color en hongo seta. El efecto de los tratamientos sólo fue significativo para las variables hue y croma (Cuadro 20). Los valores de luminosidad de los hongos almacenados a 4 °C fueron significativamente más altos que en aquéllos almacenados a 20 °C, lo cual demuestra el efecto positivo del manejo en baja temperatura para retrasar el deterioro de los hongos (Cuadro 21). Mahopatra Bira, Kerry, Frias y Rodrigues (2010) mencionaron que la temperatura juega un rol importante para controlar la degradación de la textura y el color. Los cuatro tratamientos ensayados generaron valores similares de L*, lo que significa que los recubrimientos de quitosano, aceite esencial de tomillo y ácido oleico no afectaron negativamente la luminosidad de los hongos. Tzoumaki, Biliaderis y Vasilakakis (2009) aplicaron un recubrimiento de carboximetilcelulosa y no encontraron diferencias significativas en la luminosidad entre los espárragos blancos cubiertos y los no recubiertos. En cuanto al efecto del tiempo, se observó un decremento significativo de los valores de L* a partir del día seis. Los valores más bajos de este parámetro se presentaron al día nueve y al día 27, que correspondieron a un alto grado de senescencia para los hongos almacenados a 4 y a 20 °C, respectivamente. Resultados similares han sido presentados por Liu y Wang (2012), quienes indicaron que los hongos almacenados en temperatura ambiente presentaron oscurecimiento después de 3 d de almacenamiento, lo cual se volvió más severo al día 9.

Cuadro 19. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre las UFC mL⁻¹ de microorganismos mesófilos aerobios en hongo seta.

Fuente de variación	Mesófilos aerobios UFC mL⁻¹	DSH
<u>Temperatura</u>		
20 °C	8625219 ^a	435293
4 °C	168742 b	
<u>Tratamientos</u>		
(1) Testigo	2635805 a	702226
(2) Antioxidante	2311212 a	
(3) E. Q+T	2235253 a	
(4) E. Q+T+L	1949173 a	
<u>Días</u>		
3	350 d	1.35E6
6	4983821 b	
9	7954565 a	
12	3125 d	
15	1698 d	
18	2243 d	
21	39542 d	
24	80250 cd	
27	1390000 c	

^z Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$. E.Q+T: Emulsión de quitosano al 1 % y aceite esencial de tomillo al 0.1 %. E.Q+T+L: Emulsión de quitosano al 1 %, aceite esencial de tomillo al 0.1 % y ácido oleico al 0.9 %.

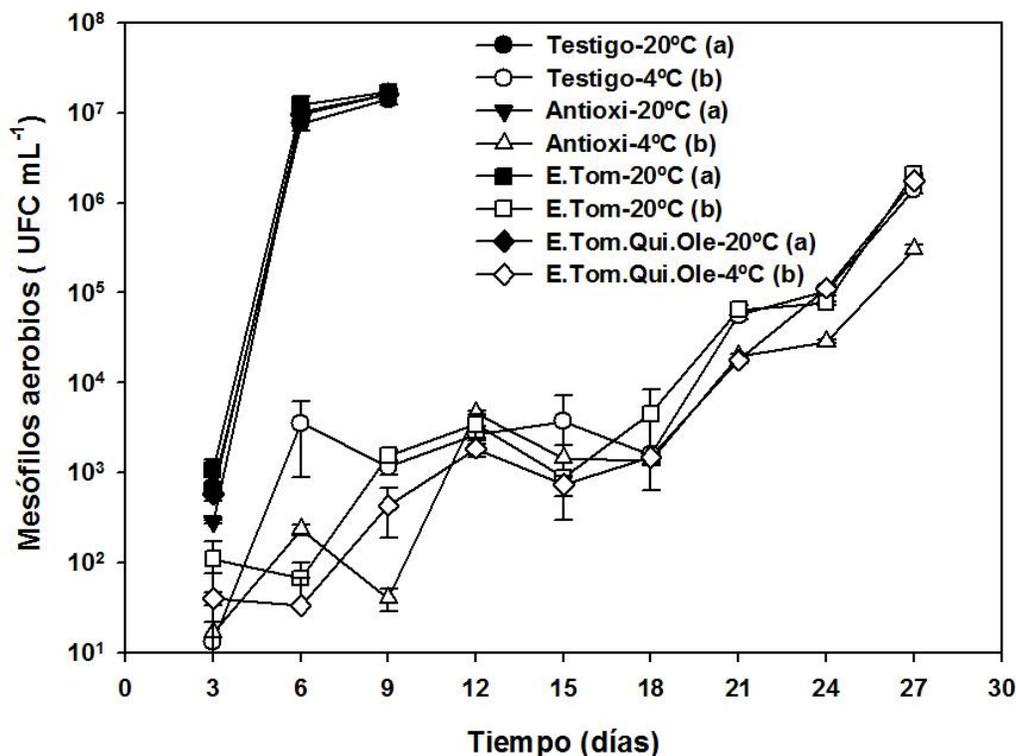


Figura 15. Microorganismos mesófilos aerobios en hongo seta almacenado a 20 y 4°C. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos basada en la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). La barra en cada punto corresponde a error estándar.

Cuadro 20. Valores percentiles de la distribución de Fisher ($F_{0.05}$) con ($\alpha=0.05$) y valores de F correspondientes al análisis de varianza de los parámetros de color correspondientes a la aplicación de recubrimientos de quitosano, ácido oleico y aceite esencial de tomillo sobre hongo seta (*Pleurotus ostreatus*).

Variable	Factor de variación							Error	CV (%)
	T (°C)	R (trat)	Φ (día)	T×R	T× Φ	R× Φ	T×R× Φ		
gl	1	3	8	3	2	24	6	384	---
$F_{0.05}$	3.87	2.63	1.96	2.60	2.63	1.55	2.12	---	---
L*	959.64*	2.20 ^{ns}	105.33*	1.52 ^{ns}	44.82*	0.74 ^{ns}	1.59 ^{ns}	8.33	
C*	117.22*	14.19*	122.06*	2.85*	54.57*	1.13 ^{ns}	2.35*	12.29	
H*	3623.96*	21.64*	24.72*	4.18*	408.75*	1.88*	3.47*	11.74	

^z Los símbolos * y ns significan efecto significativo y no significativo, respectivamente, de los factores de variación sobre el efecto de la aplicación de recubrimientos.

Cuadro 21. Comparación de medias entre niveles de los factores de variación dados por la temperatura, los recubrimientos comestibles y el tiempo sobre las variables de color en hongo seta.

Fuente de variación	Luminosidad	Hue	Croma	DSH		
				<u>L</u>*	<u>h</u>	<u>C</u>
<u>Temperatura</u>						
20 °C	61.65 b	61.77 a	22.48 b	1.33	0.91	0.87
4 °C	77.22 a	26.89 b	36.03 a			
<u>Tratamientos</u>						
(1) Testigo	74.51 a	34.76 c	32.50 b	2.14	1.46	1.40
(2) Antioxidante	73.10 a	33.38 c	30.91 c			
(3) E. Q+T	72.79 a	36.34 b	33.12 ab			
(4) E. Q+T+L	72.93 a	37.97 a	34.04 a			
<u>Días</u>						
3	84.87 a	42.95 b	19.57 g	4.09	2.80	2.69
6	71.30 cde	44.13 ab	26.09 f			
9	67.40 e	46.85 a	30.65 e			
12	78.04 b	24.64 de	35.62 d			
15	73.56 c	23.87 e	37.50 cd			
18	72.81 cd	23.31 e	38.34 bc			
21	72.13 cd	26.80 d	43.29 a			
24	69.04 de	34.10 c	41.00 ab			
27	67.25 e	26.80 d	43.29 a			

^z Letras iguales al interior de cada factor de variación indican que no hubo diferencia entre niveles (Tukey, 0.05). DSH es diferencia significativa honesta (Tukey) evaluada a un nivel de significancia $\alpha=0.05$. E.Q+T: Emulsión de quitosano al 1 % y aceite esencial de tomillo al 0.1 %. E.Q+T+L: Emulsión de quitosano al 1 %, aceite esencial de tomillo al 0.1 % y ácido oleico al 0.9

En la Figura 16 se observa el comportamiento de los ocho tratamientos. Considerando el parámetro L^* , los hongos se pueden clasificar de buena calidad cuando este valor supera 86 % y de calidad intermedia en el intervalo de 80-85 % (Gormley, 1975). Por lo anterior, se puede considerar que los hongos utilizados en los cuatro tratamientos almacenados a 20 °C sufrieron un rápido deterioro que disminuyó su calidad desde el tercer día (Figura 17), mientras que los hongos de todos los tratamientos a 4 °C se mantuvieron de buena calidad dentro de los primeros seis días y de calidad intermedia entre los nueve y 12 días. Este comportamiento se puede atribuir al efecto de interacción entre la temperatura y el tiempo, que resultó significativo (Cuadro 20).

La temperatura ejerció un efecto significativo en los parámetros de color, hue y croma. A 20 °C el croma fue menor y el ángulo de matiz fue mayor, respecto a la temperatura de 4 °C. El efecto de los tratamientos también fue significativo en ambas variables. El tratamiento cuatro fue el que presentó los valores más altos de ambos parámetros, por lo cual se puede atribuir al ácido oleico las diferencias encontradas respecto al resto de los tratamientos. A lo largo del almacenamiento, se presentó una relación inversa entre ambos parámetros, ya que a medida que transcurría el tiempo el valor de hue disminuyó y el valor del croma aumentó, es decir, los hongos fueron adquiriendo coloraciones que tendían hacia los colores amarillo-naranja y estos colores se fueron presentando más intensos cada vez. Estos cambios en el color se asocian los desórdenes fisiológicos que se presentaron en los hongos, así como al aumento de las poblaciones bacterianas (Figura 17).

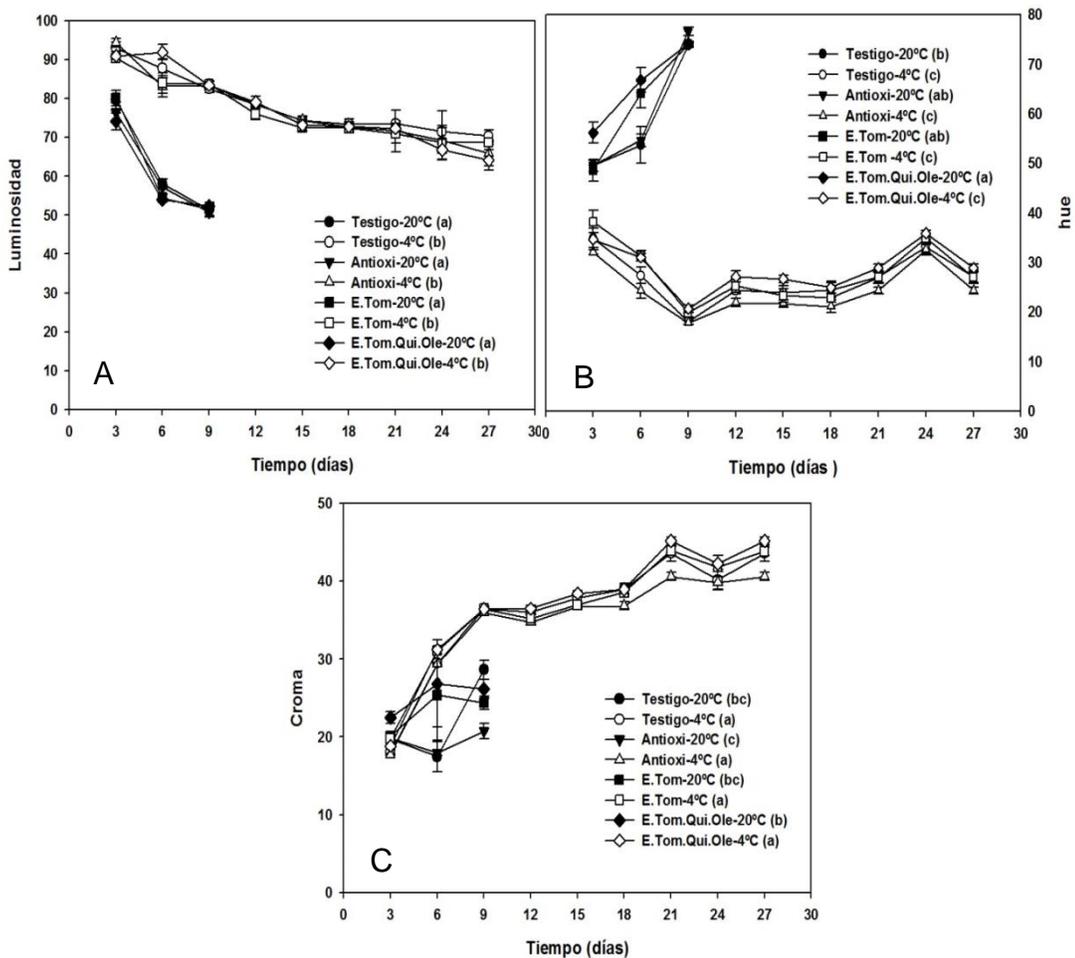


Figura 16. Luminosidad (A), ángulo hue (B) y croma (C) en hongo seta almacenado a 20 y 4 °C. Letras minúsculas diferentes indican diferencia significativa entre tratamientos basada en la prueba de Tukey ($p < 0.05$). La barra en cada punto corresponde al error estándar.

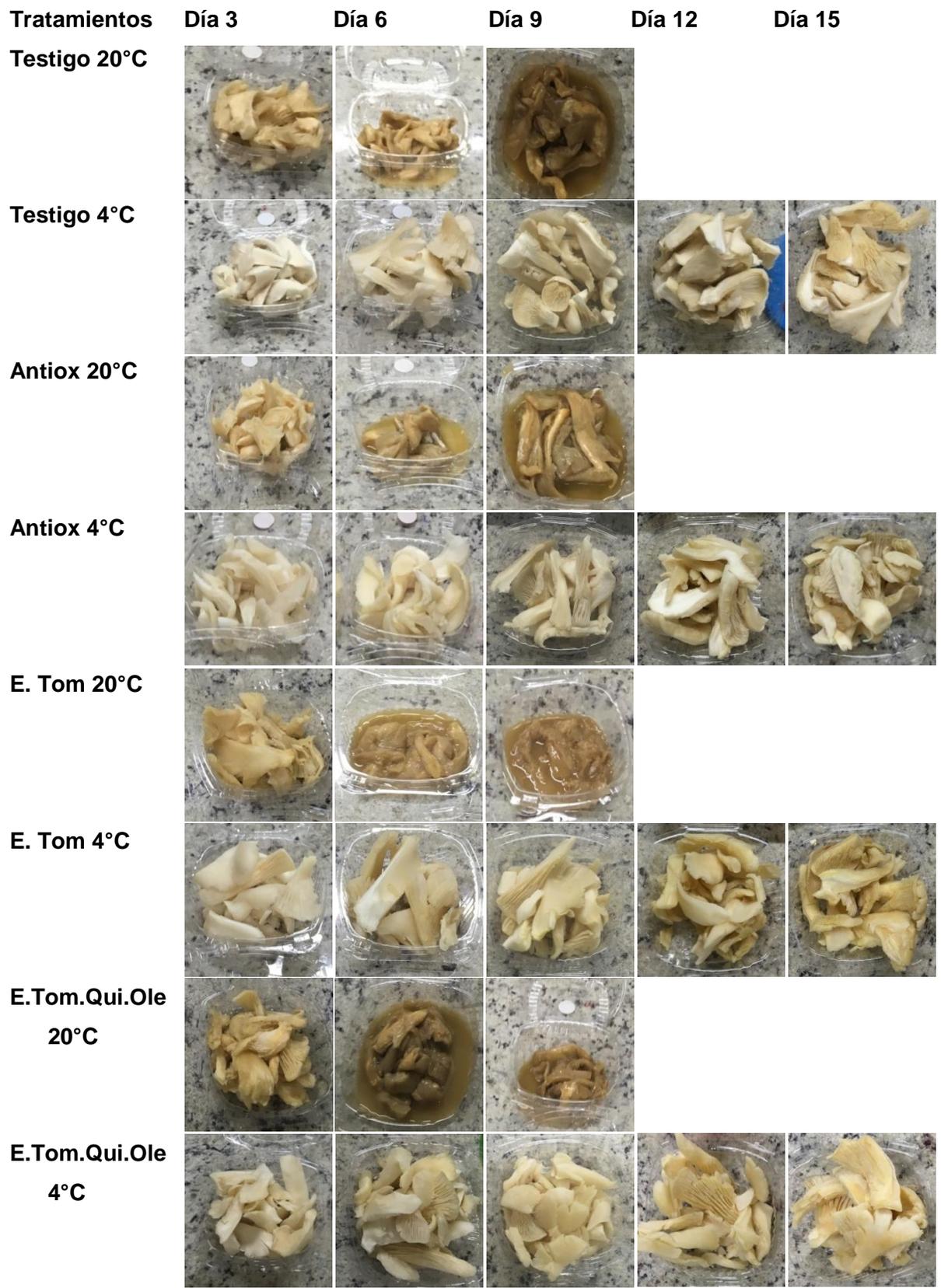


Figura 17. Evolución de la apariencia del hongo seta a 20 y 4 °C.

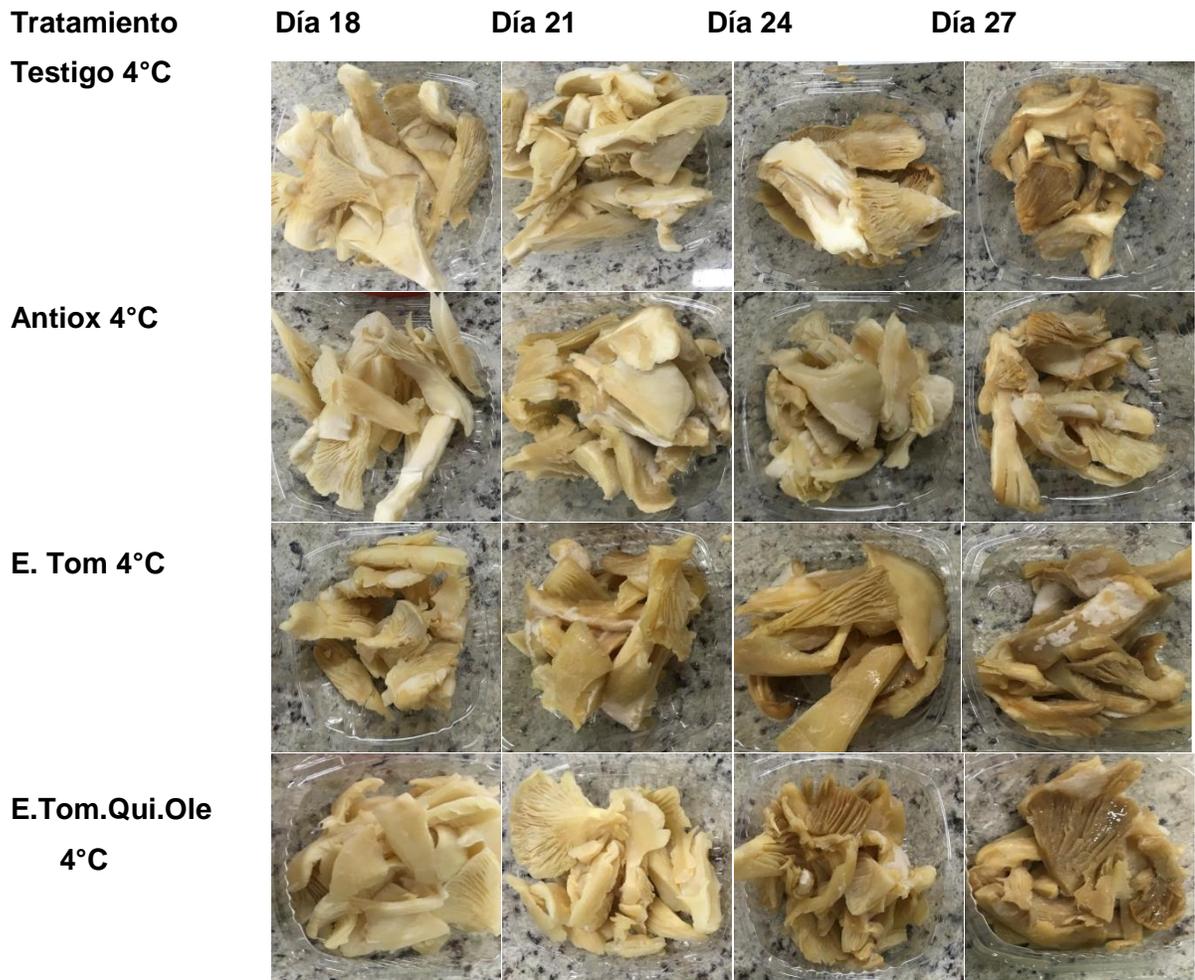


Figura 17. Evolución de la apariencia del hongo seta a 20 y 4 °C (cont).

7.6 Conclusiones

Las altas temperaturas contribuyen a mayores cambios, lo cual representa altas velocidades de deterioro de los parámetros de calidad en el hongo *Pleurotus ostreatus* respecto a las bajas temperaturas.

En las variables de sólidos solubles totales, acidez, luminosidad y microorganismos mesófilos aerobios la temperatura fue el factor principal que afectó las variaciones de estos parámetros.

En general, el uso de los recubrimientos comestibles a base de quitosano, aceite esencial de tomillo y ácido oleico provocó una baja tasa respiratoria y una disminución de la pérdida de peso.

El almacenamiento a 4 °C combinado con un tratamiento básico de desinfección, el uso de una solución antioxidante de ácido cítrico + eritorbato de sodio y la aplicación de un recubrimiento de quitosano, aceite esencial de tomillo y ácido oleico favoreció la conservación del hongo *Pleurotus ostreatus* mínimamente procesado por al menos 21 d.

8. LITERATURA CITADA

- Adrar, N., Oukil, N. & Bedjou, F. (2015). Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, 88, 112-119. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.12.007.
- Aho, J., Boetker, J., Baldursdottir, S. & Rantanen, J. (2015) Rheology as a tool for evaluation of melt processability of innovative dosage forms. *International Journal of Pharmaceutics*, 494, 623-642. doi: 10.1016/j.ijpharm.2015.02.009.
- Akbarirad, H., Kazemeini, S. M. & Shariaty, M. A. (2013). Deterioration and some of applied preservation techniques for common mushrooms (*Agaricus bisporus*, followed by *Lentinus edodes*, *Pleurotus spp.*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(6), 2398-2402.
- ASTM. 1989. Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials E 96-80. *En: Annual book of ASTM standards*: 15, 745-754. Filadelfia, EUA: American Society for Testing and Materials.
- Atri, N., Sharma, S. K., Joshi, R. & Gulati, A. (2013). Nutritional and nutraceutical composition of five culinary-medicinal species of genus *Pleurotus* (higher Basidiomycetes) from northwest India. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15, 49-56. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v15.i1.60
- Ares, G., Lareo, C. & Lema, P. (2007). Modified atmosphere packaging for postharvest storage of mushrooms. A review. *Fresh Produce*, 1(1), 32-40.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E. & Wilson L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop protection*, 22, 1087-1092. doi; 10.1016/S0261-2194(03)00117-0.
- Beaulieu, M., D'Aprano, G. & Lacroix, M. (2002). Effect of dose of gamma irradiation on biochemical and browning of mushrooms *Agaricus bisporus*. *Radiation Physics and Chemistry*, 63, 311-315. doi: 10.1016/S0969-806X(01)00518-7.
- Boa, E. (2005). Productos Forestales no madereros: Los hongos silvestres comestibles, perspectiva global de uso e importancia para la población. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 161 p.
- Boer, M., Heuer, C., Hussein, H. & McDougall, S. (2015). Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobials against *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes* of bovine uterine origin. *Journal of Dairy Science*, 98, 1-12. doi: 10.3168/jds.2014-8890.

- Bonilla, J., Atarés, L., Vargas, M. & Chiralt, A. (2012). Effect of essential oils and homogenization conditions on properties of chitosan-based films. *Food Hydrocolloids*, 26, 9-16. doi: 10.1016/j.foodhyd.2011.03.015.
- Bosquez-Molina, E., Guerrero-Legarreta, I. & Vernon-Carter, E. J. (2003). Moisture barrier properties and morphology of mesquite gum–candelilla wax based edible emulsion coatings. *Food Research International*, 36, 885-893.
- Chang, S.H., Lin, H. T., Wu, G. J. & Tsai, G. J. (2015). pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 134, 74-81. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.07.072.
- Chang, Y., McLandsborough, L. & McClements, D.J. (2015). Fabrication, stability and efficacy of dual-component antimicrobial nanoemulsions: Essential oil (*thyme* oil) and cationic surfactant (lauric arginate). *Food Chemistry*, 172, 298-304. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.081.
- Coma, V., Martial-Gros, A., Garreau, S., Copinet, A., Salin, F. & Deschamps, A. (2002). Edible antimicrobial films based on chitosan matrix. *Food Microbiology and Safety*, 67(3), 1162-1169.
- Coronado-Herrera, Vega y León, S., Gutierrez-Tolentino, R., García-Fernandez, B. & Díaz-González, G. (2006). Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud.» *REB*, 25(3), 72-79.
- Correa, G.R.C., Brugnari, T. & Bracht, A. (2016). Biotechnological, nutritional and therapeutics uses of *Pleurotus ostreatus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition: A Review on the past decade findings. *Trends in Food Science and Technology*, 50, 103-117. doi: 10.1016/j.tifs.2016.01.012.
- Cortés, R. M., Ruiz, M. R. & Henriquez, L. (2011). Influencia del empaque y envasado sobre las propiedades fisicoquímicas del hongo comestible *Pleurotus ostreatus*. *MVZ Córdoba*, 16(2), 2593-2604.
- Davis P L, W G Chase (1969) Determination of alcohol in citrus juice by gas chromatographic analysis of head space. *HortScience*, 4, 117-119.
- Derkach, S., Zhabyco, I., Voronko, N. & Maklakova, A. (2015). Stability and the rheological properties of concentrated emulsions containing gelatin-K-carrageenan polyelectrolyte complexes. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 486, 216-223. doi: 10.1016/j.colsurfa.2015.04.007.
- Dickinson, E. (2009). Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23, 1473-1482. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.08.005.
- Elsabbe, M. Z. & Abdou, E.S. (2013). Chitosan based edible films and coatings: A Review. *Materials Science and Engineering C*, 33, 1819-1841. doi: 10.1016/j.msec.2013.01.010.

- Evans, M., Ratcliffe, I., & Williams, P. A. (2013). Emulsion stabilization using polysaccharide–protein complexes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 18(4), 272-282.
- Fabra, M. J., Talens, P. & Chiralt, A. (2008) Tensile properties and water vapor permeability of sodium caseinate films containing oleic acid–beeswax mixtures.» *Journal of Food Engineering*, 85, 393-400. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2007.07.022.
- Fabra, M. J., Jiménez, A., Atarés, L., Talens, P. & Chiral, A. (2009) Effect of Fatty Acids and Beeswax Addition on Properties of Sodium Caseinate Dispersions and Films. *Biomacromolecules*, 10, 1500-1507. doi: 10.1021/bm900098p.
- Falguera, V., Quintero, J. P., Jiménez, A., Muñoz, J. A. & Ibarz, A. (2011). Edible films and coatings: Structures, active functions and trends in their use. *Trends in food science and technology*, 22, 292-303. doi: 10.1016/j.tifs.2011.02.004.
- Fernandes, A., Antonio, A., Oliveira, M. B., Martins, A. & Ferreira, I. (2012). Effect of gamma and electron beam irradiation on the physico-chemical and nutritional properties of mushrooms : A review. *Food Chemistry*, 135, 641-650. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.136.
- Fernandes, A., Barros, L., Martins, A., Herbert, P. & Ferreira, I.C. (2015). Nutritional characterisation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) P. Kumm. produced using paper scrabs as substrate. *Food Chemistry*, 169, 396-400. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.027.
- Fisher, K. & Philips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus de answer. *Trends in Food Science and Technology*, 19, 156-164. doi: 10.1016/j.tifs.2007.11.006.
- Flores, Z., San Martín, D., Villalobos-Carvajal, R., Tabilo-Munizaga, G., Osorio, F. & Leiva-Vega, J. (2016). Physicochemical characterization of chitosan-based coating-forming emulsions: Effect of homogenization method and carvacrol content. *Food Hydrocolloids*, 61, 851-857. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.07.007.
- Gaitán-Hernández, R; Salmones, D; Pérez-Merlo, R. & Mata, G. (2006). *Manual Práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción*. México: Instituto de Ecología.
- García-Cruz, L., Valle-Guadarrama, S., Salinas-Moreno, Y. & Luna-Morales, C. C. (2016). Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 69-76. doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.07.004.
- Gennadios, A., Weller, C. L. & Gooding, C. H. (1994). Measurement errors in water vapor permeability of highly permeable, hydrophilic edible films. *Journal of Food Engineering*, 21, 395–409. doi: 10.1016/0260-8774(94)90062-0.
- Galus, S. & Kadzinska, J. (2015). Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science and Technology*, 45, 273-283. doi: 10.1016/j.tifs.2015.07.011.

- Galus, S. & Lenart, A. (2013). Development and characterization of composite edible films based on sodium alginate and pectin. *Journal of Food Engineering*, 115(4), 459-465. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.03.006.
- Gao, M., Feng, L. & Jiang, T. (2014). Browning inhibition and quality preservation of button mushroom (*Agaricus bisporus*) by essential oils fumigation treatment. *Food Chemistry*, 149, 107-113. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.10.073.
- Ghanbarzadeh, B., Almasi, H. (2011). Physical properties of edible emulsified films based on carboxymethyl cellulose and oleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 48, 44-49. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2010.09.014.
- Gormley, T.R. (1975). Chill storage of mushrooms. *Journal of Science and Food Agriculture*, 26, 401-411. doi: 10.1002/jsfa.2740260404.
- Guillaume, C., Schwab, I., Gastaldi, E. & Gontard, N. (2010) Biobased packaging for improving preservation of fresh common mushrooms (*Agaricus bisporus* L.). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 690-696. doi: 10.1016/j.ifset.2010.05.007.
- Guzey, S. & McClements, D.J. (2006). Formation, stability and properties of multilayer emulsions for application in the food industry. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128-130, 227-248. doi: 10.1016/j.cis.2006.11.021.
- Hayati, I. N., Ching, C. W. & Rozaina, M. Z. (2016). Flow properties of o/w emulsions as affected by xanthan gum, guar gum and carboxymethyl cellulose interactions studied by a mixture regression modelling. *Food Hydrocolloids*, 53, 199-208. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.04.032.
- Jafri, M., Jha, A. & Bunkar, D. S. (2013). Quality retention of oyster mushrooms (*Pleurotus florida*) by a combination of chemical treatments and modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 76, 112-118. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.10.002.
- Jaworska, G., Bernas, E. & Mickowska, B. (2011). Effect of production process on the amino acid content of frozen and canned *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Food Chemistry*, 125, 936-943. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.09.084.
- Jiang, T., Jahangir, M., Jiang, Z., Lu, X. & Yin, T. (2010). Influence of UV-C treatment on antioxidant capacity, antioxidant enzyme activity and texture of postharvest shiitake (*Lentinus edodes*) mushrooms during storage. *Postharvest Biology and Technology*, 56, 209-215. doi: 10.1016/j.postharvbio.2010.01.011.
- Jiang, T., Feng, L. & Zheng, X. (2012a). Effect of chitosan coating enriched with thyme oil on postharvest quality and shelf life of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 188-196. doi: 10.1021/jf202638u.
- Jiang, T., Feng, L. & Li, J. (2012b). Changes in microbial and postharvest quality of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) treated with chitosan–glucose complex coating under cold storage. *Food Chemistry*, 131, 780-786. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.08.087.

- Jiang, T., Feng, L. & Wang, Y. (2013a). Effect of alginate/nano-Ag coating on microbial and physicochemical characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) during cold storage *Food Chemistry*, 141, 954-960. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.03.093.
- Jiang, T., Feng, L., Zheng, X. & Li, J. (2013b). Physicochemical responses and microbial characteristics of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*) to gum arabic coating enriched with natamycin during cold storage. *Food Chemistry*, 138, 1992-1997. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.11.043.
- Jiang, T., Luo, Z. & Ying, T. (2015). Fumigation with essential oils improves sensory quality and enhanced antioxidant ability of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Food Chemistry*, 172, 692-698. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.09.130.
- Kim, K. M., Ko, J. A., Lee, J. S., Park, H. J. & Hanna, M.A. (2006). Effect of modified atmosphere packaging on the shelf-life of coated, whole and sliced mushrooms. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 364-371. doi: 10.1016/j.lwt.2005.02.015.
- Krochta, J. & DeMulder, C. L. (1997). Edible and biodegradable polymer films: Challenges and opportunities. *Food Technology*, 51(2), 60-74.
- Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Dueñas M. T. & De la Caba, K. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering*, 116, 889-899. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2013.01.022.
- Lim, J.S., Wong, S.F., Law, M.C., Samyudia, Y. & Dol, S.S. (2015). A review of the effects of emulsions on flow behaviours and common factors affecting the stability of emulsions. *Journal of Applied Science*, 15, 167-172. doi: 10.3923/jas.2015.167.172.
- Lin, D., Zhao, Y. (2007). Coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 6: 60-75. doi: 10.1111/j.1541-4337.2007.00018.x.
- Liu, Y., Cai, Y., Jiang, X., Wu, J. & Le, X. (2016). Molecular interactions, characterization and antimicrobial activity of curcumin-chitosan blend films. *Food Hydrocolloids*, 52, 564-572. doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.08.005.
- Liu, Z. & Wang, X. (2012). Changes in color, antioxidant, and free radical scavenging enzyme activity of mushrooms under high oxygen modified atmospheres. *Postharvest Biology and Technology*, 69, 1-6. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.02.008.
- López-Ambrocio, R.M., Delgadillo-Martínez, J. & Ruíz-Posadas, L.M. (2015). Rendimiento y calidad de aceite de *Thymus vulgaris* L., por efecto de hongos micorrizicos, rizobacterias y fitoreguladores. *Agro Productividad*, 8(4), 3-11.
- Lozano-Grande, A. (2014). *Recubrimiento comestible de pectina de tejocote y cera de candelilla para la conservación de hongo seta (Pleurotus ostreatus) mínimamente procesado*. (Tesis inédita de maestría). Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Estado de México.

- Maissa, B. J., Emna, G., Machroui, M. & Walid, H. (2015). Thyme essential oil as a defense inducer of tomato against gray mold and Fusarium wilt. *Plant Physiology and Biochemistry*, 94, 35-40.
- Mandal, S & DebMandal, M. (2016). Thyme (*Thyme vulgaris L.*) Oils. In Preedy, V. (Ed), *Essential oils in food preservation, flavor and safety* (825-834). London: Academic Press.
- Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. C., & Baldwin, E. A. (2005). Conservación mediante recubrimientos comestibles. En González-Aguilar, G. A., Gardea, A. A., & Cuamea-Navarro, F. (Eds.). *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Frescos Cortados*: 341-356. Guadalajara, Jalisco, México: Logiprint Digital S. de R.L. de C.V.
- Martínez-Carrera, D. (2012). Los hongos comestibles, funcionales y medicinales: su contribución al desarrollo de las cadenas agroalimentarias y la seguridad alimentaria en México. *Ciencia y Desarrollo*. 96: 33-43.
- Martínez-Carrera, D., N. Curvetto, M. Sobal, P. Morales & V. M. Mora (Eds.). 2010. *Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI*. Puebla: Red Latinoamericana de Hongos Comestibles y Medicinales-COLPOS-UNS-CONACYT-AMC-UAEM-UPAEP-IMINAP.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock Biología de los Microorganismos*. Madrid: Prentice-Hall.
- McClements, D.J. (2005). *Food emulsions: Principles, Practices and Techniques*. Boca Raton: CRC Press.
- McClements, D. J. (2007). Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47, 611–649.
- McGuire R.G. (1992). Reporting of objective color measurements. *HortScience*, 27, 1254-1255.
- McHugh, T. H., Avena-Bustillos, R. & Krochta, J. M. (1993). Hydrophilic edible films: modified procedure for water vapor permeability and explanation of thickness effects. *Journal of Food Science*, 58 (4), 899-903. Doi: 10.1111/j.1365-2621.1993.tb09387.x.
- Mehta, B. K., Jain, S. K., Sharma, G. P., Doshi, A. & Jain, H. K. (2011). Cultivation of button mushroom and its processing: an techno-economic feasibility. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*. 2(1): 201-207.
- Mishra, K.K., Pal, R. S., Arunkumar, R., Chandrasekara, C., Jain, S. K & Bhatt, J. C. (2013). Antioxidant properties of different edible mushroom species and increased bioconversion efficiency of *Pleurotus eryngii* using locally available casting materials. *Food Chemistry*, 138, 1557-1563. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.12.001.

- Mohapatra, B., Bira, Z.M., Kerry, J.P., Frias, J.M. & Rodrigues, F.A. (2010). Postharvest hardness and colour evolution of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Food Science*, 75(3), 146-152. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01518.x.
- Morillon, V., Debeaufort, F., Blond, G., Capelle, M., & Voilley, A. (2002). Factors affecting the moisture permeability of lipid-based edible films: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(1), 67–89.
- Munsch, P., Geoffroy, V. A., Alatossava, T. & Meyer, J. M. (2000). Application of Siderotyping for Characterization of *Pseudomonas tolaasii* and “*Pseudomonas reactans*” isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. *applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 4834–4841.
- Naranjo J. & Herrera C. (2000). El aprovechamiento de hongos silvestres en la Zona Boscosa del Salto Pueblo Nuevo, Durango. *Interciencia*, 1, 4-6
- Nordby, M., Kjoniksen, A., Nystrom, B. & Roots, J. (2003). Thermoreversible gelation of aqueous mixture of pectin and chitosan. *Biomacromolecules*, 7, 337-343. doi: 10.1021/bm020107+.
- OECD. (2013): Consensus document on compositional considerations for new varieties of oyster mushroom (*pleurotus ostreatus*): key food and feed nutrients, anti-nutrients and toxicants. *Series on the Safety of Novel Foods and Feeds*, 23,1-42.
- Oliveira, F., Sousa-Gallagher, M.J., Mahajan, P.V. & Texeira, J.A. (2012). Development of shelf-life kinetic model for modified atmosphere packaging of fresh sliced mushrooms. *Journal of Food Engineering*, 111, 466-473. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2012.01.013.
- Oms-Oliu, G., Soliva-Fortuny, R. & Martin-Belloso, O. (2008). Edible coatings with antibrowning agents to maintain sensory quality and antioxidant properties of fresh-cut pears. *Postharvest Biology and Technology*, 50, 87-94. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.03.005.
- Pal, R. (2000). Relative viscosity of non-Newtonian concentrated emulsion of non-colloidal droplets. *Indian Engineering Chemistry Research*, 39, 33-43. doi: 10.1021/ie000616x.
- Papaspyridi, L. M., Aligianis, N., Christakopoulos, P., Skaltsounis, L. & Fokialakis, N. (2011). Production of bioactive metabolites with pharmaceutical and nutraceutical interest by submerged fermentation of *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor. *Procedia Food Sciences*, 15, 1746-1752. doi: 10.1016/j.profoo.2011.09.257.
- Peng, Y. & Li, L. (2014). Combined effects of two essential oils on physical, mechanical and structural properties of chitosan films. *Food Hydrocolloids*, 36, 287-293. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.013.
- Perdones, A., Vargas, M., Atares, L. & Chiralt, A. (2014). Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan-cinnamon leaf oil films as affected by oleic acid. *Food Hydrocolloids*, 36, 256-264. doi: 10.1016/j.foodhyd.2013.10.003.

- Perdones, A., Chiralt, A. & Vargas, M. (2016). Properties of film-forming dispersions and films based on chitosan containing basil or thyme essential oil. *Food Hydrocolloids*, 57, 271-279. doi: 10.1016/j.foodhyd.2016.02.006.
- Pereda, M., Amica, G. & Marcovich, N. E. (2012). Development and characterization of edible chitosan/olive oil emulsion films. *Carbohydrate polymers*, 87, 1318-1325. doi: 10.1016/j.carbpol.2011.09.019.
- Piorkowski, D.T. & McClements, D.J. (2014). Beverage Emulsions: Recent Developments in Formulation, Production, and applications. *Food Hydrocolloids*, 42, 5-41.
- Quintero, C., Falguera, C. & Muñoz, H. (2010). Películas y recubrimientos comestibles: importancia y tendencias recientes en la cadena hortofrutícola. *Tumbaga*, 5, 93-118.
- Ramos-García, M. L., Bautista-Baños, S. & Barrera-Necha, L. (2010). Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 28 (1), 44 – 57.
- Rao, A. (2007). *Rheology of Fluid and Semisolid Foods: Principles and Applications*. US: Springer.
- Rojas-Grau, M.A., Tapia, M.S., Rodríguez, F.J., Carmona, A.J. & Martín-Belloso, O. (2007). Alginate and gellan based edible coatings as support of antibrowning agents applied on fresh-cut Fuji apple. *Food Hydrocolloids*. 21: 118–127. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2006.03.001.
- Ruiz, R. M., Cortés, R. M. & Henríquez, A. L. (2010). Efecto de dos atmósferas de empaque en hongos comestibles (*Pleurotus ostreatus* L.) tratados mediante impregnación a vacío con una solución conservante. *Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*. 17(1): 11-19.
- Saboury, A.A. (2009). Enzyme inhibition and activation: A general theory. *Journal of Iran Chemistry Society*, 6(2), 219-229. doi: 10.1007/BF03245829.
- SAGARPA (2015). Anuario estadístico de la producción agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. México. www.siap.sagarpa.gob.mx.
- Sánchez-González, L., Chiralt, A., González-Martínez, C. & Cháfer, M. (2011). Effect of essential oils on properties of film forming emulsions and films based on hydroxypropylmethylcellulose and chitosan. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 246-253. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.02.028.
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85, 1321-1337. doi: 10.1007/s00253-009-2343-7.
- Santacruz, S., Rivadeneira, C. & Castro, M. (2015). Edible films based on starch and chitosan. Effect of starch source and concentration, plasticizer, surfactant's hydrophobic tail and mechanical treatment. *Food Hydrocolloids*, 49, 89-94. Doi: 10.1016/j.foodhyd.2015.03.019.

- Shem, Z. & Kamdem, D.P. (2015). Development and characterization of biodegradable chitosan films containing two essential oils. *International Journal of Biological Macromolecules*, 74, 289-296. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.11.046.
- Shukla, S. & Jaitly, A.K. (2011) Morphological and Biochemical Characterization of Different Oyster Mushroom (*Pleurotus spp.*). *Journal of Phytology*, 3(8), 18-20.
- Simón, A., González-Fandos, E. & Vázquez, M. (2010). Effect of washing with citric acid and packaging in modified atmosphere on the sensory and microbiological quality of sliced mushrooms (*Agaricus bisporus L.*) *Food Control*, 21, 851-856. doi: 10.1016/j.foodcont.2009.11.012.
- Simón, A. & González-Fandos, E. (2011). Influence of modified atmosphere packaging and storage temperature on the sensory and microbiological quality of fresh peeled white asparagus. *Food Control*, 22, 369-374. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.09.002.
- Singh, P., Langowski, H. & Wanib, A. (2010). Recent advances in extending the shelf life of fresh *Agaricus* mushrooms: A review. *Journal of Science and Food Agriculture*, 90, 1393-1402. doi: 10.1002/jsfa.3971.
- Siroli, L., Patrignani, F., Gradini, F. & Lanciotti, R. (2015) Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis*. *Food Chemistry*, 182,185-192. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.136.
- Tao, F., Zhang, M., Hangqing, Y. & Jincal, S. (2006). Effects of different storage conditions on chemical and physical properties of white mushroom after vacuum cooling. *Journal of Food Engineering*, 79: 1302-1309.
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H. & Masoudpour-Behabadi, M. (2015). Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers*, 137, 360-374. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.10.074
- Trejo, V., Aragón, N. & Miranda, P. (2001). Estimación de la permeabilidad al vapor de agua en películas a base de quitosán. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 45(1),1-5.
- Tzoumaki, M. V., Biliaderis, C. G. & Vasilakakis, M.(2009). Impact of edible coatings and packaging on quality of white asparagus (*Asparagus officinalis L*) during cold storage. *Food Chemistry*, 117(1), 55-63. doi: 10.1016/j.foodchem.2009.03.076.
- Vargas, M., Albors, A., Chiralt, A. & González-Martínez, C. (2009). Characterization of chitosan–oleic acid composite films. *Food Hydrocolloids*, 23(2), 536-547. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.02.009.
- Vargas, M., Perdones, A., Chiralt, A., Cháfer, M. & González-Martínez, C. (2011). Effect of homogenization conditions on physicochemical properties of chitosan-based film-forming dispersions and films. *Food Hydrocolloids*, 25, 1158-1164. doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.11.002.

- Ventura-Aguilar, R., Colinas-Leon, M.T., Martinez-Damian, M T. & Valle-Guadarrama, S. (2011) Atmósferas modificadas, frigo conservación e inhibidores de ocurecimeinto en poscosecha de *Pleurotus ostreatus*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2(2),197-206.
- Villaescusa, R. & Gil, M.I. (2003). Quality improvement of *Pleurotus* mushrooms by modified atmosphere packaging and moisture absorbers. *Postharvest Biology and Technology*, 28,169-179. doi: 10.1016/S0925-5214(02)00140-0.
- Villalobos-Carvajal, R., Hernández-Muñoz, A. & Chiralt, A. (2009). Barrier and optical properties of edible hydroxypropyl methylcellulose coatings containing surfactants applied to fresh cut carrot slices. *Food hydrocolloids*, 23(2), 526-535. doi: 10.1016/j.foodhyd.2008.02.008.
- Wong, S. F., Lim, J.S . & Dol, S.S. (2015). Crude oil emulsion: A review on formation, classification and stability of water-in-oil emulsions. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 135, 498-504. doi: 10.1016/j.petrol.2015.10.006.
- Wrona, M., Bentayeb, K. & Nerin, C. (2015). A novel active packaging for extending the shelf-life of fresh mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Food Control*, 54, 200-207. doi: 10.1016/j.foodcont.2015.02.008.
- Xiao, J., Li, Y. & Huang, Q. (2016). Recent advances on food-grade particles stabilized pickering emulsions: Fabrication, characterization ad research trends. *Trend in Food Science and Technology*, 55, 48-60. doi: 10.1016/j.tifs.2016.05.010.
- Zamudio-Flores, P.B., Ochoa-Reyes, E., Ornelas-Paz, J. J., Tirado-Gallegos, J. M., Bello-Pérez, L. A., Rubio-Rioz, A., Cardenas-Felix, R. G. (2015). Caracterización fisicoquímica, mecánica y estructural de películas de almidones oxidados de avena y plátano adicionadas con betalaínas. *Agrociencia*, 49(5), 483-498.
- Zhang, Y., Ma, Q., Critzer, F., Davidson, M. & Zhong, Q. (2016). Organic thyme oil emulsion as an alternative washing solution to enhance the microbial safety of organic cantaloupes. *Food Control*, 67, 31-38.